



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA PROTEASA  
TERMOESTABLE CON POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE  
*Solanum elaeagnifolium***

---

Por:

**José Guadalupe Teutle Paredes**

TESIS APROBADA POR LA

CORDINACIÓN DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

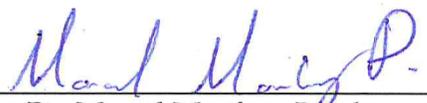
**MAESTRIA EN CIENCIAS**

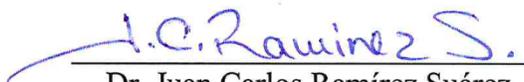
## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de José Guadalupe Teutle Paredes, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Miguel Ángel Mazorra Manzano  
Director de tesis

\_\_\_\_\_  
Dra. Belinda Vallejo Galland  
Integrante del comité de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Marcel Martínez Porchas  
Integrante del comité de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez  
Integrante del comité de tesis

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de José Guadalupe Teutle Paredes, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

---

Dr. Miguel Ángel Mazorra Manzano  
Director de tesis



---

Dra. Belinda Vallejo Galland  
Integrante del comité de tesis

---

Dr. Marcel Martínez Porchas  
Integrante del comité de tesis

---

Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Purificación y Caracterización de una Proteasa Termoestable con Potencial Biotecnológico de *Solanum elaeagnifolium*” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor José Guadalupe Teutle Paredes, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.  
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Pablo Wong González", is written over a horizontal line.

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para mis estudios de Maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C por contribuir en mi formación profesional como Maestro en Ciencias.

Agradezco al Dr. Miguel Ángel Mazorra Manzano por su confianza depositada en mi para realizar el proyecto de tesis. Así mismo, agradezco su amistad de amigo que me brindo más allá de la parte académica, por los consejos, por la asesoría incondicional y por transmitirme su entusiasmo por las proteínas/enzimas.

Al Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez, Dr. Belinda Vallejo Galland y Dr. Marcel Martínez Porchas por acompañarme en mi proceso de formación como Maestro en Ciencias; así como, por sus valiosas recomendaciones para la mejora continua del proyecto de tesis.

Al Dr. José Angel Huerta Ocampo de la coordinación de Ciencia de los Alimentos por su interés en nuestra investigación y apoyo colaborativo para realizar los análisis proteómico en este trabajo, así como su disposición para atender nuestras dudas y sus valiosos comentarios.

Al equipo de trabajo M.C Daniel Alejandro González Velázquez e Ing. Angélica Martínez, por brindarme su apoyo incondicional en mis adentros al trabajo rutinario de laboratorio.

A todo el personal técnico que integra el Laboratorio de Química y Bioquímica de Productos Lácteos, Laboratorio de Bioquímica y Calidad de Productos Pesqueros y, Laboratorio de Biología Experimental por la asesoría y las facilidades en material y equipo brindadas en todo momento.

A la Dra. María de Jesús Torres Llenez, M.C. Carmen estrada, M.C. Maria Elena Lugo y M.C. Ricardo Reyes por el apoyo técnico brindado y su disposición para ayudarme cuando fue necesario.

Al Dr. Adrián Hernández Mendoza por su apoyo y disponibilidad para atender parte de nuestras dudas y sus aportaciones en las sesiones de seminario interno.

A mis amigos de Atlixco: Héctor, Jaime, Adriana, Anahí, Josefina, Catalina, Josseline, Ma. de los Angeles, Nataly, Mónica y Jazmín, por mencionar algunos, por acompañarme a distancia y por echarme porras en todo momento para concluir mi objetivo marcado.

A mis amigos que tuve la dicha de conocer en Maestría: Karla, Joel, Mary, Luz del Carmen, Rosa Elizabeth, Claudia, Julio Zamorano, Julio González, Stephanie Navarro y Francisco Alday, por

todo lo compartido y vivido en estos dos años. Y en especial, te agradezco a ti amiga Ana Laura Flores Saucedo por brindarme en vida tu amor y cariño incondicional.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Miguel Rendón, Adilene, Ricardo, Isidro, Cecilia, Miriam, Carmen, Fernando, Miguel Alvares, Rodrigo, Wilver, Alejandra, Adelmo, Olimpia, Lilia, Lourdes, Eduardo, Ariana, Arantza, Paul, Nicolás, Ildelfonso por los interesantes debates académicos que tuvimos y por hacer amena mi estancia en el laboratorio.

A todas aquellas personas que directa o indirectamente me apoyaron para que esta investigación llegara a buen término.

## **DEDICATORIA**

En primera instancia dedico este trabajo a mi persona, un objetivo más en mi vida que he cumplido. En segundo lugar, este trabajo lo dedico a José Guadalupe Teutli López, Rufina Paredes Hernández, Cecilia Paredes Hernández, Oliverio Pérez Ramos, Cesar Antonio Teutli Paredes, Ana Laura Teutli Paredes, Nohemí Pérez Paredes, Maricarmen Pérez Paredes y Francisco Javier Pérez Paredes, mi hermosa familia. En último, pero no menos importante, a todos los grupos que trabajan arduamente en investigación enfocada a proteasas de origen vegetal.

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	5
<b>DEDICATORIA</b> .....	7
<b>CONTENIDO</b> .....	8
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	11
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	12
<b>RESUMEN</b> .....	13
<b>ABSTRACT</b> .....	15
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	16
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	18
2.1. Generalidades de las Enzimas Proteolíticas .....	18
2.1.1. Serina Proteasas .....	18
2.1.2. Cisteína Proteasas .....	19
2.1.3. Aspártico Proteasas.....	20
2.1.4. Metaloproteasas .....	20
2.2. Rol Biológico de las Fitoproteasas .....	21
2.3. Aplicaciones Biotecnológicas de Fitoproteasas .....	23
2.3.1. Ablandadores Enzimáticos de Carne .....	24
2.3.2. Coagulante de la Leche.....	25
2.3.3. Producción de Hidrolizados de Proteínas y Péptidos Bioactivos .....	26
2.3.4. Formulación de Detergentes .....	28
2.3.5. Proteasas como Auxiliares Digestivos.....	28
2.4. Estabilidad Térmica de Enzimas .....	29
2.5. <i>Solanum elaeagnifolium</i> Como Nueva Fuente de Enzimas Proteolíticas .....	30
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	34
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	35
4.1. Objetivo General.....	35
4.2. Objetivos Específicos .....	35
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	36
5.1. Materia Prima y Preparación de Extracto.....	36
5.2. Cuantificación de Proteína.....	36
5.3. Actividad Coagulante de la Leche.....	37
5.4. Actividad Proteolítica.....	38
5.5. Análisis de Proteínas por Electroforesis SDS-PAGE.....	38
5.6. Actividad Enzimática por Zimografía.....	39

## CONTENIDO (continuación)

5.7. Efecto del pH y Temperatura Sobre la Actividad Proteolítica del Extracto Crudo y de la Enzima Parcialmente Purificada de <i>S. elaeagnifolium</i> .....	39
5.8. Efecto del pH y Temperatura Sobre la Estabilidad del Agente Coagulante de la Leche del Extracto Crudo de <i>Solanum elaeagnifolium</i> .....	40
5.9. Termoestabilidad de las Proteasas del Extracto Crudo de <i>S. elaeagnifolium</i> .....	41
5.10. Inactivación Térmica de las Proteasas del Extracto Crudo de <i>S. elaeagnifolium</i> .....	41
5.11. Efecto de Compuestos Inhibidores Sobre la Actividad Enzimática del Extracto Crudo y de la Proteasa Parcialmente Purificada de <i>S. elaeagnifolium</i> .....	42
5.12. Protocolo de Purificación para una Proteasa de <i>S. elaeagnifolium</i> .....	42
5.13. Preferencia de Sustratos de la Enzima Proteolítica de <i>S. elaeagnifolium</i> y su Análisis Cinético.....	44
5.14. Temperatura de Desnaturalización Térmica de la Proteasa de <i>S. elaeagnifolium</i> por Calorimetría Diferencial de Barrido .....	45
5.15. Perfil Hidrolítico de Caseínas por la Proteasa de <i>S. elaeagnifolium</i> y su Comparación con Quimosina.....	46
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
6.1. Contenido de Proteína y Perfil Proteico del Extracto Crudo de <i>Solanum elaeagnifolium</i> .....	48
6.2. Efecto del pH y la Concentración de NaCl en el Proceso de Extracción de Proteasas del Fruto de Trompillo.....	49
6.3. Efecto del pH y Temperatura Sobre la Actividad Proteolítica del Extracto Crudo de Trompillo <i>S. elaeagnifolium</i> .....	51
6.4. Efecto de la Temperatura Sobre la Actividad Coagulante de la Leche del Extracto Crudo de Trompillo .....	54
6.5. Efecto del pH y Temperatura Sobre la Estabilidad de las Proteasas del Extracto Crudo de Trompillo .....	57
6.6. Efecto del Tratamiento Térmico Sobre la Estabilidad de las Proteasas del Extracto Crudo de Trompillo.....	60
6.7. Parámetros Cinéticos de Inactivación Térmica D y z.....	62
6.8. Efectos de Compuestos Inhibidores Sobre la Actividad Proteolítica del Extracto Crudo de Trompillo .....	64
6.9. Purificación de una Proteasa de <i>S. elaeagnifolium</i> .....	66
6.10. Caracterización Bioquímica de la Proteasa Parcialmente Purificada de <i>S. elaeagnifolium</i> .....	73
6.11. Temperatura de Transición Media ( $T_m$ ) de la Proteasa Sela SP1 por DSC.....	79
6.12. Especificidad Sobre Sustratos y Caracterización Cinética de la Serina Proteasa Sela SP1.....	81
6.13. Perfil de Degradación de Caseínas por la Serina Proteasa de <i>S. elaeagnifolium</i> (Sela SP1) y Quimosina.....	84
6.14. Identificación de Proteasas de <i>Solanum elaeagnifolium</i> por Espectrometría de Masas...88	
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>89</b>

## CONTENIDO (continuación)

<b>8. RECOMENDACIONES</b> .....	90
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	91
<b>10. ANEXOS</b> .....	100
10.1. Cromatogramas de Iones Totales del Análisis LC-MS/MS de las Bandas de Proteínas de las Fracciones Recuperadas por CII Empleando una Columna MonoQ 5/50 GL .....	100
10.2. Proteínas de <i>S. elaeagnifolium</i> Identificadas por Espectrometría de Masas en Tándem (LC-MS/MS) .....	101

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Mapa de distribución de <i>S. elaeagnifolium</i> en el continente americano y sus características morfológicas de la planta, fruto y semilla.....	33
2	Perfil proteico por SDS-PAGE del extracto crudo de <i>S. elaeagnifolium</i> .....	49
3	Efecto del pH y temperatura sobre la actividad proteolítica del extracto crudo de <i>S. elaeagnifolium</i> .....	53
4	Efecto de la temperatura sobre la actividad coagulante y el tiempo de coagulación de la leche por el extracto crudo de fruto de <i>S. elaeagnifolium</i> .....	56
5	Efecto del pH y temperatura sobre la estabilidad de las enzimas coagulantes de la leche del extracto crudo de <i>S. elaeagnifolium</i> .....	59
6	Actividad coagulante del extracto de trompillo en función del tiempo de incubación a diferentes condiciones de temperatura.....	61
7	Actividad proteolítica por zimografía y perfil proteico por SDS-PAGE del extracto crudo de trompillo después del tratamiento térmico a 70 °C.....	62
8	Cinética de inactivación térmica de las proteasas con ACL del extracto crudo de trompillo.....	63
9	Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica del extracto de <i>S. elaeagnifolium</i> .....	66
10	Perfil proteico y zimograma de la enzima parcialmente purificada FG de <i>S. elaeagnifolium</i> .....	68
11	Cromatograma de exclusión molecular de la fracción CIH de <i>S. laeagnifolium</i> .....	70
12	Cromatograma de exclusión molecular de la fracción CIH: dos picos constituyentes.....	71
13	Perfil de elusión isocrático de la enzima parcialmente purificada FG de <i>S. elaeagnifolium</i> .....	72
14	Perfil proteico de fraccionamiento de la fracción FG mediante CII usando MonoQ.....	73
15	Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica de la enzima parcialmente purificada de <i>S. elaeagnifolium</i> .....	75
16	Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad proteolítica de Sela SP1 de <i>S. elaeagnifolium</i> .....	78
17	Hidrolisis de proteínas de lactosuero por Sela SP1 bajo diferentes tiempos de incubación.....	83
18	Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción y gráfico de Lineawever-Burk para la serina proteasa Sela SP1.....	84
19	Perfil de degradación de caseínas por Sela SP1 y quimosina.....	87

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Efecto del pH y adición de NaCl en la solución extractora sobre la ACL de proteasas del extracto de <i>S. elaeagnifolium</i> .....	51
2	Actividad coagulante del extracto crudo de <i>S. elaeagnifolium</i> en función de la temperatura.....	57
3	Resumen de la purificación de la proteasa del extracto crudo proveniente de <i>S. elaeagnifolium</i> .....	68
4	Temperatura media de desnaturalización $T_m$ observada para la serina proteasa de <i>S. elaeagnifolium</i> (Sela SP1) durante el proceso de purificación.....	81

## RESUMEN

Las enzimas proteolíticas representan alrededor del 60 % del mercado total de enzimas que actualmente se comercializan como agentes catalíticos para aplicaciones biotecnológicas. Se ha reportado que las bayas de Trompillo (*Solanum elaeagnifolium*) poseen enzimas proteolíticas con actividad a altas temperaturas y con potencial para ser utilizadas en el proceso de elaboración de quesos. Sin embargo, se desconocen sus propiedades bioquímicas, de especificidad y estabilidad. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue purificar y caracterizar bioquímicamente una proteasa termoestable de *S. elaeagnifolium*, así como explorar las propiedades de termoestabilidad de la actividad proteolítica y coagulante de la leche (ACL) en el extracto crudo (EC) de *S. elaeagnifolium*. El EC presentó máxima actividad a pH 10.0 y temperatura de 80 °C. Además, la ACL del EC incrementó en el rango de temperatura de 30 a 85 °C, sin pérdida de actividad a los 85 °C. La actividad proteolítica del EC presentó estabilidad en el rango de pH de 5.0 a 12.0 y, temperaturas menores a 75 °C, reteniendo más del 50 % de actividad después de 5 h de tratamiento térmico a 50, 60 y 65 °C. La actividad proteolítica del EC fue fuertemente inhibida por PMSF, sugiriendo la presencia de proteasas tipo serina. El protocolo de purificación desarrollado permitió concentrar 8.8 veces la enzima proteolítica, con 4.2 % de rendimiento. La proteasa parcialmente purificada de trompillo con masa molecular aparente de 70 kDa fue fuertemente inhibida por PMSF, indicando que corresponde a una serina proteasa (Sela SP1). Sela SP1 mostró actividad proteolítica en un rango amplio de pH y temperatura, con máxima actividad a pH 11.0 y temperatura de 80 °C. El análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) señaló que Sela SP1 tiene una temperatura media de transición  $T_m$  alrededor de 87 °C. Por otro lado, los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$ , utilizando azocaseína como sustrato, fueron 77.8  $\mu\text{M}$  y 2.4  $\mu\text{M/s}$ , respectivamente. El perfil de degradación de sustratos naturales reveló que Sela SP1 posee alta capacidad hidrolítica sobre  $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina así como  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseína. El análisis por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) indicó que Sela SP1 es estructuralmente semejante a proteasas tipo-subtilisina STB de *Solanum pennellii*. Por lo anterior, se concluye que la serina proteasa Sela SP1 (tipo subtilisina) de *S. elaeagnifolium*, reportada por primera vez, posee propiedades de estabilidad térmica atípicas, y características bioquímicas atractivas para su aplicación en procesos biotecnológicos.

**Palabras clave:** *Solanum elaeagnifolium*, serina proteasa, estabilidad térmica, coagulante de leche, Sela SP1.

## ABSTRACT

Proteolytic enzymes represent around 60% of the total enzymes that are currently marketed as catalytic agents for biotechnological applications. Trompillo (*Solanum elaeagnifolium*) berries have been reported to possess proteolytic enzymes with activity at high temperatures and that have potential to be used in cheese making. However, its biochemical properties, specificity, and stability are unknown. Therefore, the main objective of this work was to purify and biochemically characterize a thermostable protease of *S. elaeagnifolium* and explore the thermostability properties of the proteolytic and milk-clotting activity (MCA) of the proteases found in the crude extract (CE) of *S. elaeagnifolium*. The EC presented maximum activity at pH 10.0 and temperature of 80 °C. Furthermore, the MCA increased in the temperature range of 30 at 85 °C, retaining activity at 85 °C. Proteolytic enzymes in crude extract presented stability in pH from 5.0 to 12.0, and temperatures below 75 °C, retaining more than 50 % of its activity at 50, 60, and 65 °C after 5 h of heat treatment. Proteolytic activity (PA) was strongly inhibited by PMS, suggesting the presence of serine-like proteases. The purification protocol developed allowed to concentrate the proteolytic enzyme 8.8 times, with 4.2% yield. The partially purified protease from *S. elaeagnifolium* with an apparent molecular mass of 70 kDa was strongly inhibited by PMSF, indicating that correspond to a serine protease (Sela SP1). Sela SP1 showed PA in a wide range of pH and temperature, with optimal activity condition at pH 11.0 and a maximum at 80 °C. Differential Scanning Calorimetry analysis indicated that Sela SP1 has a mean transition temperature ( $T_m$ ) around 87 °C. On the other hand, using azocasein as the substrate, the kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$  were 77.8  $\mu\text{M}$  and 2.4  $\mu\text{M/s}$ , respectively. The degradation profile of natural substrates revealed that Sela SP1 has a high hydrolytic capacity against  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, and  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$   $\kappa$ -casein. Mass spectrometry in tandem (LC-MS/MS) analysis indicated that Sela SP1 has a structural sequence similar to subtilisin-like proteases STB of *Solanum pennellii*. For all the above, it is concluded that the serine protease Sela SP1 (subtilisin-like) from *S. elaeagnifolium*, here reported for the first time, it is a protease with atypical thermal properties that possess biochemical characteristics that make it attractive for its application in biotechnological processes.

**Keywords:** *Solanum elaeagnifolium*, serine protease, thermal stability, milk-clotting activity, Sela SP1.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas proteolíticas (EP), proteasas o peptidasas, son un grupo de enzimas hidrolíticas que catalizan la escisión del enlace peptídico en polipéptidos y proteínas. Su clasificación bajo criterios estructurales, bioquímicos y relaciones evolutivas las organiza en siete grupos principales, siendo los grupos serina, cisteína, aspártico y metalo proteasas las mejor conocidas y caracterizadas a la fecha (Rawlings, 2020). En plantas, las proteasas desempeñan funciones de regulación de procesos esenciales como germinación, crecimiento y desarrollo, defensa, senescencia, y otras (Roberts *et al.*, 2012). Algunas proteasas de origen vegetal han mostrado poseer actividad y estabilidad en un amplio rango de pH y temperatura, así como amplia especificidad sobre sustratos, siendo atractivo su uso en procesos biotecnológicos. Actualmente, los procesos biotecnológicos demandan enzimas que ejerzan actividad catalítica ante factores externos adversos (*e.g.*, pH, temperatura, fuerza iónica), por lo que la ingeniería de proteínas ha intervenido para introducir mejoras en los biocatalizadores de interés industrial; sin embargo, resulta atractivo que los biocatalizadores cuenten con dichas propiedades en su estructura nativa.

A nivel mundial las proteasas representan el 60% del mercado total de enzimas, siendo la industria de alimentos, farmacéutica y textil las principales áreas de aplicación (Benerjee y Ray, 2017). Los avances tecnológicos y científicos para la purificación y producción de enzimas han incentivado la búsqueda de nuevas fuentes naturales potenciales de proteasas para su caracterización y aplicaciones industriales. Se ha reportado que las bayas de *Solanum elaeagnifolium* (Trompillo), poseen proteasas en alta concentración y se han empleado como agentes coagulantes de la leche para la producción de queso tipo asadero (Chávez-Garay *et al.*, 2016). Además, las proteasas responsables de la actividad coagulante de la leche han mostrado actividad a temperaturas superiores de 80 °C (Bodansky, 1924); sin embargo, hasta el momento sus características enzimáticas, fisicoquímicas y moleculares no han sido abordadas. Previamente, ha sido caracterizada parcialmente una proteasa de semillas de *S. dubium*, la cual posee propiedades catalíticas en un rango amplio de pH (3-12) y temperatura (20-70 °C), además de especificidad sobre enlace peptídico semejante a los preferidos por proteasas de tipo serina (Ahmed *et al.*, 2009). La similitud en las características morfológicas del fruto y actividad proteolítica mostradas en los extractos de ambas especies, así como la relación directa de la familia, podría sugerir que se tratase

de enzimas con características semejantes; sin embargo, la termoestabilidad de las proteasas de *S. elaeagnifolium* podría estar relacionada con algunas características estructurales distintivas que aún se desconocen para cada una de ellas. Por lo anterior, la presente investigación se centra en purificar y caracterizar una proteasa termoestable de *S. elaeagnifolium* con la finalidad de conocer sus propiedades fisicoquímicas y bioquímicas que permitan direccionar futuras investigaciones para su aplicación en procesos biotecnológicos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Generalidades de las Enzimas Proteolíticas

Las peptidasas se clasifican como exo- y endo- peptidasas, en función de la región donde realicen la ruptura del enlace peptídico. Las exopeptidasas actúan específicamente sobre los extremos amino o carboxilo de la cadena polipeptídica, mientras que las endopeptidasas hidrolizan enlaces internos de las proteínas (Rawlings, 2020).

De acuerdo con la base de datos MEROPS, las enzimas proteolíticas se clasifican bajo criterios estructurales y relaciones evolutivas. Las peptidasas se clasifican en cuatro subgrupos, en función de su mecanismo catalítico: serina proteasas (EC 3.4.21), cisteína proteasas (EC 3.4.22), aspártico proteasas (EC 3.4.23) y metaloproteasas (EC 3.4.24), en las cuales los residuos Ser, Cys, Asp y cofactores metálicos (*e.g.*,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ) en posiciones específicas respectivamente, dotan de actividad catalítica al sitio activo (Rao *et al.*, 1998; Mazorra-Manzano *et al.*, 2018).

#### 2.1.1. Serina Proteasas

Este grupo de enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en todos los reinos de vida celular, incluso en virus se encuentran formando parte de su información genética. Las serina proteasas (SPs, EC 3.4.21) son una clase de enzimas que se caracterizan por poseer la triada Asp, His y Ser en el sitio catalítico (Kraut, 1977; Almonte y Sweatt, 2011). Su actividad catalítica se desarrolla a través del ataque nucleofílico de serina sobre el grupo carbonilo del enlace peptídico objetivo (Antão y Malcata, 2005). Generalmente, este grupo de enzimas se pueden clasificar como endopeptidasas y exopeptidasas (Di Cera, 2009) Actualmente, la base de datos MEROPS agrupa a las serina proteasas dentro de 54 familias y 22 subfamilias, de acuerdo con el ancestro común piruvato. Las SPs se sintetizan comúnmente como zimógenos inactivos y se activan mediante escisión proteolítica de una región peptídica particular (Gao *et al.*, 2019). Comúnmente, las SPs

son activas a pH neutro y alcalino y, sus puntos isoeléctricos oscilan entre 4 y 6 (Pratush *et al.*, 2013). A modo de consenso las Ser proteasas se clasifican como proteasas tipo subtilisina, tripsina, prolil oligopeptidasa y ClpP peptidasa, las cuales comparten el mismo mecanismo catalítico mediado por la triada catalítica Asp-His-Ser. No obstante, se tiene registro de proteasas tipo serina en las que se sustituyen los aminoácidos Asp e His por residuos que establecen interacción directa con Ser para ejercer la catálisis (Di Cera, 2009). De los cuatro grupos antes mencionados, las proteasas tipo-tripsina (S1) son los mejor conocidos a la fecha representando el grupo con mayor presencia en mamíferos. Estructuralmente, las SPs se caracterizan por presentar una región de pliegue de dos estructuras semejantes denominadas  $\beta$ -barriles, estructuras sobre la cuales se aloja la triada catalítica. Esta región conservada confiere especificidad hacia los aminoácidos Lys o Arg del sustrato (Page y Di Cera, 2008; Di Cera, 2009). Por otro lado, las serina proteasas tipo subtilisina se caracterizan por poseer un pliegue constituido por una hoja  $\beta$  de siete hebras rodeada por nueve  $\alpha$  hélices, zona en la cual se distribuyen los aminoácidos constituyentes de la triada catalítica His-Asp-Ser. Dicha estructura permite que este tipo de proteasas tengan la capacidad de unir una región de hasta nueve residuos de aminoácidos del sustrato (Graycar *et al.*, 2013). Las serina proteasas tipo subtilisina y tipo tripsina son estructuralmente diferentes, pero comparten un mismo mecanismo catalítico.

### **2.1.2. Cisteína Proteasas**

Las proteasas tipo cisteína (CPs, EC 3.4.22), también llamadas tiol proteasas, son un grupo de enzimas que se caracterizan por la presencia de la triada catalítica de aminoácidos Cys, His y Asp en su sitio activo (Siklos *et al.*, 2015). Las catepsinas y papaína representan las familias más abundantes de este tipo de proteasas ampliamente distribuidos en organismos procariontes y eucariontes (González-Rábade *et al.*, 2011; Verna *et al.*, 2016). Algunas de las CPs de origen microbiano mejor caracterizadas son clostripaina (*Clostridium histolyticum*) y gingipaína (*Porphyromonas gingivalis*), provenientes de hongos como catepsina B (*Aspergillus flavus*) y de origen vegetal como papaína (Papaya, *Carica papaya*), ficina (Higo, *Ficus glabrata*), bromelina (Piña, *Ananas comosus*) y actinidina (Kiwi, *Actinidia chinensis*) (Grzanka *et al.*, 2001). La síntesis

de este tipo de enzimas se realiza generalmente como precursores inactivos (zimógeno). La activación zimógena se puede realizar por autoactivación, activación trans o ambas. La autólisis procede bajo influencia de cambios de pH (pH ácido), mientras que la activación trans implica la eliminación de una región peptídica por acción de otra enzima (Verna *et al.*, 2016). Las CPs adquieren su actividad catalítica en presencia de agentes reductores como ácido cianhídrico (HCN) o cisteína (Gurumallesh *et al.*, 2019).

### **2.1.3. Aspártico Proteasas**

Las aspártico proteasas (APs) son endopeptidasas que poseen dos residuos de aspartato (Asp32 y Asp215) en el sitio activo, unidos a una molécula de agua que actúa como nucleófilo (Mandujano-González *et al.*, 2016). En la base de datos MEROPS, las APs se clasifican en el clan A1, dentro del cual se ubican 14 familias de APs (Horimoto *et al.*, 2009). Este grupo de enzimas se caracterizan por presentar mayor actividad y estabilidad a pH ácido (pH 3 a 4) y muestran especificidad preferencial para la escisión en enlaces peptídicos entre residuos de aminoácidos hidrófobos, usualmente fenilalanina (Shah *et al.*, 2014; Mamo y Assefa, 2018).

Las proteasas aspárticas se han clasificado en tres familias: A1 se relaciona directamente con pepsina, A2 con retropepsina, mientras que la familia A3, muestran una relación estrecha con enzimas de pararetrovirus (Dash *et al.*, 2003). Este tipo de enzimas exhibe diversas actividades dentro de cada organismo. En los mamíferos su actividad se encuentra estrechamente relacionada con la digestión de nutrientes (quimosina, pepsina A), en plantas participan como mecanismos de defensa ante patógenos (candidapepsinas) y en la interacción de polen y pistilo (Cardosina A), mientras que en los virus llevan a cabo la activación de enzimas zimógenos necesarias para su replicación (retropesina) (Claverie y Vega, 2007).

### **2.1.4. Metaloproteasas**

Las metaloproteasas (MPs, EC 3.4.24) son enzimas que requieren de iones metálicos divalentes

( $Zn^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ , o  $Mn^{+2}$ ) posicionados en el sitio activo para ser catalíticamente reactivas (Mamo y Assefa, 2018). A diferencia de las SPs, CPs y APS, las metaloproteasas catalizan la hidrólisis del enlace peptídico objetivo mediante un ataque nucleofílico sobre el grupo carbonilo, acción mediada por una molécula de agua (Nagase, 2001). Por otro lado, las metaloproteasas suelen presentar máxima actividad a pH neutro (Philipps-Wiemann, 2018). Actualmente, las metaloproteasas se clasifican en 72 familias (M1-M99), las cuales pueden presentar capacidad de escindir específicamente enlaces internos, externos y/o ambas propiedades sobre el sustrato. Las familias de las metaloproteasas a su vez se agrupan en clanes, en función del aminoácido que establece sinergia con el ion metálico necesario para su actividad catalítica (Rao *et al.*, 1998).

En la actualidad, la base de datos MEROPS agrupa a las metaloproteasas en 16 clanes. Siendo el clan MA el más representativo de las metaloproteasas, al contar con 47 familias dentro su clasificación. El clan MA se caracteriza por poseer un motivo de unión a zinc, HEXXH ( $X_n$ ) E, donde X representa a cualquiera de los 20 aminoácidos constituyentes de las proteínas y, el subíndice n señala una secuencia no definida de al menos 14 residuos de aminoácidos (Nagase, 2001). Las proteasas termolisina y peptidil-dipeptidasa A, son algunos de los ejemplos de metaloproteasas afines a zinc con el motivo conservado de HEXXH ( $X_n$ ) que han sido ampliamente estudiadas (Nagase, 2001).

## 2.2. Rol Biológico de las Fitoproteasas

En el crecimiento y desarrollo de todos los organismos se establece un equilibrio entre la síntesis y proteólisis. En las plantas, las proteasas se localizan en la mayoría de los compartimentos celulares (*e.g.*, cloroplastos, mitocondria, aparato de Golgi), como estrategia para la regulación de procesos biológicos esenciales para la vida vegetal. La degradación de proteínas es esencial en varios aspectos durante el crecimiento y desarrollo especializado de tejidos, órganos u organelos, mecanismos de defensa, senescencia y en el proceso de muerte celular programada, y para ello se requiere la participación de enzimas proteolíticas (Kohli *et al.*, 2012; Salas *et al.*, 2018).

Durante las etapas iniciales de la germinación de las semillas, las enzimas proteolíticas son necesarias para hidrolizar proteínas de reserva a fin de suministrar energía hasta que la planta

adquiera su capacidad autótrofa (Diaz-Mendoza *et al.*, 2019). Actualmente, se tiene conocimiento que las cisteína proteasas de la familia tipo papaína, legúmina y subtilisina (S8) desempeñan un papel importante en la hidrólisis de proteínas de almacenamiento en semillas de cereales y en la maduración de proteínas (Szewińska *et al.*, 2016; Diaz-Mendoza *et al.*, 2019). Por otro lado, las APs de plantas carnívoras de diferentes géneros, hacen uso de un sistema líquido de digestión para obtener nitrógeno a partir de sus presas (principalmente insectos). El líquido de digestión está constituido por APs, amilasas, lipasas, fosfatasas, entre otras. Hasta el momento, han sido purificadas y caracterizadas las aspártico proteasas nepentesina I y II del fluido de la jarra (pichel) de *Nepenthes distillatoria* (Takahashi *et al.*, 2005). Las proteasas de tipo cisteína y aspártica muestran tener mayor presencia en los diferentes fluidos secretados por las plantas carnívoras.

Por otro lado, las plantas se encuentran inmersas en diversos hábitats, siendo susceptibles a invasiones por microorganismos patógenos o insectos que deterioran su crecimiento y reproducción. A través de diversas investigaciones se ha puesto en evidencia la participación de cisteína proteasas pertenecientes a la familia de la papaína (CPs tipo papaína) en procesos clave en diferentes niveles de defensa de las plantas (Misas-Villamil *et al.*, 2016). Del mismo modo, las endopeptidasas PR7 (proteínas relacionadas con la patogénesis) están involucradas en los mecanismos de defensa ante fitopatógenos, catalizando la degradación de los componentes estructurales en las paredes celulares del patógeno (Ekchaweng *et al.*, 2017).

Otro de los mecanismos por los cuales las plantas se defienden ante fitopatógenos, es por medio de la secreción de fluidos lechosos, comúnmente llamado látex. Este fluido se constituye principalmente por compuesto fenólicos, lípidos, carbohidratos y enzimas (Ramos *et al.*, 2019). El látex producido por *Carica papaya* L. ha sido el más estudiado por la comunidad científica, reportando que el 30% de su composición está representada por proteasas de tipo cisteína (Moussaoui *et al.*, 2001). Además, las proteasas presentes en el látex de *Ficus carica* L, *Calotropis procera* y *Euphorbia peplus* L., han mostrado tener actividad proteolítica que contribuye a la defensa contra patógenos (Kim *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2010; Hou *et al.*, 2018). De igual manera, Mendieta y col. (2006) hallaron que las proteasas aspárticas StAP1 y StAP3 de papa (*Solanum tuberosum*), aisladas del tubérculo y de hojas respectivamente, poseen actividad antimicrobiana ante *Fusarium solani* y *Phytophthora infestans*, al causar daño directo sobre las membranas de las esporas e hifas de ambos patógenos.

Funcionalmente, la senescencia es un proceso de reciclaje, en el cual las moléculas que constituyen

tejidos/ órganos senescentes son reutilizados para la biosíntesis de nuevas moléculas necesarias para el metabolismo de las plantas. La proteólisis asociada a la degradación de proteínas permite la recuperación de nitrógeno (N), molécula esencial para el recambio de proteínas. Roberts y col. (2012) muestran que las proteasas de tipo cisteína, treonina, serina, aspárticas, y metaloproteasas tienen una amplia participación en el proceso de senescencia.

En *Arabidopsis thaliana* se ha identificado a SAG12 como uno de los genes asociados a la senescencia. Dicho gen codifica a una cisteína proteasa similar a papaína que regula la senescencia de las hojas, encontrándose, su mayor actividad proteolítica particularmente en la vacuola (Otegui *et al.*, 2005). Por otro lado, la metaloproteasa FtsH6 cataliza la degradación del fotosistema II (complejo de captación de luz) en *A. thaliana*, durante el proceso de senescencia inducido a alta exposición de luz (Zelisko *et al.*, 2005). Mientras que Kato y col. (2004) identificaron la actividad proteolítica de la proteasa aspártica CNDA1 involucrada en la degradación de Rubisco (ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa-oxigenasa) y en la translocación de nitrógeno durante la senescencia de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L). Lo anterior sustenta que el proceso de senescencia involucra una serie de cambios enzimáticos y metabólicos simultáneos o secuenciales en los diferentes tejidos que envejecen (Dangl *et al.*, 2000).

En cuanto a la muerte celular programada (MCP), su proceso inicia con una cascada proteolítica intracelular como parte del crecimiento y desarrollo normales, aunque también puede ser activada en respuesta a factores bióticos y abióticos (Beers, 1997; Rocha *et al.*, 2017). El conocimiento de la regulación de la MCP en plantas aún es limitado; no obstante, se han identificado metacaspasas y enzimas de procesamiento vacuolar (EPV) (cisteína proteasas) que exhiben propiedades enzimáticas similares a las caspasas 1. Estudios realizados en *A. thaliana* han puesto en evidencia que tras la infección por patógenos el fenotipo de muerte celular descontrolada está bajo acción de metacaspasa 1 (AtMC1) (Salguero-Linares y Coll, 2019).

### 2.3. Aplicaciones Biotecnológicas de Fitoproteasas

Como se ha mencionado, las proteasas se encuentran distribuidas ampliamente en la naturaleza, siendo las fuentes animal, vegetal y microbiana las más importantes. Algunas proteasas poseen una

importante aplicación en procesos industriales en los cuales se requiere la modificación parcial o completa de la estructura primaria de las proteínas, teniendo como finalidad mejorar su funcionalidad, aumentar su valor nutricional y mejorar sus propiedades quimiosensoriales (sabor, olor y textura). Hasta el día de hoy, las proteasas de origen vegetal son objeto de estudio debido a su alta estabilidad y actividad en un rango amplio de temperatura y pH, así como amplia especificidad de sustratos, mostrando un alto potencial de aplicación en procesos industriales (Feijoo-Siota y Villa, 2011; Mahajan *et al.*, 2015). A nivel mundial, las proteasas representan el 60 % del mercado total de enzimas industriales, con ganancias económicas anuales que oscilan entre 1.5 y 1.8 mil millones de dólares (Banerjee y Ray, 2017; Ward, 2011). Las proteasas de tipo cisteína, serina y aspártica son utilizadas con mayor frecuencia en la industria de alimentos, farmacéutica, textil, detergentes, entre otros (Feijoo-Siota y Villa, 2011).

### **2.3.1. Ablandadores Enzimáticos de Carne**

Dado que la terneza de la carne es una de las características sensoriales de gran importancia comercial, la industria cárnica ha empleado métodos físicos, químicos, mecánicos y enzimáticos a fin de ejercer un efecto benéfico sobre la palatabilidad, jugosidad y sabor de la carne (Woinue *et al.*, 2019). El proceso de ablandamiento enzimático (mediante el uso de proteasas) de la carne posterior al sacrificio, procede a través de la degradación parcial de las proteínas del tejido conectivo (colágeno y elastina) y de la estructura miofibrilar (actina y miosina) (Barekat y Soltanizadeh, 2017; Tantamacharik *et al.*, 2018).

En la industria alimentaria, las fitoproteasas papaína (EC 3.4.22.2), bromelina (EC 3.4.22.32) y ficina (EC 3.4.22.3) de tipo cisteína, han sido investigadas ampliamente como ablandadores enzimáticos. Sin embargo, papaína presenta una alta actividad proteolítica sobre las proteínas del tejido conectivo, por lo cual su uso se limita a concentraciones bajas a fin de evitar una hidrólisis excesiva que comprometa la calidad del producto final. Otras proteasas presentes en frutos de Kachri (*Cucumis trigonus* Roxb), en rizoma de jengibre (*Zingiber officinale* roscoe rizoma) y kiwi (*Actinidia deliciosa*), representan una alternativa como ablandadores enzimáticos. Recientemente Ahmad y col. (2020) plantearon el uso del extracto de raíz de *Manihot esculenta* como una nueva

fuentes de proteasas con potencial aplicación en el área cárnica. La combinación de extracto de jengibre y papaína en polvo durante la formulación de carne para hamburguesa mostró una mejora en las propiedades fisicoquímicas y sensoriales del producto (Abdel-Naeem y Mohamed, 2016). Esto indica que la combinación de diferentes fitoproteasas podría ofrecer ventajas en el ablandamiento de la carne en comparación si se aplica de forma individual.

### **2.3.2. Coagulante de la Leche**

En la manufactura de quesos, la coagulación de la leche por vía enzimática ha sido utilizada tradicionalmente a lo largo de los años. Quimosina (EC34.23.3) es una aspártica proteasa de origen animal presente en el estómago de terneros y comercializada como cuajo (preparación enzimática comercial) ampliamente utilizada para la coagulación de la leche. Su acción catalítica es específica sobre el enlace peptídico Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> de la  $\kappa$ -caseína. Hasta el día de hoy, el cuajo de ternera sigue siendo el coagulante de la leche más eficiente en la producción de quesos. Sin embargo, la demanda constante de quesos a nivel mundial, factores religiosos y culturales (*e.g.*, Islam y Judaísmo), aumento en el precio del cuajo y así como su baja actividad sobre la leche de otros mamíferos (*e.g.*, cabra, oveja y camello), ha incentivado la búsqueda de nuevas fuentes alternativas como sustitutos del cuajo animal (Dekker, 2019). Actualmente, la quimosina producida por métodos recombinantes, conocida como quimosina producida por fermentación (FPC, por sus siglas en inglés) representa el 80 % del cuajo comercializado a nivel mundial para la producción de quesos (Wei *et al.*, 2016). Sin embargo, proteasas de otras fuentes naturales como las obtenidas de plantas han despertado el interés de la comunidad científica para su estudio y aplicaciones, debido a la disponibilidad inmediata de diferentes tejidos, órganos o secreciones de las plantas (*e.g.*, látex) ricos en proteasas, procesos de purificación eficientes y por el aislamiento de coagulantes naturales que sirvan como sustitutos del cuajo animal o recombinante. El extracto de *C. carduncus* ha sido ampliamente utilizado como coagulante de la leche en la producción de quesos artesanales (*e.g.*, Torta del Casar), los cuales han recibido gran aceptación debido a las características atractivas de textura y sabor en los quesos que se elaboran. Actualmente, se conoce que las APs cardosinas y ciprocinas son los principales agentes responsables de la actividad

proteolítica de los extractos de *C. carduncus*. Dentro del grupo de las cardosinas, cardosina A y cardosina B muestran poseer especificidad de acción similar a la que presenta quimosina y pepsina sobre k-caseína, respectivamente. Siendo cardosina A más específica que cardosina B, además de que presenta una menor actividad proteolítica respecto a cardosina B (Veríssimo *et al.*, 1995). Se ha propuesto que las propiedades de actividad antes mencionadas podrían ser la razón por la cual se presentan las notas ligeras de sabor amargo y picante, propias de los quesos elaborados con este medio enzimático (Agboola *et al.*, 2004).

Por otro lado, las proteasas de tipo serina reliogésina B (*Ficus religiosa*), Dubiumin (*Solanum dubium*), Streblin (*Streblus asper*), muestran capacidad coagulante de la leche (Ahmed *et al.*, 2009; Tripathi *et al.*, 2011; Kumari *et al.*, 2012). Recientes investigaciones han propuesto a las de flores de *Citrus aurantium* L. (Mazorra-Manzano *et al.*, 2013), fruto de *Bromelia pinguin* (Moreno-Hernández *et al.*, 2017), semillas de girasol (*Helianthus annuus*) (Nasr *et al.*, 2016) y fruto de *Morinda citrifolia* L. (de Farias *et al.*, 2020) como nuevas fuentes potenciales de enzimas coagulantes de la leche. Así mismo, Tito y col. (2020) también proponen a dos proteasas aspárticas (StAP1 y StAP3) de papa (*Solanum tuberosum*) como una fuente alternativa de enzimas proteolíticas coagulantes de la leche.

El arduo trabajo que realizan diferentes grupos de investigación sobre búsqueda, aislamiento, purificación y caracterización de fitoproteasas con enfoque al sector lácteo, pone de manifiesto que la fuente vegetal representa una alternativa atractiva de proteasas con propiedades de actividad específicas que, a su vez abren un nicho de mercado para la producción de quesos con nuevos atributos sensoriales.

### **2.3.3. Producción de Hidrolizados de Proteínas y Péptidos Bioactivos**

Cada proteína posee propiedades nutricionales, fisicoquímicas y funcionales diferentes que pueden tener un aprovechamiento en la industria de alimentos. Sin embargo, en algunas ocasiones el uso íntegro de las proteínas se ve limitado debido a una baja calidad nutricional, insolubilidad, alergenicidad, entre otros (Tavano, 2013). La hidrólisis de proteínas con proteasas específicas ha sido el método ampliamente utilizado para modificar la estructura primaria de las proteínas,

logrando así, atribuir una mejora de sus propiedades nutricionales funcionales y bioactivas. La especificidad de la enzima utilizada y el grado de hidrólisis son factores que determinan las propiedades de los hidrolizados proteicos (Ellis, 2019).

El uso de proteasas de origen vegetal para la producción de hidrolizados de proteínas con aplicación funcional, ha sido estudiado principalmente sobre proteínas de origen animal y vegetal. Noman y col. (2018) evaluaron las propiedades funcionales de los hidrolizados de proteína de músculo de esturión chino (*Acipenser sinensis*) producidos con papaína, destacando una mejora en solubilidad, estabilidad de emulsiones, y capacidad de formación de espuma. Mientras que, tras los hidrolisis de desechos de proteína de pescado *Nemipterus japonicus* con papaína y bromelina, incrementó la solubilidad de la proteína en un rango amplio de pH, pero disminuyó su capacidad emulsificante y espumante (en función del grado de hidrólisis) (Gahanan *et al.*, 2016). Por otro lado, los hidrolizados de proteína de soya mediante la digestión con bromelina mostraron aumento de solubilidad, capacidad de formación de espuma y una disminución en la dureza de los geles de proteína de soya (Ortiz y Wagner, 2002; Lamsal *et al.*, 2007).

Generalmente, las proteasas de origen vegetal presentan alta actividad proteolítica (bajo condiciones de pH y temperatura apropiadas), tras la cual pueden generar fragmentos peptídicos de diferente tamaño. Durante el proceso de hidrólisis, también es posible producir péptidos con actividad biológica. Generalmente, los fragmentos con secuencias menores a 20 residuos de aminoácidos suelen presentar bioactividad (Chew *et al.*, 2019). Los péptidos bioactivos pueden contribuir como coadyuvantes en la prevención o modulación de desórdenes metabólicos como diabetes, cáncer, enfermedad coronaria, hipertensión, entre otros. Mazorra-Manzano y col. (2018) muestrearon que las proteasas de origen vegetal más utilizadas para la producción de péptidos bioactivos (a partir de diferentes proteínas alimentarias) son papaína, bromelina y ficina, mientras que actinidina, zingibaina, cardosina y pomiferina representan nuevas alternativas para la producción de péptidos bioactivos. Se ha evidenciado que péptidos resultantes de la hidrolisis por fitoproteasas poseen efectos antioxidantes, antihipertensivos, inmunomoduladores y antiinflamatorios. La obtención de péptidos bioactivos encriptados en cada fuente de proteína demanda enzimas con actividad catalítica específica para liberarlos de manera íntegra y más eficiente. Por lo general, las proteasas de origen vegetal poseen afinidad hacia varios sustratos, lo cual es de gran importancia ya que permite su aplicación ante diferentes matrices proteicas. Por tanto, el uso de fitoproteasas representa una opción atractiva para la producción de péptidos con bioactividad mediante la hidrólisis de proteínas nuevas o convencionales.

#### **2.3.4. Formulación de Detergentes**

La industria de los detergentes es otra de las áreas de aplicación que tienen las enzimas proteolíticas, siendo utilizadas principalmente como aditivos en la matriz de los detergentes para ropa, debido a las ventajas de su naturaleza biodegradable y el alza de la relación rendimiento/costo (Espósito *et al.*, 2009). Proteasas alcalinas de origen bacteriano, principalmente del género *Bacillus* y *Aspergillus*, actualmente se utilizan en la formulación de detergentes debido a sus propiedades de actividad y estabilidad a condiciones de pH alcalino. Sin embargo, el rendimiento de su producción es dependiente de la optimización de los medios y parámetros de cultivo (Niyonzima y More, 2015; Gupta *et al.*, 2002) lo cual puede conllevar a incrementar los costos de producción. Las plantas han sido consideradas como una fuente de proteasas con potencial aplicación en la industria de detergentes debido a que poseen actividad en un rango amplio de pH y temperatura, además de su amplia especificidad sobre sustratos. La proteasa alcalina araujiana (*Araujia hortorum* Fourn.) exhibe compatibilidad con detergentes comerciales, estabilidad en un rango amplio de temperatura (25-70°C), así como estabilidad en pH alcalino (7.5-9.5), características que postulan a dicha enzima como un buen aditivo para detergentes de ropa (Barberis *et al.*, 2013). Recientemente Bersi y col. (2018) evaluaron la actividad de una proteasa cisteína de la fruta de *Bromelia antiachanta* Bertol como aditivo en la formulación de detergentes de ropa, mostrando estabilidad en detergentes comerciales, capacidad de eliminación de manchas en telas en un período de tiempo corto, así como actividad y estabilidad en un rango amplio de pH alcalino (5- 9) y temperatura (25-60 °C). Los estudios de fitoproteasas como aditivos en detergentes aún son escasos, por lo que se requieren más estudios que contribuyan a posicionar a las plantas como una fuente potencial en la industria de detergentes.

#### **2.3.5. Proteasas como Auxiliares Digestivos**

Las propiedades de actividad enzimática en un amplio rango de pH y el amplio espectro de especificidad de sustrato que poseen las proteasas aisladas de origen vegetal han resultado ser de

interés para su uso como coadyuvantes en el tratamiento de afecciones digestivas del ser humano (Balakireva *et al.*, 2019). De acuerdo con Salas y col. (2018) la colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y enfermedad inflamatoria intestinal, son, hasta el momento, los principales trastornos digestivos sobre los cuales se ha evaluado la efectividad de las proteasas papaína y bromelina en sistemas modelos *in vitro* e *in vivo*. En este mismo tenor, las proteasas emergentes zingibaina y actinidina presentes en jengibre (*Zingiber officinale*) y kiwi (*Actinidia deliciosa*), respectivamente, han sido señaladas como buenos candidatos para el tratamiento de malestares gastrointestinales (Hu *et al.*, 2011; Bayer *et al.*, 2017; Wallace *et al.*, 2017). El rol de fitoproteasas en el área médica señala el enorme potencial de crecimiento del mercado de proteasas provenientes de fuentes vegetales. Actualmente, preparaciones enzimáticas de bromelina y papaína son ofertadas como suplemento nutracéutico digestivo por diferentes compañías del creciente mercado de productos nutracéuticos.

#### 2.4. Estabilidad Térmica de Enzimas

Actualmente, los procesos biotecnológicos demandan enzimas que ejerzan actividad catalítica ante factores externos adversos (*e.g.*, pH, temperatura, fuerza iónica), dado que en algunas ocasiones el uso de enzimas nativas bajo condiciones industriales se ve limitado debido a una baja actividad y eficiencia catalítica, así como a la pérdida de estabilidad. Sin embargo, hasta el momento la gama de enzimas disponibles en el mercado con dichas características de estabilidad se limita a unas cuantas. De acuerdo con los criterios más importantes a considerar para la incorporación de enzimas en algún proceso industrial, la estabilidad a altas temperaturas resulta ser uno de los factores decisivos para su elección, debido a que generalmente ocurre una pérdida de actividad durante el procesamiento y se reduce su posibilidad de almacenamiento prolongado.

De acuerdo con los diferentes trabajos de investigación con enfoques teóricos y prácticos sobre la estabilidad conformacional de proteínas ante condiciones de temperatura elevadas, ha sido posible establecer un consenso de características estructurales que, en suma, contribuyen a la estabilidad térmica de las enzimas. Algunos de los factores importantes están relacionados con el establecimiento de enlaces salinos, composición de aminoácidos (hidrofóbicos y con carga),

glicosilación, reducción del área superficial hidrofóbica disponible, abundancia de enlaces disulfuro, entre otros (Sinha y Khare, 2013; Wang *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014). A través de estos hallazgos, la ingeniería de proteínas se ha centrado en el diseño dirigido, racional o semiracional para mejorar la actividad catalítica y aumentar la estabilidad térmica de proteínas acorde a los requerimientos específicos de cada proceso industrial (Rigoldi *et al.*, 2018). No obstante, a pesar de que esta herramienta ha resuelto parte del problema de la actividad y estabilidad de proteínas ante condiciones ambientales adversas, el alcance de estos resultados puede ser limitado por el incremento en el costo que implica su producción. Por lo anterior, resulta atractivo que enzimas provenientes de fuentes naturales sean activas y estables en condiciones adversas. Hoy en día, se conoce que a partir de arqueas, hongos y bacterias termófilos se han aislado proteasas con propiedades de actividad y estabilidad a altas temperaturas (mayor a 60 °C) y que son atractivas para su uso en procesos biotecnológicos que implican tratamientos térmicos o condiciones adversas (*e.g.* curtido de pieles, ablandamiento enzimático de carne, formulación de detergentes) (Sinha y Khare, 2013). Por otro lado, también se cuenta con amplia información sobre proteasas de origen vegetal con estabilidad térmica a altas temperaturas. No obstante, hasta el momento no se ha determinado con precisión la temperatura de desnaturalización para la mayoría de ellas, así como los factores estructurales que contribuyen a su termoestabilidad. En este sentido, la evaluación de condiciones de actividad y la medición de parámetros termodinámicos como la temperatura media de fusión ( $T_m$ ) y cambios entálpicos ( $\Delta H$ ) podrían contribuir al entendimiento de la relación estructura-función de las enzimas tanto para abordar descripciones teóricas, así como para el direccionamiento de sus aplicaciones industriales (Dubey y Jagannadham, 2003).

## 2.5. *Solanum elaeagnifolium* Como Nueva Fuente de Enzimas Proteolíticas

*Solanum elaeagnifolium* o también conocido como Trompillo, es una especie perteneciente a la familia de la solanaceae. *S. elaeagnifolium* es una maleza de hoja ancha y perenne leñosa distribuida en el noroeste de México y suroeste de EE. UU, Argentina, Paraguay, entre otros países (Knapp *et al.*, 2017). Mide aproximadamente entre 0.5 y 1 m de altura cubierto por pequeños pelos de apariencia blanquecina, además de poseer frutos verdes esféricos (10-15 mm de diámetro) y

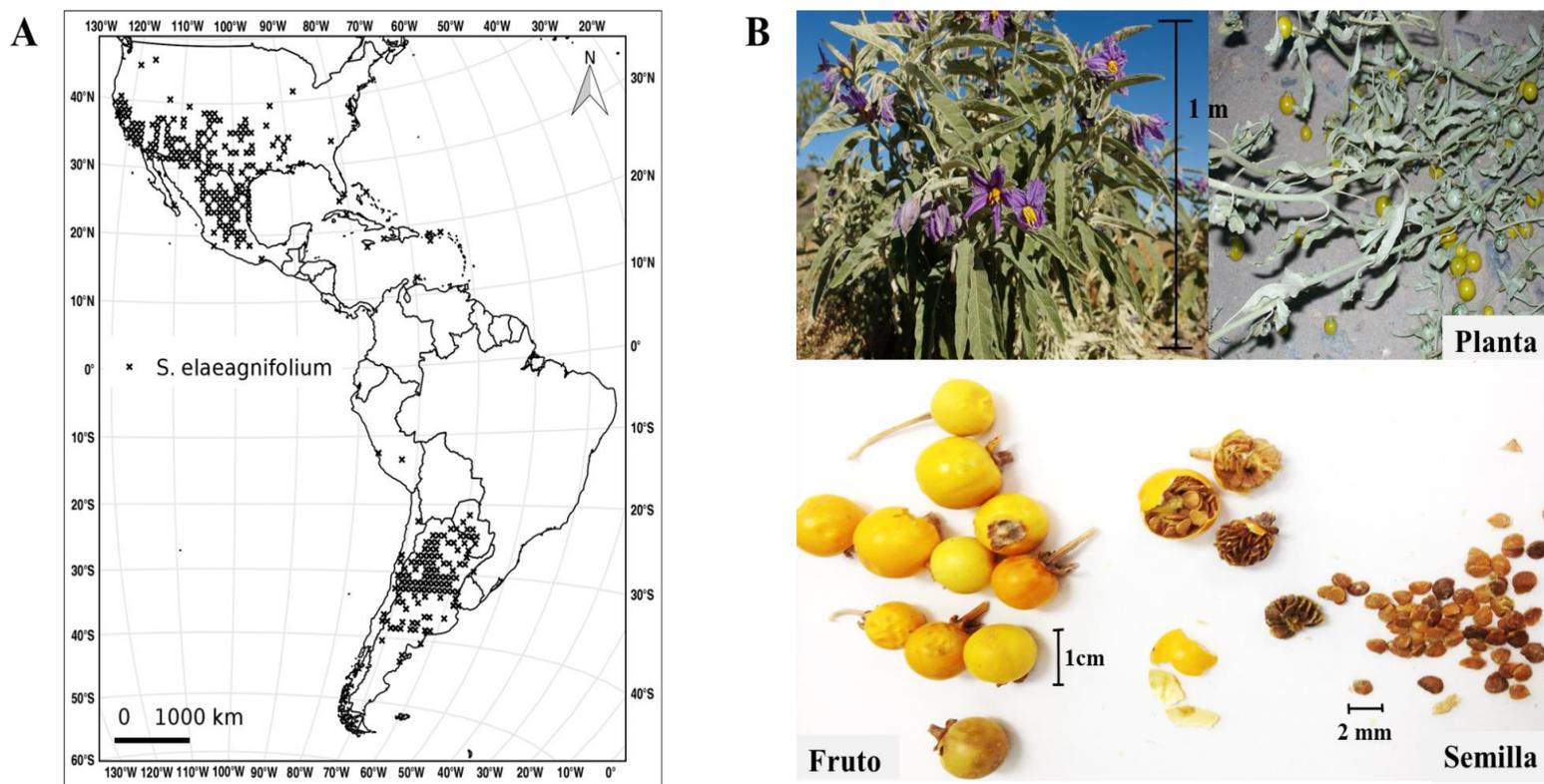
carnosos. En su etapa de madurez (secos por completo) los frutos adquieren una coloración amarillo-naranja (**Figura 1**) (Scaldaferro *et al.*, 2012). Cada fruto posee en su interior entre 60 y 120 semillas (lisas, planas y de color marrón) de 2-3 mm de diámetro (EPPO, 2007). Esta especie ha mostrado poseer capacidad de adaptación en regiones semiáridas y suelos arenosos. Dentro de sus estrategias reproductivas, el trompillo promueve su propagación a través de semillas, rizomas rastreros y fragmentos de raíces (Scaldaferro *et al.*, 2012). En algunas ocasiones, cuando *S. elaeagnifolium* se propaga de manera descontrolada (bajo condiciones abióticas favorables), puede generar impactos negativos en la agricultura, conduciendo a una pérdida del rendimiento de producción. No obstante, se ha puesto en evidencia que extractos generados a partir de semillas y hojas de *S. elaeagnifolium*, poseen actividad insecticida y plaguicida, lo cual representa una alternativa segura para el control de plagas (Hamouda *et al.*, 2015; Balah y Abdel-Razek, 2020). Además, recientemente Mazorra-Manzano y col. (2020) evaluaron la actividad proteolítica de un extracto de fruto de *S. elaeagnifolium* para la producción de péptidos bioactivos, mostrando una mayor efectividad que otras proteasas vegetales para hidrolizar proteínas del lactosuero (*e.g.*,  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina).

Por otro lado, las bayas de *Solanum dubium* y *Solanum incanum* se han utilizado como coagulantes de la leche para la producción de algunas variedades de quesos tipo crema en Sudan y Ab'ala (Etiopía) (Guiama *et al.*, 2010; Desta *et al.*, 2020); mientras que, en algunas regiones del norte de México, las bayas de *S. elaeagnifolium* se han utilizado para la producción de queso tipo asadero, mostrando el potencial que representan las proteasas de este fruto en la industria láctea (Bodansky, 1924; Chávez-Garay *et al.*, 2016).

Actualmente, se conoce que las semillas de *S. dubium* poseen una serina proteasa glicosilada nombrada Dubiumina (66 kDa), con actividad catalítica en un rango amplio de pH (entre 3 y 12) y temperatura (de 30 a 70 °C) (Ahmed *et al.*, 2009). Dichas características la convierten en una enzima atractiva para su uso en bioprocesos. Por otro lado, el fruto de trompillo *S. elaeagnifolium* muestra poseer proteasas con actividad coagulante de la leche a temperaturas superiores a 80 °C (Bodansky, 1924), propiedad atípica entre las proteasas de origen vegetal. Sin embargo, las características enzimáticas, moleculares y fisicoquímicas de las proteasas de trompillo no han sido exploradas. Actualmente, solo se han reportado perfiles electroforéticos proteicos SDS-PAGE de extracto y fracciones parcialmente purificadas de Trompillo (Chávez-Garay *et al.*, 2015; Gutierrez-Mendez *et al.*, 2019); la presencia de diversas bandas proteicas (de 8 a 10 bandas) y la ausencia de

trabajos de purificación concretos no han permitido la identificación y determinación de las características moleculares de alguna de las proteasas relacionada con la actividad proteolítica del EC.

Las características morfológicas semejantes que presentan los frutos de *S. elaeagnifolium* y de *S. dubium*, así como su estrecha relación dentro del género, sugieren que las proteasas de ambos frutos podrían poseer características estructurales semejantes, a pesar de las diferencias de actividad en función de la temperatura que preliminarmente se han reportado para las proteasas de ambas fuentes. Por lo anterior, debe existir alguna característica estructural distintiva, aún desconocida, que le confiere mayor estabilidad térmica a las proteasas presentes en el fruto de *S. elaeagnifolium*. En este sentido, la presente investigación se centra en purificar y caracterizar una proteasa termoestable de *S. elaeagnifolium*, con la finalidad de conocer sus propiedades fisicoquímicas y bioquímicas que contribuyan a direccionar sus posibles aplicaciones biotecnológicas.



**Figura 1.** Mapa de distribución de *Solanum elaeagnifolium* en el continente americano (A) y sus características morfológicas de la planta, fruto y semilla (B).

Mapa tomado de Knapp y col. (2017). La imagen de la planta de *S. elaeagnifolium* en floración fue adquirida del portal SEINet (<https://swbiodiversity.org/seinet/>). Las imágenes de la planta con frutos, morfología del fruto y sus semillas son fuente propia.

### **3. HIPÓTESIS**

La proteasa aislada de *Solanum elaeagnifolium* posee termoestabilidad atípica y propiedades bioquímicas atractivas para su aplicación en procesos biotecnológicos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Purificar y caracterizar fisicoquímica y bioquímicamente una proteasa termoestable de *S. elaeagnifolium* que contribuyan a perfilar su potencial biotecnológico

### 4.2. Objetivos Específicos

- Evaluar las propiedades de estabilidad fisicoquímica (pH y temperatura) e inactivación térmica de las proteasas con actividad coagulante de la leche del extracto crudo de *Solanum elaeagnifolium*.
- Establecer un protocolo de purificación para obtener una proteasa de *S. elaeagnifolium* con un alto grado de pureza para su caracterización.
- Caracterizar bioquímica y cinéticamente la proteasa purificada de *S. elaeagnifolium*.
- Determinar la temperatura de desnaturalización térmica de la enzima purificada por calorimetría diferencial de barrido y estabilidad térmica.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Materia Prima y Preparación de Extracto

Los frutos secos de *Solanum elaeagnifolium* se recolectaron en el municipio de Viesca, Coahuila, México, y transportaron al Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) Unidad Hermosillo Sonora, México. Los frutos fueron colocados en bolsas plásticas Ziploc® y almacenados a -18 °C hasta su posterior análisis.

Previamente 50 g de fruto de trompillo se homogeneizaron en un pulverizador de alimentos Nutribullet, modelo HB-1102A (Bella Rocket Blender, México) durante 1 min, a intervalos de 10 segundos para evitar sobrecalentamiento de la muestra. El extracto enzimático de *Solanum elaeagnifolium* se obtuvo homogeneizando una parte de fruto de trompillo seco en polvo con 10 partes de solución amortiguadora (especificada en cada sección). El homogenizado se dejó reposar durante 1 h en refrigeración; posteriormente, se filtró por medio de manta de cielo y centrifugó a  $4,000 \times g$  por 30 min a 4 °C utilizando una centrifuga refrigerada Thermo Fisher Scientific, modelo D-375 (Thermo Fisher Scientific Inc, Alemania). Se corroboró que el pH del sobrenadante denominado extracto crudo (EC) fuera igual al de la solución amortiguadora de extracción (SAE), en caso contrario se ajustó al pH especificado con NaOH o HCl 1M. El EC se almacenó a 4 °C para su posterior análisis.

### 5.2. Cuantificación de Proteína

La concentración de proteína tanto del EC como de cada fracción purificada se determinó utilizando el kit DC Protein Assay (BioRad), basado en el método de Lowry *et al.* (1951). El ensayo consistió en mezclar 5 µL de muestra con 25 µL del reactivo A (Tartrato de cobre alcalino) y 200 µL del reactivo B (Folin-Ciocalteu) en una microplaca. La mezcla se incubó durante 15 min (en

ausencia de luz) para el desarrollo de color. Posteriormente, se procedió a medir la absorbancia a 750 nm utilizando un lector de microplaca (Molecular Devices, San José, CA, USA). La concentración de proteína se determinó utilizando como referencia una curva estándar de albumina de suero bovino (BSA por su acrónimo de inglés) considerando concentraciones de 0.125, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.25 mg/mL.

### 5.3. Actividad Coagulante de la Leche

El ensayo de actividad coagulante de la leche (ACL) se realizó de acuerdo con el protocolo de Moreno-Hernández (2013). Leche descremada (Organic Valley, La Farge, WI, USA) se reconstituyó al 10 % (p/v) con una solución al 0.02% de CaCl<sub>2</sub>. El ensayo de ACL consistió en cronometrar el tiempo requerido para la formación de los primeros coágulos después de mezclar 10 mL de leche con 1 mL de extracto enzimático e incubar a 50 °C. Cada determinación se realizó por triplicado.

Los resultados de ACL se expresaron en unidades Soxhlet, calculadas de acuerdo con la siguiente ecuación modificada.

$$ACL \left( \frac{U}{mL} \right) = \left( \frac{2400}{t} \times \frac{S}{E} \right) \quad (1)$$

*Donde t es el tiempo de coagulación (segundos); S el volumen de leche (mL) y E corresponde al volumen de extracto enzimático (mL).*

Una unidad Soxhlet se define como la cantidad de proteína que se requiere para coagular 1 mL de leche en 40 min bajo condiciones de ensayo.

#### 5.4. Actividad Proteolítica

La actividad proteolítica (AP) se determinó de acuerdo con Moreno-Hernández (2013), utilizando hemoglobina al 1% (en acetato de sodio 0.1 M, pH 5.0) como sustrato. El ensayo consistió en mezclar 450  $\mu$ L de sustrato y 50  $\mu$ L de extracto o enzima purificada. La mezcla se incubó a 50 °C durante 60 min y, posteriormente, la reacción se detuvo mediante la adición de 500  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) al 5 %. Un blanco (control) se preparó bajo el mismo procedimiento, sin incubar y con la adición directa de TCA.

Tras la adición de TCA a las muestras (con y sin incubación), se colocaron en un baño de hielo por 20 min y se centrifugaron a 10, 000  $\times$  g por 20 min a 4 °C usando una centrífuga refrigerada Eppendorf 5417R. Al sobrenadante resultante se midió su absorbancia a 280 nm utilizando un espectrofotómetro Spectramax® M3 (Molecular Divises, San Jose, CA, USA). La actividad se expresó en unidades de actividad proteolítica (UAP). Donde una UAP se definió como la cantidad de enzima requerida para causar un incremento en una unidad de absorbancia respecto al blanco bajo condiciones de ensayo.

#### 5.5. Análisis de Proteínas por Electroforesis SDS-PAGE

El extracto crudo, las fracciones cromatográficas y enzima proteolítica purificada (EPP) se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) de acuerdo con Laemmli (1970). Se utilizó un gel de resolución al 15 % de acrilamida y un gel concentrador al 5 %. Las muestras se mezclaron con solución 2X SDS (conteniendo 0.15 M Tris-HCL pH 6.8, 1.2 % de SDS, 30% de glicerol, 15% de  $\beta$ -mercaptoetanol y 0.001% de azul de bromofenol) a una relación 1:1 (v:v). La mezcla se calentó a 95°C por 5 min y se centrifugó a 10, 000 rpm durante 3 min a 25 °C. Se calculó el volumen de muestra a aplicar en cada carril basado en la concentración de proteína. La corrida electroforética se realizó en un equipo Mini-PROTEAN a 30 V/20 min para el alineamiento de las muestras y a 120 V/2 h para la separación. Se utilizó un marcador de masa molecular de amplio rango para proteína (6.5-200 kDa) de BioRad (BioRad,

Richmond, CA, USA). Tras el término de la corrida electroforética los geles fueron teñidos durante 5 h con solución de Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0.25%, 45% metanol y 10% ácido acético. Posteriormente, los geles fueron desteñidos con una solución de metanol: agua: ácido acético (45:45:10), fotodocumentados en un equipo ChemiDoc XRS y finalmente analizados con el programa Image Lab BioRad (BioRad, Richmond, CA, USA).

### 5.6. Actividad Enzimática por Zimografía

La actividad enzimática en las muestras se visualizó por zimografía en geles de poliacrilamida polimerizados con gelatina o caseína como sustrato, de acuerdo con la metodología propuesta por Días-López *et al.* (1998) con modificaciones, elaborando el gel de resolución (12% de poliacrilamida) con grenetina o case a una concentración final de 0.1% y urea 0.1M. Las muestras se prepararon con solución muestra 2X (sin B-mercaptoetanol) en una relación 1:1 (v:v) y sin someterse a calentamiento. La corrida electroforética se llevó a cabo de acuerdo con las condiciones de la sección anterior. Posteriormente, los geles fueron desmontados del sistema e incubados con Triton X-100 al 2.5% durante 1 h con agitación constante seguido de dos lavados con agua destilada por 2 min. Posteriormente, los geles se incubaron con agitación constante (Orbital Shaker Bath, Lab-Line 3540) en solución de acetato de sodio 0.1M, pH 5.0 por 5 h a 40 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los geles fueron teñidos y desteñidos bajo el procedimiento descrito anteriormente; finalmente, fueron fotoescaneados para su análisis. Las áreas blancas (sin teñir) en los geles fueron consideradas zonas de actividad enzimática (zimografía).

### 5.7. Efecto del pH y Temperatura Sobre la Actividad Proteolítica del Extracto y de la Enzima Parcialmente Purificada de *S. elaeagnifolium*

El efecto del pH sobre la AP del extracto crudo de trompillo se estudió empleando como sustrato

hemoglobina al 1%, disuelta en diferentes soluciones amortiguadoras: citrato de sodio 0.1 M (pH 2.5-3.5), acetato de sodio 0.1M (pH 4.0-5.5), fosfato de sodio (pH 6.0 y 7.5), Tris-HCl 0.1M (pH 8.0-9.0) y carbonato de sodio 0.1M (pH 9.5-12.0). El ensayo y cálculo de UAP se realizó de acuerdo con la sección 5.4. Los resultados se expresaron como porcentaje de AP relativa respecto al máximo observado. El protocolo descrito se utilizó para evaluar el efecto del pH sobre la actividad de la enzima purificada, modificando únicamente el tiempo de incubación a 30 min y la molaridad final de las soluciones amortiguadoras a 50 mM.

Por otro lado, el efecto de la temperatura sobre la AP del EC se evaluó utilizando caseinato de sodio (1%) como sustrato, disuelto en fosfato de sodio 0.1M, pH 7.0. El ensayo consistió en una prueba de actividad proteolítica (sección 5.4) a temperaturas específicas en el rango de 30-100 °C por 15 min. Para cada una de las condiciones de temperatura se incubó una muestra control sin someter a incubación. Los resultados se expresaron como porcentaje de AP relativa respecto al máximo observado.

#### 5.8. Efecto del pH y Temperatura Sobre la Estabilidad del Agente Coagulante de la Leche del Extracto de *Solanum elaeagnifolium*

El efecto del pH sobre la estabilidad de del extracto crudo de trompillo, *S. elaeagnifolium*, se evaluó de la siguiente manera: un volumen de EC (22 mg de proteína/mL) fue mezclado con solución amortiguadora (relación 1:19 v/v) 0.1M de citrato de sodio (, pH 3.0-3.5), acetato de sodio (pH 4.0-5.5), fosfato de sodio (pH 6.0-7.5), Tris-HCl (pH 8.0-9.0) y carbonato de sodio (pH 9.5-12.0) con 0.8 M de NaCl; la mezcla se incubó a temperatura ambiente (25 °C) durante 48 h. Posterior a la incubación, una alícuota de la solución enzimática incubada se diluyó (relación 1:4, v/v) con un volumen de agua Milli-Q. Tras lo anterior, se procedió a realizar el ensayo de actividad proteolítica de acuerdo con la sección 5.4. Los resultados se expresaron como porcentaje de AP relativa, respecto al máximo observado.

La estabilidad térmica del EC de *S. elaeagnifolium* se evaluó a pH 7.0 (Fosfato de sodio 0.1M) pre-incubando un volumen del EC durante 15 min a temperaturas de 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 y 95 °C, seguido de un ensayo de ACL descrito en la sección 5.3. La estabilidad de la enzima fue expresada como porcentaje de ACL relativa, respecto al máximo observado.

### 5.9. Termoestabilidad de las Proteasas del Extracto Crudo de *S. elaeagnifolium*

La termoestabilidad de las proteasas en el EC de *S. elaeagnifolium* se evaluó mediante la incubación de 10 mL de EC en tubos de centrifuga cónicos de 15 mL, en baño María con agitación y temperatura controlada (Shaker Bath Lab Line, MA, EE.UU.) a 50, 60, 65, 70 y 80 °C, por 1, 3 y 5 h. Después del tiempo de incubación, las muestras se colocaron inmediatamente en un baño de hielo. Para cada temperatura evaluada se consideró un blanco sin tratamiento térmico (TT). Posteriormente, se determinó ACL a cada una de las muestras, de acuerdo con la sección 5.3. En otro experimento, la estabilidad térmica de las proteasas en el EC de *S. elaeagnifolium* se evaluó incubando un volumen de EC a 70 °C por 30 y 60 min. La actividad proteolítica residual se analizó por zimografía de acuerdo con la sección 5.6. Así mismo, las muestras fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE (sección 5.5). Como control se consideró EC sin TT.

### 5.10. Inactivación Térmica de las proteasas del Extracto de *S. elaeagnifolium*

El ensayo de inactivación térmica consistió en incubar un volumen de EC de trompillo a 75 y 80 °C durante 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min. Posteriormente, las muestras fueron enfriadas con un baño de hielo (4°C) para proceder a realizar el ensayo de ACL. Los parámetros de inactivación térmica  $D$  y  $z$ , se calcularon por medio de un modelo de primer orden (Eq. 2 y 3) de acuerdo con Hayes *et al.*, (2001).

$$A = A_0 \cdot 10^{-\left(\frac{t}{D}\right)} \quad (2).$$

$$D = D_r \cdot 10^{-\left(\frac{T-T_r}{z}\right)} \quad (3).$$

Donde;  $A$  es la ACL al tiempo  $t$ ,  $D$  es el tiempo requerido para reducir el 90% de  $A$ , a la temperatura  $T$ ,  $z$  representa el número de °C requeridos para reducir el 90% del valor  $D$ . El superíndice  $o$  y  $r$

denota la actividad al tiempo inicial y la temperatura de referencia, respectivamente. La temperatura de referencia para este estudio fue 75 °C.

Los resultados de inactivación térmica se analizaron mediante el uso de una hoja de cálculo en el software Microsoft Excel 2010 (Microsoft Office®).

Para esta sección, el extracto enzimático se preparó empleando una solución amortiguadora de 20 mM Tris-HCl, pH 7.0.

#### 5.11. Efecto de Compuestos Inhibidores Sobre la Actividad Enzimática del Extracto y de la Proteasa Parcialmente Purificada de *S. elaeagnifolium*

La inhibición de la actividad enzimática en el EC por los inhibidores leupeptina (0.1 mM), ditioneitol (DTT, 5 mM), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 5 mM), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 1 mM) y pepstatina A (0.01 mM), se determinó utilizando caseinato de sodio al 1% como sustrato (0.1 M fosfato de sodio, pH 7.0). El ensayo consistió en incubar 25 µg de proteína del EC con cada inhibidor durante 45 min a temperatura ambiente (25°C) previo a la determinación de la actividad proteolítica, la cual se realizó a 50 °C por 60 min. La reacción se detuvo tras la adición de TCA al 5%, y, posteriormente, se centrifugó a 10 000×g por 20 min a 4 °C. Al sobrenadante resultante se le midió su absorbancia a 280 nm para calcular la actividad residual con respecto a la actividad de un blanco con ausencia del inhibidor bajo condiciones normales del ensayo (Patel *et al.*, 2007).

Por otro lado, el efecto de inhibidores sobre la AP de la enzima parcialmente purificada de *S. elaeagnifolium* se realizó bajo las mismas condiciones descritas para el EC, modificando únicamente el tiempo de incubación a 30 min y la molaridad de fosfato de sodio a 50 mM, pH 7.0.

#### 5.12. Protocolo de Purificación de una Proteasa de *S. elaeagnifolium*

La purificación parcial de una enzima proteolítica del EC del fruto de trompillo se realizó utilizando tres etapas cromatográficas: cromatografía de interacción iónica (CII), cromatografía de

interacción hidrofóbica (CIH) y, cromatografía de exclusión molecular (CEM). Previamente, se prepararon 50 mL de extracto enzimático como se describió en la sección 5.1, empleando acetato de sodio 50 mM (pH 5.0) con 0.8 M de NaCl. El EC se concentró a 20 mL por medio de un ultrafiltrador con agitación (Ultracel Amicon Ultrafiltration Disc; Millipore, Billerica, MA, USA) empleando una membrana de corte de peso molecular de 30 kDa (Membrane Filter Ultracel 30 kDa, Millipore, Billerica, MA, USA.). Posteriormente, se realizaron cuatro lavados consecutivos con 30 mL de SA1 (Acetato de sodio 50 mM, pH 5.0), teniendo como finalidad reducir la concentración salina en el extracto. Los 20 mL resultantes se llevaron a un volumen final de 100 mL, con SA1. Para la primera etapa cromatográfica se cargaron 50 mL del extracto crudo (resultante de la etapa anterior) en una columna de vidrio (2.6×20 cm) con 30 mL de resina DEAE-Sepharose CL-6B (GE Healthcare Bio-Science Copr., Piscataway, NJ, USA), previamente equilibrada con solución amortiguadora SA1. Para remover las proteínas/enzimas que no interactuaron con la fase estacionaria se hicieron pasar 50 mL de SA1; posteriormente se procedió a incorporar 100 mL de SA1 con 0.5 M NaCl a una velocidad de 1.5 mL/min para recuperar la fracción enzimática de interés.

La fracción recuperada (100 mL) se ultrafiltró (30 kDa) hasta llegar a un volumen de 10 mL (fracción DEAE-0.5M). Posteriormente, la fracción se ajustó a una concentración salina de 3 M NaCl para hacerla pasar a una segunda etapa de purificación por cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH). Para CIH se empleó una columna de vidrio (1.7×10 cm) conteniendo 10 mL de resina Butyl-Sepharose (GE Healthcare Bio-Science Copr., Piscataway, NJ, USA), previamente equilibrada con solución amortiguadora SA1 con 3 M NaCl. Después de cargar la fracción DEAE-0.5M en la columna de CIH y lavarla con 30 mL de la misma solución amortiguadora SA1 con 3 M NaCl (flujo 1.5 mL/min), las proteínas fueron eluidas en fracciones de 50 mL mediante una reducción secuencial de la concentración de NaCl (3.0, 2.0, 1.0 y 0 M) en SA1 (acetato de sodio 50 mM, pH 5.0). Posteriormente, la fracción con mayor actividad proteolítica obtenida con 1 M NaCl (CIH-1.0M) se concentró por ultrafiltración (30 kDa) y desalinizó con cuatro lavados secuenciales de 10 mL de SA1. La fracción CIH-1.0M se concentró a un volumen final de 2 mL utilizando tubos Centricon con membrana de corte de masa molecular de 30 kDa (Millipore Inc. Billerica, MA, USA) centrifugando a  $10,000 \times g$  por 5 min a 4 °C en una centrífuga refrigerada (Eppendorf 5407 Centrifuge, Hamburg, Germany).

Finalmente, la muestra CIH-1.0M se sometió a cromatografía de exclusión molecular, a través de

una columna Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare Bio-Science Copr., Piscataway, NJ, USA) equilibrada con SA2 (acetato de amonio 50 mM pH 5.0, 0.1 M NaCl), utilizando un sistema FPLC ÄKTA Pure 25 (GE Healthcare, Buckinghamshire England, UK). Se inyectaron 500  $\mu$ L de muestra por corrida cromatográfica a flujo constante de 0.5 mL/min, colectando fracciones de 0.25 mL. Previo a la inyección, la muestra fue filtrada a través de filtros Miller®-GS de 22  $\mu$ m (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Las fracciones que constituyeron el único pico observado (F<sub>60</sub>-F<sub>69</sub>) se juntaron y concentraron para obtener la fracción purificada denominada FG, seguido de dos lavados con 20 mL de SA1 para remover la sal proveniente de la fase móvil. La muestra se almacenó (a 4 °C) para su posterior análisis por electroforesis SDS-PAGE, actividad proteolítica y zimografía.

Adicionalmente y a modo de exploración, la fracción purificada FG se sometió a una segunda CII empleando una columna MonoQ 5/50GL en un sistema FPLC ÄKTA Pure 25 (GE Healthcare, Buckinghamshire England, UK). La columna MonoQ 5/50GL, se equilibró con SA3 (Tris-HCl 20 mM pH 7.5) cargándose 9 mL de FG desalado (2 inyecciones de 4.5 mL). Diferentes fracciones proteicas de 0.25 mL se colectaron hasta alcanzar 30% de NaCl en la fase móvil (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5), a flujo de 0.75 mL/min. Se obtuvieron dos muestras definidas como F1<sub>7-13</sub> y F2<sub>13-20</sub>, las cuales se almacenaron en refrigeración para su posterior análisis. La fracción proteica que no interactuó con la columna (FNIC<sub>Q</sub>) también fue recuperada y analizada. El subíndice señala las fracciones que fueron juntadas y concentradas para cada una de las muestras.

### 5.13. Preferencia de Sustratos de la Enzima Proteolítica de *S. elaeagnifolium* y su Análisis

#### Cinético

La afinidad de la enzima parcialmente purificada de trompillo por sustratos sintéticos N-Benzoyl-DL-arginine-4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA), N-Benzoyl-L-tyrosine-p-nitroanilide (BTPNA), N-Succinil-L-phenylalanine-p-nitroanilide y N-acetyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-alanyl-N-(4-nitrophenyl)-L- $\alpha$ -asparagine (Ac-YVAD-pNA) se evaluó en formato microplaca utilizando un espectrofotómetro Spectramax® M3 (Molecular Divises, San Jose, CA, USA) a temperatura controlada de 37 °C. El ensayo consistió en mezclar 20  $\mu$ L de solución enzimática parcialmente

purificada (FG) con 180  $\mu\text{L}$  de sustrato a concentraciones de 0.05 mM a 2.0 mM. La reacción se incubó a 37 °C por 20 min, monitoreando la liberación del grupo *p*-nitroanilide mediante la medición de absorbancia a 410 nm a intervalos de  $\sim 5$  s. Para cada concentración de sustrato se utilizó un blanco, en el cual el volumen de solución enzimática se sustituyó por buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7.0. Los sustratos sintéticos se disolvieron en DMSO y DMF, de acuerdo con las especificaciones de proveedor.

Por otro lado, se estudió el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción catalizada por la proteasa parcialmente purificada empleando azocaseína como sustrato. El ensayo consistió en mezclar 20  $\mu\text{L}$  de solución enzimática FG (0.21 mg/mL) con 230  $\mu\text{L}$  de sustrato a concentraciones de 4 a 350  $\mu\text{M}$  incubándose la mezcla a 37 °C por 30 min. El ensayo se realizó en Tris-HCl 50 mM, pH 7.0. Posteriormente, la reacción se detuvo tras la adición de 250  $\mu\text{L}$  de TCA al 5 % e incubando en baño de hielo (4°C) por 10 min; a continuación, las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 min a 4 °C. El desarrollo de coloración se indujo mediante la mezcla de 350  $\mu\text{L}$  de sobrenadante con 350  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.25 M, incubando durante 15 min a temperatura ambiente en una celda de cuarzo de 1 cm de espesor (Hellma Analytics, Müllheim, Germany); posteriormente, se midió absorbancia a 440 nm. Para cada una de las concentraciones de sustrato, se consideró un blanco (sin enzima), incubándolos durante 30 min. Para la determinación de la  $V_0$  se consideró un coeficiente de extinción molar para azocaseína igual a  $\epsilon$  35  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (bajo especificaciones de SIGMA® Product Information). Los resultados obtenidos se utilizaron para generar el gráfico de Lineaweaver-Burk y para determinar la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) mediante GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, San Diego California USA).

#### 5.14. Temperatura de Desnaturalización Térmica de la Proteasa de *S. elaeagnifolium* por Calorimetría Diferencial de Barrido

La temperatura media de desnaturalización térmica de la enzima purificada se analizó por calorimetría diferencial de barrido, empleando un calorímetro modelo Diamond DSC (PerkinElmer, Inc., Shelton, CT.) de acuerdo con García-Sánchez y col. (2014), con algunas modificaciones. Muestras previamente desaladas y liofilizadas (Labconco, Kansas City, MO,

USA), recuperadas en cada etapa de purificación, fueron resuspendidas en fosfato de sodio 50 mM, pH 7.0 (0.5M NaCl), llevándolas a una concentración final de proteína entre 20 y 100 mg/mL. Todas las muestras fueron filtradas a través de filtros Miller®-GS de 22 µm (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Previo al análisis de las muestras, se realizó la traza de una línea base de 25 a 110 °C, empleando una cápsula de acero inoxidable (Perkin Elmer de México, S.A. Monterrey, México) vacía, a una velocidad de barrido de 1.5 °C /min y un flujo de nitrógeno igual a 30 mL/min (30 psi). Posteriormente, alícuotas de 40 µL de muestra y solución amortiguadora (referencia) por separado se colocaron y sellaron herméticamente en cápsulas de acero inoxidable; el peso de la muestra y referencia fueron registrados (en mg). La temperatura media de desnaturalización ( $T_m$ ) de cada una de las transiciones exotérmicas observadas en los termogramas fueron calculadas por medio del software Pyris™ (Perkin Elmer México, S. A., Monterrey, México).

#### 5.15. Perfil Hidrolítico de Caseínas por la Proteasa de *S. elaeagnifolium* y su Comparación con Quimosina

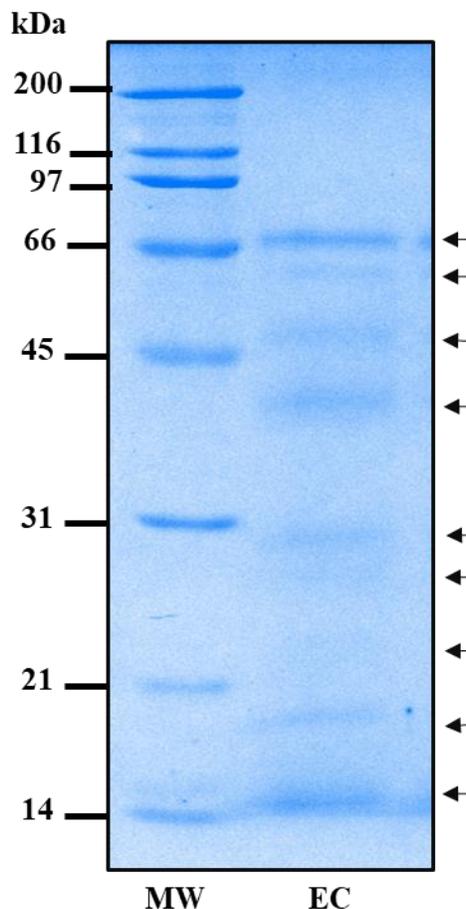
El análisis de la preferencia de las enzimas proteolíticas sobre proteínas lácteas, específicamente caseínas, es un indicativo de su potencial como agentes coagulantes en la elaboración de quesos. El perfil de degradación de las caseínas por la enzima serina proteasa purificada de trompillo (FG), se evaluó y comparó con quimosina mediante un patrón electroforético en geles de poliacrilamida al 17% (SDS-PAGE). El protocolo consistió en incubar 45 µL de sustrato (caseinato de sodio al 2%, Tris-HCl 50 mM, pH 7.0) con 5 µL de la proteasa parcialmente purificada de *S. elaeagnifolium* (0.22 mg de proteína/mL, 2.22 U/mL), e incubar a 37 °C por 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60 y 120 min. Para quimosina (cuajo) se utilizaron 49 µL de sustrato y 1 µL de cuajo comercial Cuamex® diluido 1000 veces (0.28 IMCU/mL). En ambos ensayos se consideró un control (tiempo 0), en el cual el volumen de enzima se sustituyó por solución amortiguadora (fosfato de sodio 50 mM, pH 7.0), sin someterla a incubación. Transcurrido el tiempo de incubación, la reacción se detuvo tras la adición inmediata de 50 µL de solución muestra 2X (Tris-HCl 0.15M, pH 6.8, 1.2% de SDS, β-mercaptoetanol 15%, 0.001% de azul de bromofenol y 30 % de glicerol) y calentamiento a 100 °C

por 5 min; posteriormente, las muestras se centrifugaron a  $10,000 \times g$  por 3 min a  $4^\circ C$ . La corrida electroforética se realizó de acuerdo con lo especificado en la sección 5.6, cargando  $80 \mu g$  de proteína tanto para el control como para las muestras correspondientes a los diferentes tiempos de incubación.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Contenido de Proteína y Perfil Proteico del Extracto de *Solanum elaeagnifolium*

La presencia ubicua de proteínas en las plantas tiene por objetivo cumplir con múltiples funciones biológicas que son importantes para mantener los procesos esenciales de la vida. La función que desempeña cada proteína dependerá, en primera instancia, del tejido (*e.g.* hoja) u órgano (*e.g.* fruto, semilla) en el cual se localice. Así mismo, la abundancia de cada una de ellas es directamente proporcional a los requerimientos celulares demandados para cumplir satisfactoriamente su función biológica. La recuperación de proteínas de fuentes vegetales dependerá de la parte vegetal, método de extracción, composición y fuerza iónica de la solución amortiguadora de extracción, tiempo de extracción, entre otros factores. Así, el contenido de proteína en el extracto obtenido fue de  $25.24 \pm 2.31$  mg/mL (acetato de sodio 50 mM, pH 5.0 con 0.8 M de NaCl). La **Figura 2** muestra el perfil proteico por SDS-PAGE del EC, observándose la presencia de nueve bandas proteicas con masa molecular aparente comprendida entre 12 y 70 kDa. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Gutiérrez-Méndez y col. (2012) así como por Chávez-Garay y col. (2016) para extractos acuosos de fruto de trompillo. Sin embargo, hasta el momento no se había identificado con exactitud la banda correspondiente a la actividad proteolítica; así como, sus características moleculares (*e.g.*, masa molecular, tipo de proteasa). Por lo anterior, resultó importante abordar estudios de purificación para determinar con precisión la banda proteica relacionada a la actividad coagulante.



**Figura 2.** Perfil proteico por SDS-PAGE del extracto crudo de *S. elaeagnifolium*. Las flechas señalan las bandas proteicas observadas para el extracto crudo de trompillo. MW: Marcador de masa molecular; EC: extracto crudo.

## 6.2. Efecto del pH y Concentración de NaCl en el Proceso de Extracción de Proteasas del Fruto de Trompillo

Actualmente existen múltiples métodos de extracción de proteínas a partir de fuentes vegetales, en los cuales, se pueden incorporar agentes tensoactivos, inhibidores, agentes quelantes, sales, entre otros compuestos, a la solución de extracción, los cuales pueden contribuir a un mayor rendimiento de extracción, así como garantizar la integridad y estabilidad de proteínas/enzimas de la fracción de interés. La propiedad de estabilidad térmica de la enzima con ACL de trompillo señalada por Bodansky (1924) llevó a considerar que aplicar un tratamiento térmico sobre el EC contribuiría a

reducir el número de proteínas interferentes en el proceso de purificación. Para corroborar lo anterior, un volumen de EC se incubó por 1 h a 50 ° C; posteriormente, se centrifugó y recuperó el sobrenadante y sedimento (resuspendido en agua al 5 % de NaCl). Tras un ensayo de ACL, se evidenció que la actividad total del extracto se dividía entre el sobrenadante y sedimento de manera diferente si se utilizaba 50 mM de fosfato de sodio (pH 7.0) y 50 mM de acetato de sodio (pH 5.0) como solución amortiguadora extractora (SAE). Se especuló que dicho fenómeno sea producto de la precipitación de las proteasas por efecto de la temperatura y la fuerza centrífuga; no obstante, la incorporación de NaCl señaló un efecto positivo para solubilizar y recuperar la actividad del sedimento.

Por lo anterior, el efecto de la concentración de NaCl (al 5%) en el proceso de extracción se evaluó preparando extractos de acuerdo con la sección 1.1, utilizando SAE de 50 mM acetato de sodio y 50 mM de fosfato de sodio a pH 5.0 y 7.0, respectivamente. Además, se prepararon dos extractos sin la presencia de NaCl en ambas SAE. Para cada extracto se evaluó la ACL a 50 ° C siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.3.

En el **Cuadro 1** se observa el efecto que tuvo la adición de NaCl en la extracción. Haciendo una comparación de actividad entre el extracto control (sin NaCl) y el extracto salino a la condición de pH 7.0, la ACL del EC incremento 2.4 veces al adicionar NaCl (5%) a la solución extractora. Por otro lado, a pH 5.0 la ACL incrementó 3.3 veces respecto al control (sin NaCl). Esto indica que el factor pH y la presencia NaCl tienen un efecto directo en la extracción de proteasas con ACL. Se considera que la modificación del pH y la fuerza iónica (por efecto de la incorporación de NaCl) de la SAE mejora la solubilidad de las enzimas y el proceso de extracción (Ahmed *et al.*, 2008). Por otro lado, la extracción salina con acetato de sodio estimuló 1.1 veces más la ACL respecto al extracto salino de fosfato de sodio (pH 7.0). A pesar de existir una pequeña diferencia en actividad (UCL/mL), la presencia de NaCl muestra ser indispensable para la actividad de la(s) proteasa coagulante de Trompillo, independientemente de la naturaleza química de la SAE evaluada. En este mismo sentido, Ahmed y col. (2008) observaron mayor ACL del extracto de semillas de *S. dubium* en SAE de acetato de sodio (pH 5.0, 50mM) con 5 % de NaCl.

**Cuadro 1.** Efecto del pH y adición de NaCl en la solución extractora sobre la ACL de proteasas de *S. elaeagnifolium*.

Química de SA	pH	Molaridad	Extractos ACL (U/mL)	
			Sin NaCl	Con NaCl (5%)
Fosfato de sodio	7.0	50 mM	4.59 ± 0.38	11.12 ± 0.42
Acetato de sodio	5.0	50 mM	4.83 ± 0.31	15.91 ± 0.93

\*Una unidad coagulante (U) corresponde a la cantidad de extracto (mL) requeridos para coagular 100 mL de leche bajo las condiciones de ensayo.

### 6.3. Efecto del pH y Temperatura Sobre la Actividad Proteolítica del Extracto Crudo de Trompillo *S. elaeagnifolium*

Las enzimas son macromoléculas que ejercen su actividad catalítica de manera eficiente cuando su estructura conformacional se encuentra cercana al estado de menor energía (estado nativo) y, cuando la disposición espacial de los aminoácidos constituyentes del sitio activo (triada catalítica) se encuentran a una distancia apropiada para desempeñar reacciones de oxido-reducción, hidrolisis, isomerización, entre otras, sobre el sustrato. El pH es un factor que influye directamente en la ionización de aminoácidos ácidos y básicos, cargas importantes para la estructura de proteínas/enzimas. Por tanto, si la condición de pH del medio cambia, la función de los biocatalizadores puede modificarse de manera positiva o negativa.

La **Figura 3A** muestra el efecto del pH sobre la actividad proteolítica del extracto de trompillo. El extracto demostró poseer actividad proteolítica sobre hemoglobina en el rango de pH comprendido entre 6 y 12, observándose actividades relativas menores del 30 % a pH menor a 6. No obstante, las condiciones de máxima actividad se presentaron a pH 9.5 y pH 10.0, con 98 y 100 % de actividad relativa, respectivamente. Lo anterior sugiere que la actividad proteolítica del extracto de trompillo puede estar relacionada a la presencia de proteasas tipo serina y cisteína, las cuales son catalíticamente activas bajo condiciones de pH comprendido entre la región neutra y alcalina (Pratush *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos muestran que el EC presenta mayor actividad proteolítica bajo condiciones alcalinas, en comparación con lo reportado para los extractos de fruto de *Vallesia glabra* (González-Velázquez *et al.*, 2020) y flores de *Citrus aurantium* L. (Mazorra-

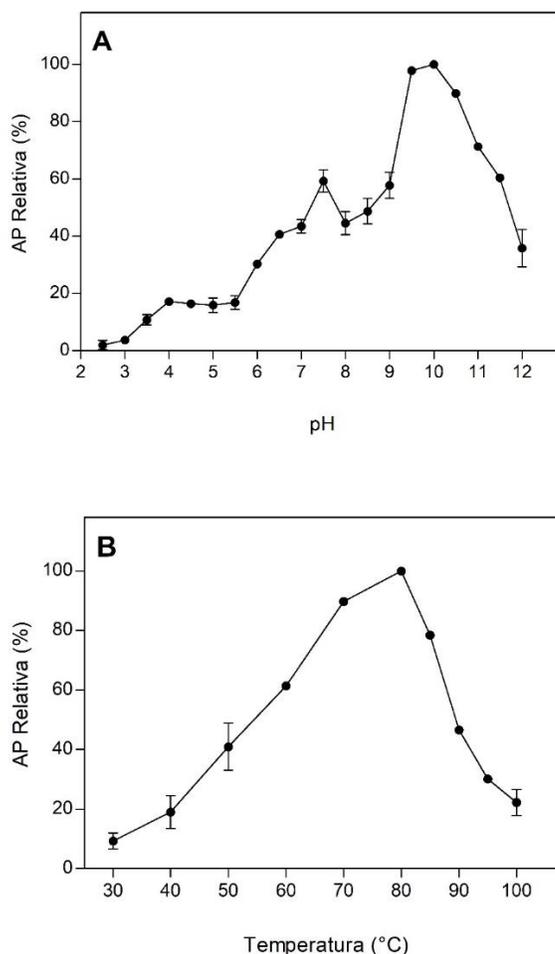
Manzano *et al.*, 2013) los cuales presentan actividad en ambas regiones de pH. Las diferencias en actividad pueden estar fuertemente relacionadas con la abundancia de una o más de dos tipos de proteasas, condiciones de extracción (pH, fuerza iónica, composición de la solución amortiguadora, incorporación de sales), sustrato utilizado, concentración de enzima y el estado de maduración tejido/órgano sobre el cual se evalúa la actividad.

Generalmente, los extractos vegetales poseen actividad catalítica a diferentes valores de pH, debido a la presencia de más de un grupo de enzimas proteolíticas, las cuales desempeñan una gran diversidad de funciones en diferentes procesos celulares. En este sentido, la actividad en un rango amplio de pH señala que el EC de trompillo representa una fuente atractiva de proteasa con posible aplicación en diferentes procesos biotecnológicos (*e.g.*, coagulación de la leche, formulación de detergentes).

Otro factor importante en la actividad catalítica de las enzimas es la temperatura, la cual contribuye a aumentar la velocidad y energía cinética para que proceda la reacción específica. La **Figura 3B**, muestra el efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica del EC de trompillo sobre caseinato de sodio. Se observa una mayor actividad proteolítica a 80 °C, no obstante, dicho extracto exhibe más del 40 % de la actividad relativa en el rango de 50 a 90 °C, lo cual señala su amplio espectro de actividad en función de la temperatura. Es importante mencionar que la actividad proteolítica a temperaturas menores a 50 °C no debe pasar desapercibida, puesto que el EC puede ser utilizado como agente proteolítico en procesos biotecnológicos cuyas condiciones de temperatura oscilen entre 30 y 50 °C. Por otro lado, la pérdida de actividad observada a temperaturas superiores a 80 °C puede estar fuertemente relacionada con la desnaturalización térmica del agente (o agentes) proteolítico. Generalmente la actividad a altas temperaturas suele ser una característica propia de enzimas proteolíticas aisladas de fuentes vegetales. Se ha mencionado que la combinación de diferentes factores moleculares intrínsecos (*e.g.* glicosilación, interacciones iónicas, enlaces disulfuro, entre otros) y extrínsecos (*e.g.*, sales, cofactores, sustratos, concentración de proteína) contribuyen a la estabilidad térmica de enzimas y proteínas (Kumar *et al.*, 2019).

Los resultados de actividad señalan que el EC de trompillo posee mayor capacidad proteolítica a temperaturas entre 60 y 90 °C. Dicha temperatura de máxima actividad es mucho mayor a la exhibida por los extractos de *Vallesia glabra* y *C. aurantium* L. y otras proteasas vegetales (González-Velázquez *et al.*, 2020; Mazorra-Manzano *et al.*, 2013; Pande *et al.*, 2006). Estos resultados indican que la actividad proteolítica del EC de trompillo está en función de proteasas

con actividad optima a altas temperaturas (mayor a 50 °C); por tanto, representa una fuente atractiva de peptidasas termoestables, enzimas que actualmente reciben alta demanda comercial para su incorporación en diferentes procesos biotecnológicos. Las propiedades de actividad y estabilidad que poseen las enzimas termoestables ofrecen una mayor productividad, reducción de tiempos de proceso y una vida media de inactivación más prolongada ante condiciones adversas (temperaturas altas) (Siddiqui, 2015). De acuerdo con las características de actividad que exhiben las proteasas presentes en el EC de trompillo en función del factor temperatura, se recomienda continuar con investigaciones enfocadas en purificar, caracterizar y estudiar las relaciones de estructura-función de las enzimas proteolíticas termoestables de *Solanum elaeagnifolium*.



**Figura 3.** Efecto del pH (A) y temperatura (B) sobre la actividad proteolítica del extracto crudo de *S. elaeagnifolium*. Los resultados representan la media con respecto a la condición máxima de AP bajo las condiciones de pH (hemoglobina al 1%, 0.1M) y temperatura (caseinato de sodio al 1%, pH 7.0,0.1M). Los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes en triplicado.

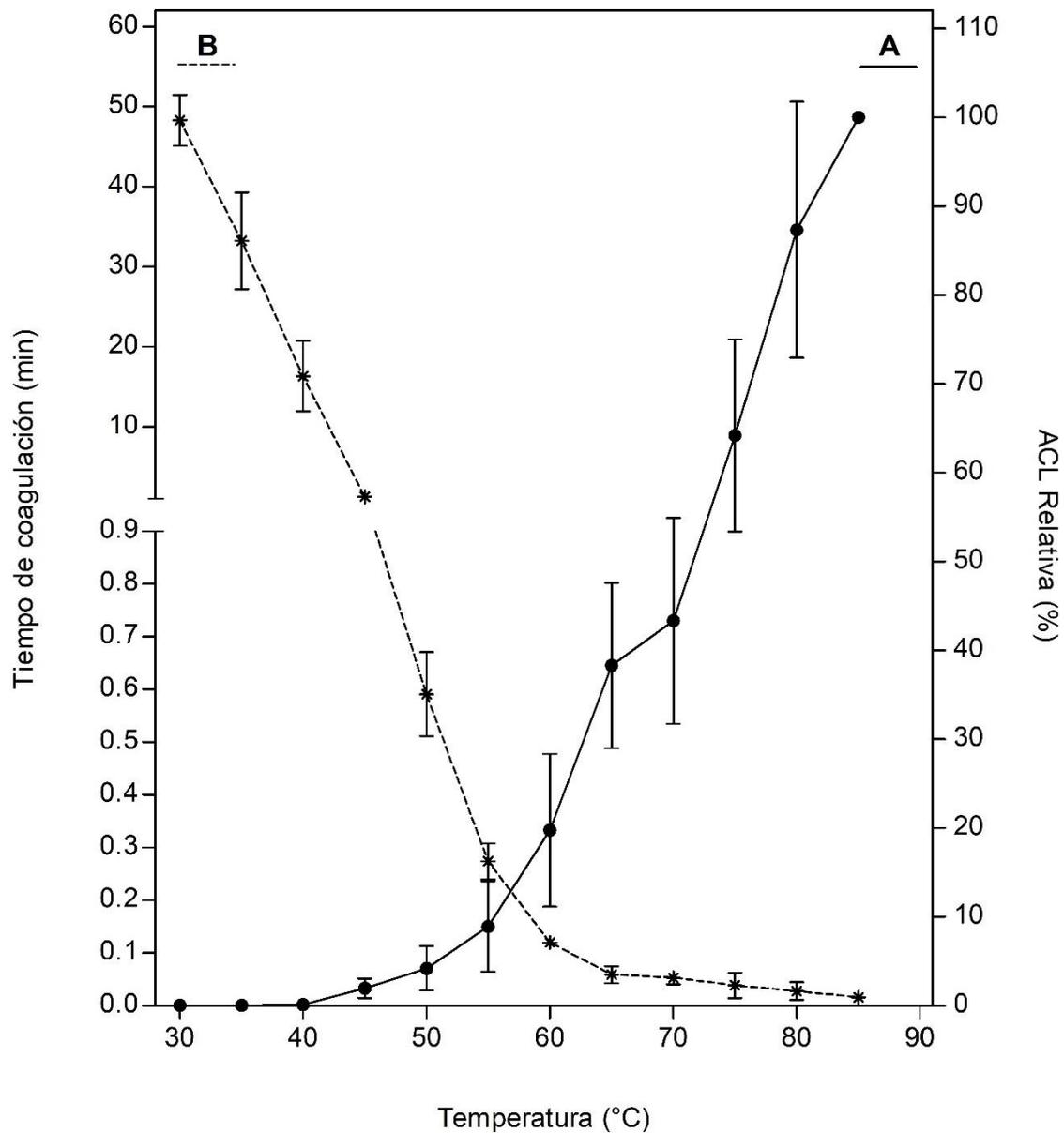
#### 6.4. Efecto de la Temperatura sobre la Actividad Coagulante de la Leche del Extracto Crudo de Trompillo

La transformación de leche a queso implica la desestabilización de los subsistemas fisicoquímicos que la constituyen. La precipitación de proteínas específicas (principalmente caseínas) por métodos enzimáticos resulta ser el proceso más rápido y eficiente; sin embargo, la actividad del agente coagulante se ve fuertemente influenciada por factores tales como temperatura, concentración de enzima, acidez de la leche, entre otros. La temperatura resulta ser uno de los factores más importantes, debido a que influye tanto en la actividad catalítica de la enzima coagulante, así como en la aglomeración de las micelas caseicas para la formación del gel (cuajada) (de Gante *et al.*, 2016). De acuerdo con los resultados presentados en la **Figura 4**, la ACL del EC de *S. eleagnifolium* tiende a ser mayor a medida que incrementa la temperatura en el rango de 30 a 85 °C, exhibiendo máxima actividad a 85 °C. En este mismo sentido, a medida que incrementa la temperatura, el tiempo de coagulación se reduce, presentando tiempos de coagulación menores a 10 min cuando la temperatura supera los 55 °C. En términos prácticos, si la leche se coagula con EC de trompillo a temperaturas menores a los 40 °C, el tiempo de coagulación se prolonga a más de 40 min y, la velocidad de coagulación disminuye debido a la baja actividad catalítica de las proteasas presentes en el EC. En esta investigación no se observó una disminución de actividad por encima de los 80 °C, lo que concuerda con lo reportado por Bodansky (1924). El efecto lineal en el incremento de actividad que se aprecia tras el aumento de temperatura a partir de los 50 °C señala que la ACL es resultado del incremento de la velocidad y energía cinética de reacción (por favorecimiento de colisiones entre enzimas y sustratos), así como por la presencia de enzimas proteolíticas eficientes a altas temperaturas.

En relación con lo anterior, Mazorra-Manzano y col. (2017) señalan que diferentes fitoproteasas con potencial en la industria láctea, exhiben máxima ACL bajo condiciones de temperatura por encima de los 40 °C. Generalmente los proveedores de cuajo comercial recomiendan aplicar una dosis de 10 a 15 mL de solución enzimática (fuerza de cuajo declarada entre 280 y 325 IMCU/mL), diluido 10 veces, para coagular 100 L de leche a temperaturas entre 32 y 35 °C con un tiempo de coagulación promedio de 40 min. A manera de comparación y en función de la información de ACL presentada en **Cuadro 2**, si el extracto de *S. elaeagnifolium* se utiliza como agente coagulante

de la leche bajo condiciones normales de proceso (35°C), se requerirían 8.3 mL de extracto para coagular 100 mL de leche en 40 min. No obstante, si la temperatura de proceso se modifica a 40, 50 y 60 °C, para coagular el mismo volumen de leche se requeriría tan solo 4.76 mL, 180 µL o 36 µL, respectivamente. La **Figura 4** señala la relación de la temperatura y el tiempo de coagulación, donde se puede observar que a temperaturas entre 30 y 40 °C (empleando extracto crudo sin diluir), la coagulación acontece entre 15 y 40 min; sin embargo, a temperaturas superiores a 45 °C el tiempo se reduce drásticamente a menos de un minuto, por lo que, para coagular la leche en tiempos adecuados (aprox. en 40 min), se requiere reducir la concentración del extracto mediante su dilución en 100 a 250 veces. La reducción del tiempo de coagulación a altas temperaturas (a partir de 50 °C) se encuentra fuertemente relacionada con la eficiencia catalítica de la proteasa a la condición de temperatura evaluada, que, para este caso, la proteasa coagulante del EC muestra tener máxima actividad proteolítica y coagulante a temperaturas superiores a los 60°C, condiciones a las cuales otros coagulantes pierden su actividad. Estos resultados muestran la importancia que tiene la variable temperatura para potencializar la actividad coagulante del extracto, así como reducir los tiempos de coagulación.

Para considerar una enzima como buen agente coagulante, en comparación con el cuajo comercial, además del factor temperatura, deben tomarse en consideración otros aspectos catalíticos tales como poseer baja actividad proteolítica y alta actividad coagulante, especificidad de escisión sobre las proteínas de la leche, principalmente sobre  $\kappa$ -caseína (Mazorra-Manzano *et al.*, 2013). Trabajos previos señalan que quesos resultantes tras la coagulación de la leche con extracto de *S. elaeagnifolium* presentan características de textura diferentes a los que se obtienen con quimosina o renina, no obstante, se tiene un mayor rendimiento de cuajada debido a una mayor retención de agua (Gutierrez-Mendez *et al.*, 2012; Chávez-Garay *et al.*, 2017).



**Figura 4.** Efecto de la temperatura sobre la actividad coagulante (A) y tiempo de coagulación de la leche (B) por el extracto crudo de fruto de *S. elaeagnifolium*.

\* Para el ensayo de coagulación de la leche a temperaturas de 30 a 40 °C se empleó extracto sin diluir, mientras que a temperaturas superiores a los 40°C el EC se diluyó de 100 a 250 veces. Los tiempos de coagulación a temperaturas mayores a los 40 °C se calcularon considerando que el extracto crudo no fue diluido. Los resultados representan la media en actividad con respecto al máximo observado de actividad coagulante de la leche (ACL), bajo las condiciones de ensayo (Leche: EC 10:1), mientras que las barras expresan la desviación estándar de dos experimentos independientes realizado en triplicado.

**Cuadro 2.** Actividad coagulante del EC de *S. elaeagnifolium* en función de la temperatura.

Temperatura (°C)	Actividad coagulante (U/mL)
30	0.07 ± 0.01
35	0.12 ± 0.03
40	0.21 ± 0.06
45	2.56 ± 0.33
50	5.48 ± 0.94
55	11.80 ± 1.60
60	27.85 ± 3.34
65	65.34 ± 15.00
70	111.84 ± 13.47
75	155.05 ± 61.10
80	187.22 ± 81.99
85	183.20 ± 63.48

\* Una unidad (U) coagulante corresponde a la cantidad de extracto requerido para coagular 100 mL de leche, bajo condiciones de ensayo. Los resultados representan la media y desviación estándar de dos experimentos independientes con determinaciones en triplicado.

La preparación del extracto crudo se realizó utilizando SE Tris-HCl 50 mM, pH 7.0 sin NaCl, en relación 1:10 (muestra:SE, p/v).

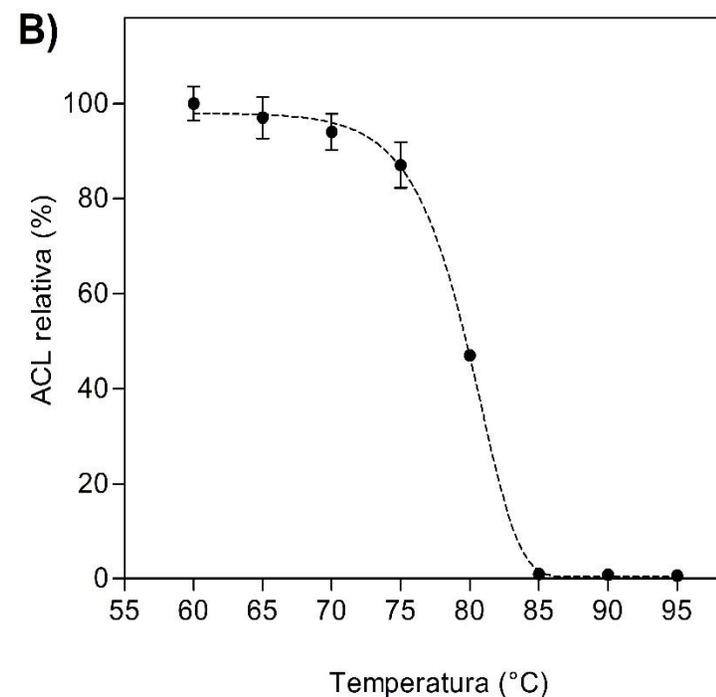
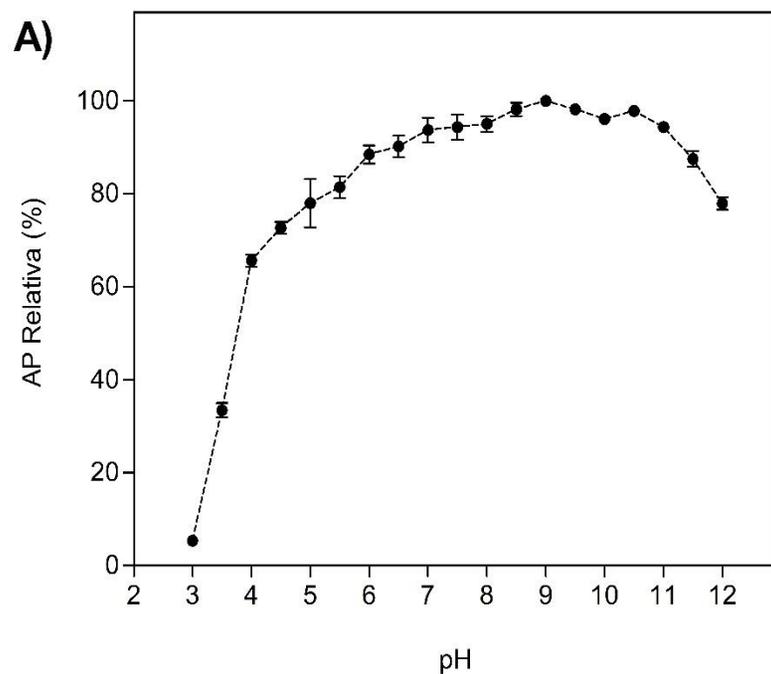
#### 6.5. Efecto del pH y Temperatura Sobre la Estabilidad de las Proteasas del Extracto de Trompillo

En función de las condiciones ambientales del medio (e.g., pH y temperatura) en el cual se encuentren inmersas las macromoléculas, estas desempeñarán su función biológica o biotecnológica específica. Desde una perspectiva biológica, la actividad y estabilidad son propiedades que se encuentran estrechamente relacionadas para el correcto funcionamiento de los biocatalizadores; sin embargo, para desempeñar adecuadamente la función biotecnológica, los biocatalizadores deben ser estables bajo las condiciones de temperatura y pH específicos para cada proceso. Con relación a lo anterior, se estudió la estabilidad de las proteasas del EC de trompillo en función de las variables pH y temperatura. De acuerdo con los resultados de la **Figura 5A**, la actividad proteolítica del EC de trompillo, *S. elaeagnifolium*, mostró ser estable en un rango amplio de pH (5.0-12.0), después de 48 h de incubación a temperatura ambiente (25 °C). El EC presentó

máxima estabilidad bajo condiciones alcalinas y en puntos cercanos a la zona de pH neutro-alcalino. Es importante señalar que las proteasas del EC de trompillo son estables incluso bajo condiciones ligeramente ácidas (pH 5.0-6.0), al retener más del 80 % de su actividad proteolítica. Resultados similares sobre el comportamiento observado por efecto del pH en la estabilidad tanto en la zona de pH neutro y alcalina fueron encontrados para la serina proteasa dubiumina de *S. dubium* (Ahmed *et al.*, 2009); sin embargo, las condiciones experimentales (tiempo y temperatura de incubación) para cada estudio sugieren que las proteasas de *S. elaeagnifolium* son estables por tiempos más prolongados.

Hoy en día se cuenta con amplia información sobre proteasas de origen vegetal con estabilidad térmica a altas temperaturas, lo cual pone en evidencia que la fuente vegetal representa una buena alternativa para la obtención de nuevas enzimas con potencial aplicación biotecnológica. En la **Figura 5B**, se observa que las proteasas presentes en EC de *S. elaeagnifolium* son altamente termoestables, dado que retienen más del 85 % de su ACL a temperaturas de incubación de 60, 65, 70 y 75 ° C durante 15 min. Así mismo, a 80 ° C aún conservan hasta el 40 % de su actividad. Estos resultados confirman la estabilidad térmica de las proteasas de *S. elaeagnifolium*, mencionada por primera vez por Bodansky (1924).

A nivel industrial, las enzimas termoestables son preferidas para su incorporación en diferentes bioprocesos debido a que la pérdida de actividad durante el procesamiento no se ve comprometida y, porque su vida de almacenamiento puede prolongarse. La alta estabilidad térmica de las proteasas del EC de *S. elaeagnifolium* puede estar relacionada a factores estructurales tales como glucosilación, abundancia de estructuras secundarias  $\beta$ , presencia de puentes disulfuro, entre otros, que contribuyen a retener su estructura conformacional funcional ante factores externos adversos (altas temperaturas, fuerza iónica, pH). En comparación con la serina proteasa religiosina B (Kumari *et al.*, 2012), las proteasas de *S. elaeagnifolium* muestran retener 4.2 veces más su ACL residual a 75 ° respecto a religiosina B, mientras que, con la proteasa estreblina (*Streblus asper*) (Tripathi *et al.*, 2011) solo comparten estabilidad térmica en el rango de temperatura de 60 a 70 °C. No obstante, la estabilidad de la serina proteasa criptolepaina (*Cryptolepis buchmanii*) (Pande *et al.*, 2006) a temperaturas de 70 a 75 °C es más comparable con la estabilidad de las proteasas de *S. elaeagnifolium*. Los resultados sugieren que las proteasas de *S. elaeagnifolium* podrían ser adecuadas para utilizarse como modelo en el estudio de propiedades de termoestabilidad, debido a su alta estabilidad térmica a temperaturas superiores a los 70 °C.



**Figura 5.** Efecto del pH (A) y temperatura (B) sobre la estabilidad de las enzimas coagulantes de la leche del extracto crudo de *S. elaeagnifolium*.

Los valores se expresan en porcentaje de actividad proteolítica (AP) y coagulante de la leche (ACL) relativa. La AP se determinó después de incubar un volumen de EC a diferente pH por 48 h a 25 °C, mientras que la ACL se evaluó después de incubar 15 min el EC a la temperatura indicada.

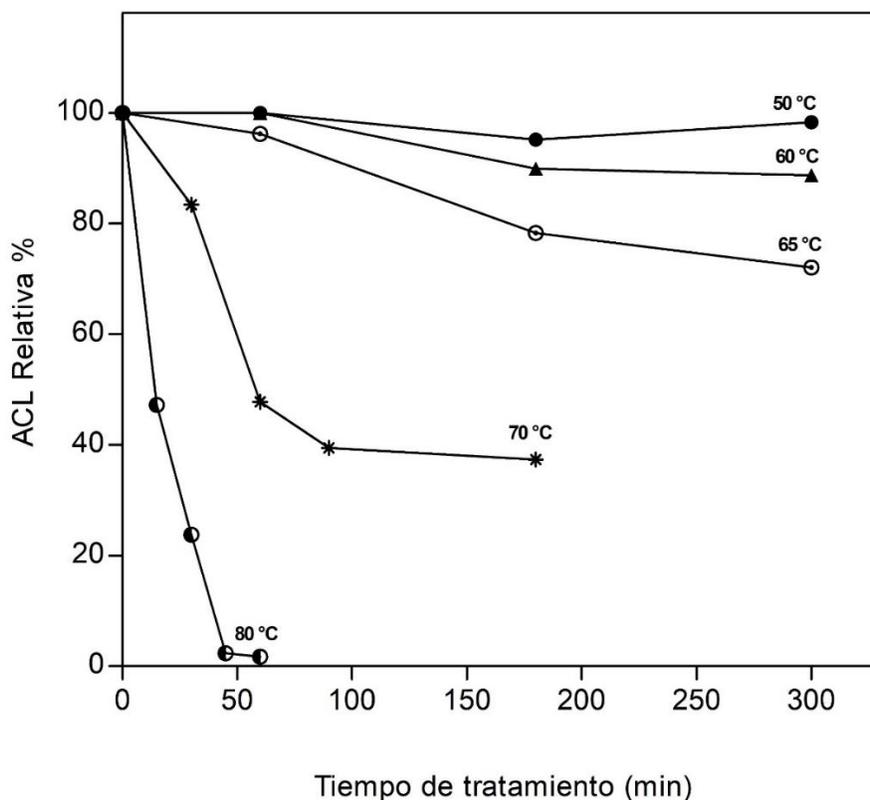
Para evaluar la estabilidad del EC en función del pH se preparó extracto utilizando una solución extractora (SE) de acetato de sodio 50 mM, pH 5.0 con 0.8 M de NaCl en relación 1:10 (muestra:SE, p/v). Mientras que para la estabilidad en función de la temperatura el EC se preparó con Tris-HCl 20 mM, pH 7.0 bajo la misma relación p/v, sin NaCl.

## 6.6. Efecto del Tratamiento Térmico Sobre la Estabilidad de las Proteasas del Extracto Crudo de Trompillo.

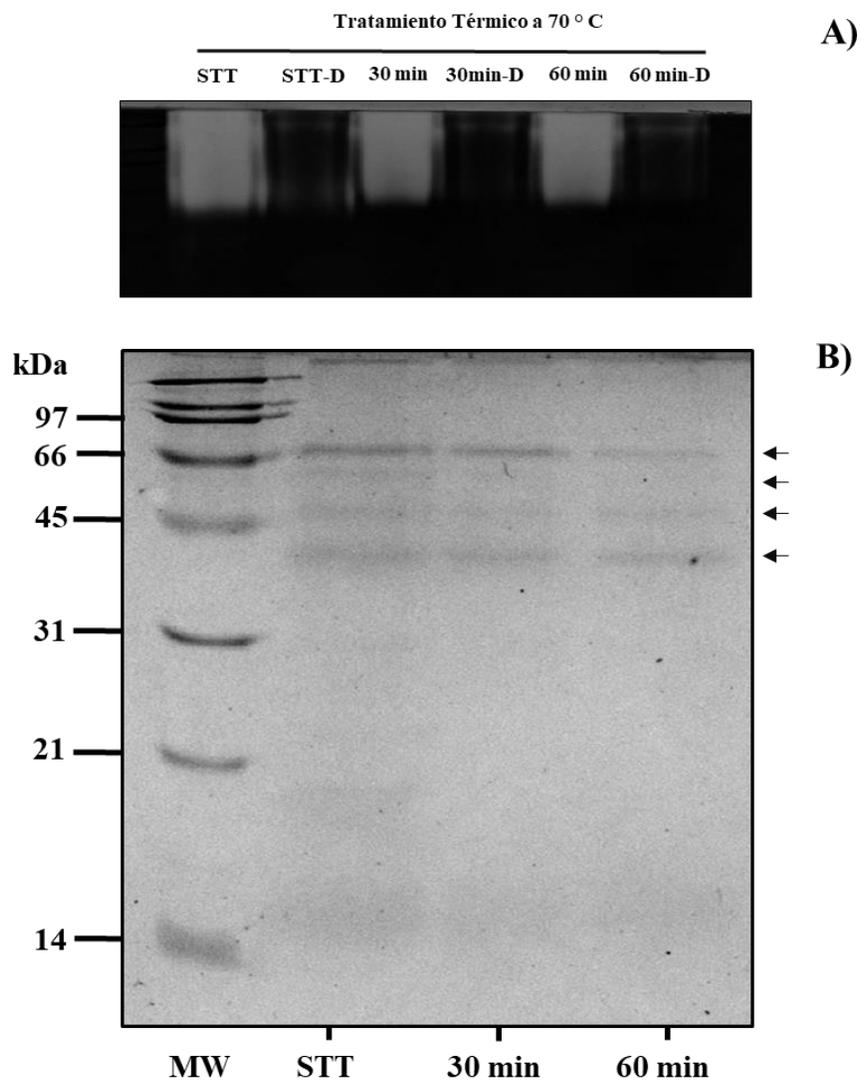
La estabilidad de las enzimas coagulantes de la leche (ACL) del EC de trompillo respecto al tiempo de exposición a tratamientos térmicos de 50-80 °C se muestra en la **Figura 6**. Los resultados indican que la ACL del EC se mantiene estable a 50 y 60 °C después de 300 min (5 h) de incubación. Al exponer el EC a 65 °C durante 180 min (3 h) redujo un 20 % la ACL, mientras que al llegar a los 300 min (5h) de tratamiento térmico (TT), la actividad disminuyó un 26 %. El hecho de que se mantenga la ACL por tiempos prolongados a condiciones de temperatura superiores a los 60 °C, sugiere que el EC de trompillo contiene proteasas altamente termoestables. Un comportamiento atípico para proteasas vegetales, ya que, generalmente, las proteasas termoestables suelen producirse/encontrarse en organismos termófilos (Synowiecki, 2010).

Por otro lado, se observó que la ACL decrece significativamente a un 40 % tras exponer el EC por 3 h a 70 °C, mientras que a 80 °C por 60 min, la ACL se redujo casi en su totalidad. Esto indica que las proteasas del EC pierden actividad por desnaturalización cuando se someten a temperatura de 80 °C por tiempos de exposición superiores a los 30 min. Los resultados expuestos sustentan que el EC representa una fuente potencial de enzimas termoestables.

En función de la termoestabilidad observada a 70 °C, la actividad proteolítica del EC se analizó por zimografía (**Figura 7A**), observándose que el tratamiento aplicado por 30 y 60 min no afectó la actividad proteolítica del EC de trompillo (en función del patrón de degradación de grenetina). Incluso diluyendo 10 veces las muestras la intensidad de degradación concuerda para los tres casos analizados. De la misma manera, el perfil proteico por SDS-PAGE (**Figura 7B**) mostró que las bandas proteicas con masa molecular comprendida entre 40 y 70 kDa identificadas para el control (extracto sin TT), se mantuvieron en ambos tiempos de TT. El perfil proteico solo señala una ligera disminución de intensidad aparente en las bandas proteicas a los 60 min; no obstante, por zimografía no se observó alteración de la actividad.



**Figura 6.** Actividad coagulante del extracto crudo de trompillo en función del tiempo de incubación a diferentes condiciones de temperatura. La preparación del extracto crudo se realizó utilizando SE Tris-HCl 50 mM, pH 7.0, sin NaCl, en relación 1:10 (muestra:SE, p/v).



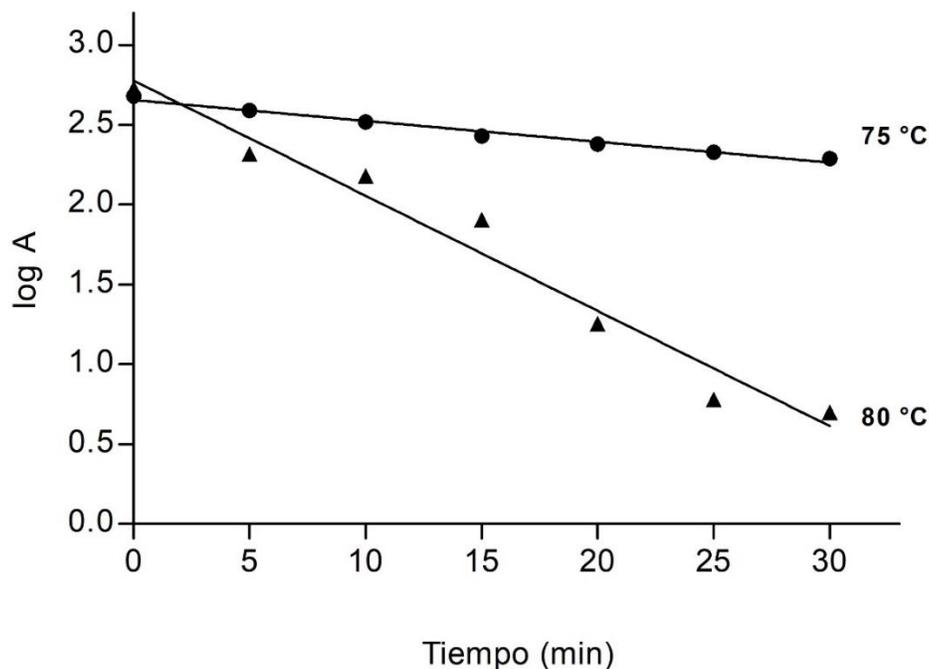
**Figura 7.** Actividad proteolítica por zimografía (A) y perfil proteico por SDS-PAGE (B) del extracto crudo de trompillo después del tratamiento térmico a 70 °C.

Las flechas señalan las bandas proteicas observadas. MW: marcador molecular; STT: sin tratamiento térmico; D: muestra diluida 10 veces.

### 6.7. Parámetros Cinéticos de Inactivación Térmica D y z

Con la finalidad de determinar los parámetros cinéticos de inactivación de las proteasas de trompillo con actividad coagulante de la leche, se realizó un experimento de inactivación térmica a 75 y 80 °C. La inactivación térmica de las enzimas coagulantes de la leche de *S. elaeagnifolium* fue adecuadamente descrita por el modelo de primer orden (**Figura 8**). Los resultados indican que

el tiempo de reducción decimal ( $D$ ) a la temperatura de 80 °C fue de  $13.8 \pm 0.77$  min, con un coeficiente de regresión lineal igual a 0.962 y un valor  $z$  de  $7.3 \pm 0.26$  °C. El valor  $z$  hallado en este estudio señala que las enzimas de *S. elaeagnifolium* son sensibles al tiempo de exposición y al cambio de temperatura (80 °C), respecto a la temperatura de referencia (75 °C). Hasta el momento, no se cuenta con información sobre este tipo de análisis para proteasas de origen vegetal; sin embargo, en un estudio realizado por Narwal y col. (2016) sobre una proteasa microbiana extracelular de *Bacillus subtilis* MTCC 10422, se encontró que a 70 °C el valor  $D$  para esta enzima es de 17.5 min. Es importante señalar que las proteasas de *S. elaeagnifolium* presentan una estabilidad térmica mayor (10 °C) que la proteasa de *B. subtilis*. Esta información es relevante para controlar la actividad del EC, ya que es un factor importante que considerar cuando se utilice en procesos tecnológicos como la elaboración de quesos (e.g., proteólisis por actividad enzimática residual).



**Figura 8.** Cinética de inactivación térmica de las proteasas con ACL del extracto crudo de trompillo.

Los resultados de actividad coagulante en función de la variación del tiempo se expresan en logaritmos (Log A). Cada punto representa la media de ACL expresada en logaritmo del promedio de dos repeticiones.

La preparación del extracto crudo se realizó utilizando SE Tris-HCl 50 mM, pH 7.0, sin NaCl, en relación 1:10 (muestra:SE, p/v).

## 6.8. Efecto de Compuestos Inhibidores Sobre la Actividad Proteolítica del Extracto Crudo de Trompillo

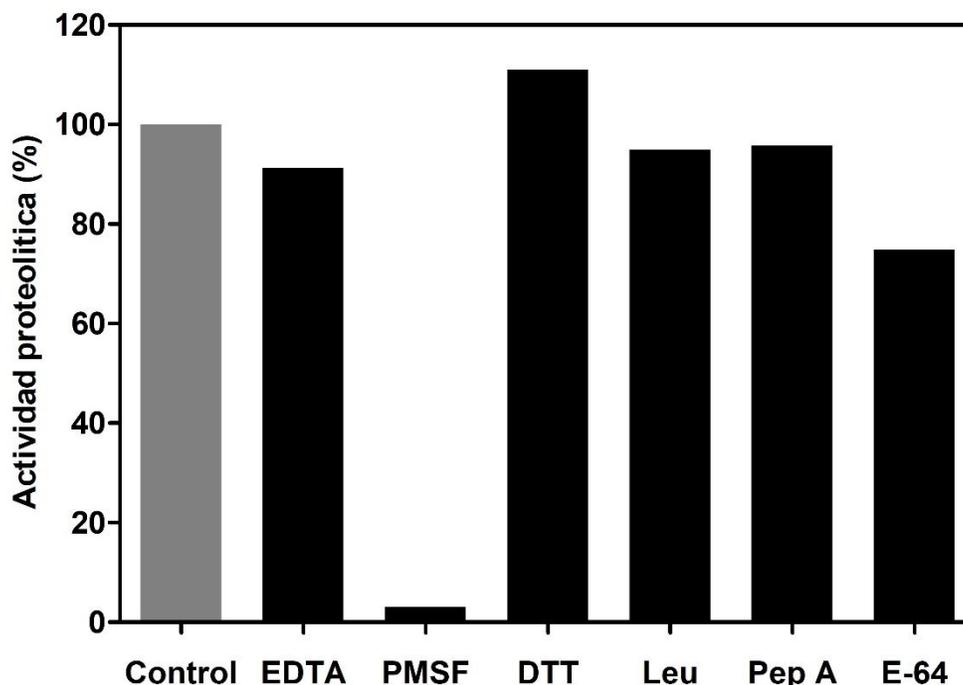
Para un claro entendimiento de la naturaleza proteolítica de sistemas complejos como son los extractos vegetales (de diferentes tejidos y órganos), resulta imprescindible hacer uso de inhibidores específicos que ayuden a esclarecer en función de que grupo o grupos de enzimas proteolíticas se encuentran asociadas a la actividad proteolítica (AP). Por lo anterior, en esta investigación se hizo uso de inhibidores específicos para Ser (PMSF, Leupeptina), Cys (E-64, Leupeptina y DTT), Metalo (EDTA) y Asp proteasas (Pepstatina A), para caracterizar la AP del EC de *S. elaeagnifolium*. La **Figura 9**, muestra la actividad proteolítica del EC y su inhibición. Se puede observar que la AP en el EC es inhibida en un 97 % por fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, por su acrónimo en inglés), indicando que se trata de proteasas tipo serina. Aunque leupeptina también es un inhibidor específico tanto para proteasas tipo Ser como Cys, solo se observó una reducción del 5 % de actividad respecto al control. El inhibidor PMSF es un compuesto químico que bloquea de manera irreversible la actividad catalítica de serina proteasas (como tripsina, quimotripsina, trombina y papaína) mediante mecanismo de sulfonación del oxígeno del residuo serina que constituye la triada catalítica (Ser-His-Aps) del sitio activo; mientras que leupeptina es un inhibidor competitivo que inhibe de manera reversible mediante el establecimiento de interacciones no covalentes sobre el mismo sitio (Sharma y Kishan, 2011). En función de las discrepancias entre los mecanismos de inhibición de PMSF y leupeptina, la rápida disociación del complejo enzima-inhibidor que caracteriza a la inhibición reversible (Berg *et al.*, 2002), sugiere que podría ser una de las razones por la cual leupeptina presentó baja actividad inhibitoria respecto a PMSF. Por otro lado, E-64 redujo la AP del EC en aproximadamente un 25 %, indicando la presencia en menor medida de proteasas tipo cisteína. El mecanismo de inhibición por E-64 se basa en el bloqueo irreversible del sitio activo por alquilación del grupo tiol (-SH) del aminoácido cisteína que constituye al sitio catalítico.

En este mismo sentido, ditioneitol (DTT) no ejerció su función como inhibidor. El aumento aparente de actividad proteolítica observado en presencia de DTT puede deberse al favorecimiento de la formación de enlaces disulfuro entre Cys(s) (relacionadas con el sitio activo) con el grupo tiol (-SH) de DTT, induciendo así un cambio estructural que favoreció la eficiencia catalítica del

agente(s) proteolítico (Jany *et al.*, 1986). Rao y col. (1998) mencionan que algunas serina proteasas (de la familia subtilisina) de levaduras de *Tritirachinum* y *Metarhizium spp.* requieren del grupo tiol para desempeñar su actividad catalítica. Por otro lado, con lo que respecta a EDTA y pepstatina A, dichos inhibidores no modificaron significativamente la AP, por tanto, en este trabajo se descarta la presencia de aspártico y metaloproteasas en el EC de bayas de trompillo (*S. elaeagnifolium*).

Con los resultados obtenidos se puede inferir que la AP del extracto de trompillo es en mayor medida reflejo de la actividad de serina proteasas. Esta propiedad es ventajosa respecto a los extractos de fruto de *Balanitis aegyptiaca* (Beka *et al.*, 2014), fruto de *Bromelia Pinguin L* (Moreno-Hernández *et al.*, 2017), así como de hojas, fruto y semilla de *Vallesia glabra* (González-Velázquez *et al.*, 2021) debido a que su AP está relacionada a diversas enzimas de más de un grupo de enzimas proteolíticas, lo cual, desde un punto de vista tecnológico, dificulta la formulación y estandarización de preparaciones enzimáticas con aplicaciones biotecnológicas (*e.g.*, coagulación de la leche).

Actualmente, los extractos de *Solanum dubium* (fruto) y *cucumis melo L.* (mesocarpio), por mencionar algunos, son fuentes importantes de proteasas tipo serina con importancia biotecnológica (Ahmed *et al.*, 2009; Feijoo-Siota y Villa, 2011; Hedayati y Sani, 2016). En este sentido, los hallazgos presentados indican que *S. elaeagnifolium* es una fuente valiosa de enzimas proteolíticas con propiedades atípicas, por lo cual resulta imprescindible purificar y caracterizar (bioquímica y estructuralmente) estas enzimas a fin de definir sus aplicaciones potenciales.



**Figura 9.** Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica del extracto de *S. elaeagnifolium*. Inhibidores: EDTA 5 mM, ácido etilendiaminotetraacético; PMSF 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo; DTT 5 mM, ditioneitol; Leu, 0.1 mM, leupeptina; Pep A, 0.01 mM pepstatina A; E-64 1mM, trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido (4-guanidino) butano. El ensayo se realizó empleando caseinato de sodio al (1%) a pH 7.0 (fosfato de sodio 0.1M) y 50 °C.

### 6.9. Purificación de una Proteasa de *S. elaeagnifolium*

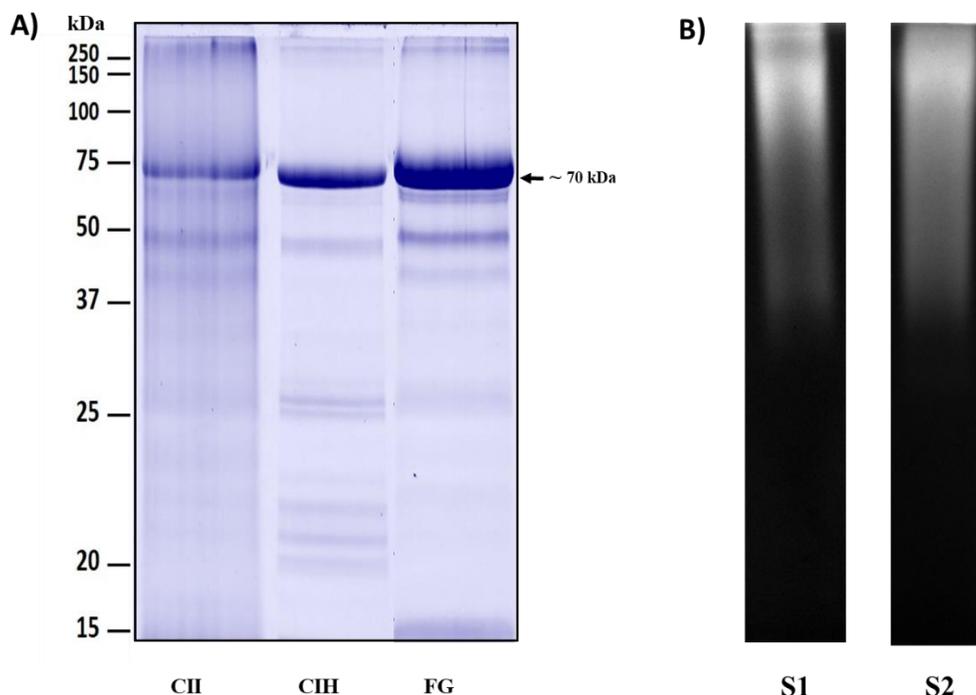
El protocolo de purificación requerido para obtener una proteína específica purificada difiere de una proteína a otra, esto se debe en primera instancia a su estructura primaria, la cual define sus propiedades químicas y estructurales (en función de las condiciones del medio en el cual se encuentre). Dichas propiedades contribuyen a definir estrategias claras para su aislamiento y purificación, cuyos métodos deben garantizar la estabilidad de la proteína en todo momento, además de ser económicos, rápidos y eficientes.

De acuerdo con lo antes mencionado, el proceso de purificación específico para la enzima termoestable de trompillo se realizó en tres etapas cromatográficas. En la **Figura 10A** se presenta el perfil proteico de las fracciones correspondientes a cada tipo de cromatografía. El perfil revela que la masa molecular aparente de las proteínas en cada etapa de purificación se encuentra en el rango de 20 a 70 kDa. A medida que avanza el proceso de purificación se observó que la intensidad

en el bandeo disminuye, haciéndose más apreciable la banda de 70 kDa (FG). Por otro lado, en la **Figura 10B** se presenta la actividad por zimografía utilizando colágeno (S1) y caseinato de sodio (S2) como sustratos, observándose un barrido de actividad similar sobre ambos sustratos. En función del inicio y terminación de la zona de actividad, la actividad proteolítica (zona sin teñir) se asocia a la banda de 70 kDa, presentada en el perfil proteico de la enzima parcialmente purificada FG.

A pesar de que en el perfil proteico no se aprecia una clara disminución en el número de bandas entre una y otra etapa cromatográfica, la actividad proteolítica específica (APE) (**Cuadro 3**) tiende a incrementar. La fracción purificada FG presentó la máxima actividad proteolítica (APE) con 1.25 U/mg de proteína, respecto al resto de las fracciones correspondientes a cada tipo de cromatografía y al EC. La ruta de purificación abordada para este trabajo permitió concentrar 8.8 veces la AP de la proteasa presente en el extracto de fruto de trompillo, teniendo un rendimiento final del 4.18 %. Usualmente, la cromatografía de filtración en gel suele ser empleada como etapa final para el refinamiento de purificación y como control de calidad, debido a que proporciona la ventaja de eliminar agregados, mejora la homogeneidad y brinda un acercamiento a la masa molecular aparente de la proteína bajo estudio (Štulík *et al.*, 2003).

Por otro lado, los resultados de actividad proteolítica específica (APE) sobre caseinato de sodio (1%, pH 7.0), indicaron que en promedio cada fracción posee 22.5 U/mg de proteína, mientras que el control (FG) solo posee 4.4 U/mg de proteína (datos no mostrados). A pesar de que el proceso cromatográfico incrementa la APE, resulta difícil descartar la actividad de dos fracciones para continuar con la caracterización de una sola, puesto que implicaría descartar actividad valiosa de dos fracciones; por lo anterior, resultó factible continuar la investigación con la enzima parcialmente purificada FG para su caracterización bioquímica y cinética.



**Figura 10.** Perfil proteico (A) y zimograma (B) de la enzima parcialmente purificada FG de *S. elaeagnifolium*.

CII: fracción eluida de resina DEAE con 0.5 M NaCl; CIH: fracción eluida de resina Butyl-sepharose a 1.0 M NaCl y, FG: enzima parcialmente purificada. El sustrato utilizado en el zimograma fue gelatina (S1) y caseinato de sodio (S2) al 0.1% revelada con 0.1M de fosfato de sodio pH 7.0 por 12 h a 50 °C. Se inyectaron 20 µg de proteína por carril.

**Cuadro 3.** Resumen de la purificación de la proteasa del extracto crudo proveniente de *S. elaeagnifolium*.

	Proteína Total (mg)	UAP <sup>1</sup> totales	Actividad Específica (U/mg)	Rendimiento UAP (%)	Factor Purificación
EC*	1023	146	0.1423	100	1
CII <sub>0.5 M</sub>	31	25	0.80	17.12	5.6
CIH <sub>1.0 M</sub>	7.43	7.5	1.01	5.14	7.1
FG <sub>(60-69)</sub>	4.89	6.1	1.25	4.18	8.8

\*Corresponde a 50 mL de extracto enzimático (extracción en acetato de sodio 50 mM pH 5.0, 0.8 M NaCl) de fruto de Trompillo (*Solanum elaeagnifolium*)

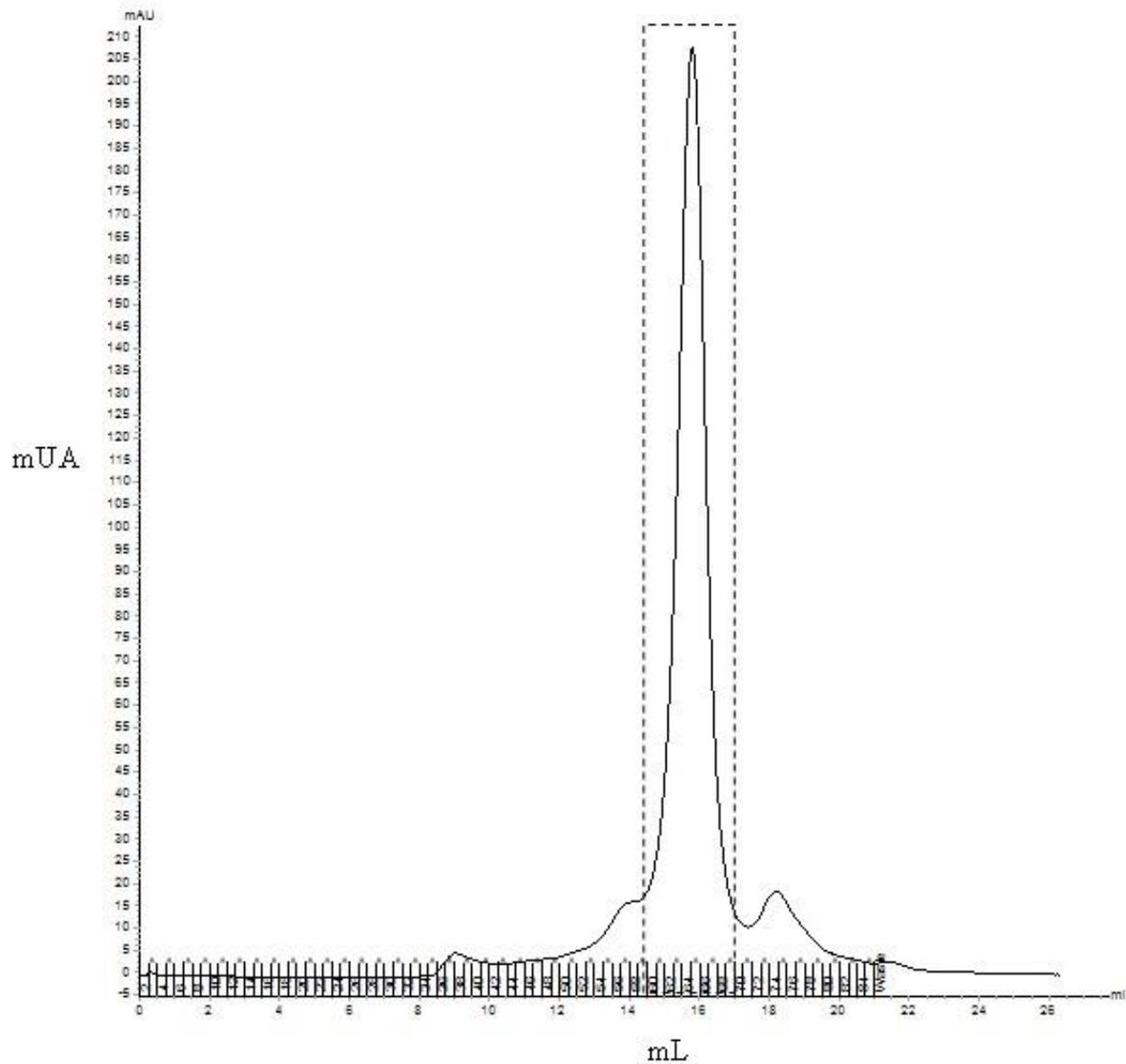
<sup>1</sup>UAP: unidades de actividad proteolítica; CII: cromatografía de interacción iónica; CIH: cromatografía de interacción hidrofóbica y FG: enzima parcialmente purificada.

Una unidad de AP corresponde a la cantidad de enzima que causa un incremento de una unidad de absorbancia a 280 nm en 60 min bajo condiciones de ensayo (hemoglobina como sustrato al 1 % en acetato de sodio 0.1 M, pH 5.0, 0.8M NaCl).

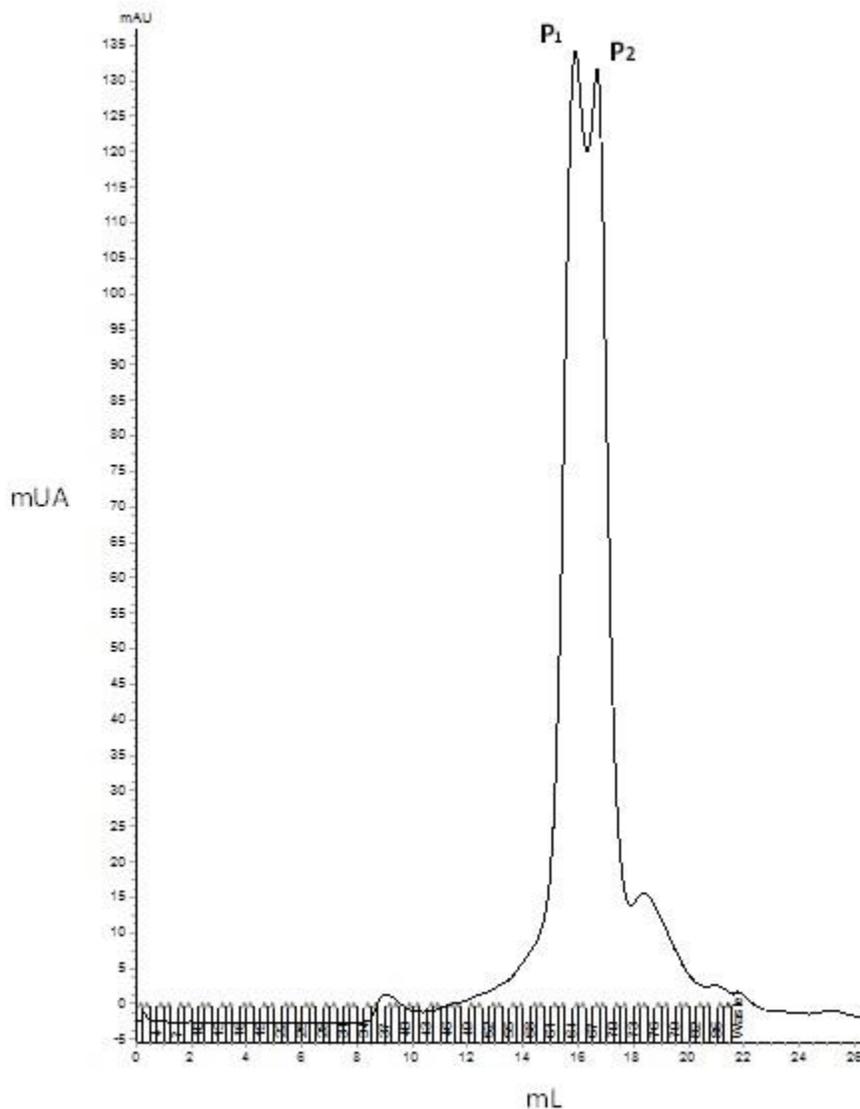
El cromatograma (**Figura 11**) correspondiente a la fracción de CIH purificada por cromatografía de exclusión molecular. Se puede observar que el mayor contenido de proteína (monitoreado a 280 nm) se concentró en un solo pico comprendido entre los volúmenes de elución de 14.5 y 17 mL (fracciones 60-69), bajo las condiciones de corrida especificadas en la sección 5.12. El perfil cromatográfico se conservó en todo momento durante el proceso de recuperación de muestra enzimática; no obstante, en ocasiones se apreció que el pico antes mencionado está constituido por dos picos proteicos (**Figura 12**) estrechamente relacionados. El Pico 1 comprende del volumen de elución 14.5-16 mL, mientras que, el Pico 2, al volumen de elución 16.1-17 mL. Este comportamiento podría estar relacionado con la presencia de isoformas ya que ambos picos mostraron una actividad comparable. Por tanto, el perfil cromatográfico de la **Figura 11** podría indicar que dichas isoformas presentan un contenido de proteína similar, reflejándose en una sola señal en el cromatograma de exclusión molecular.

La actividad proteolítica de las fracciones (61-69) que comprenden el volumen de elución 14.5-17 mL exhibieron AP entre 0.85 y 1.1 U/mL (datos no mostrados). Esto sugiere la existencia de microheterogeneidad de la proteasa parcialmente purificada FG.

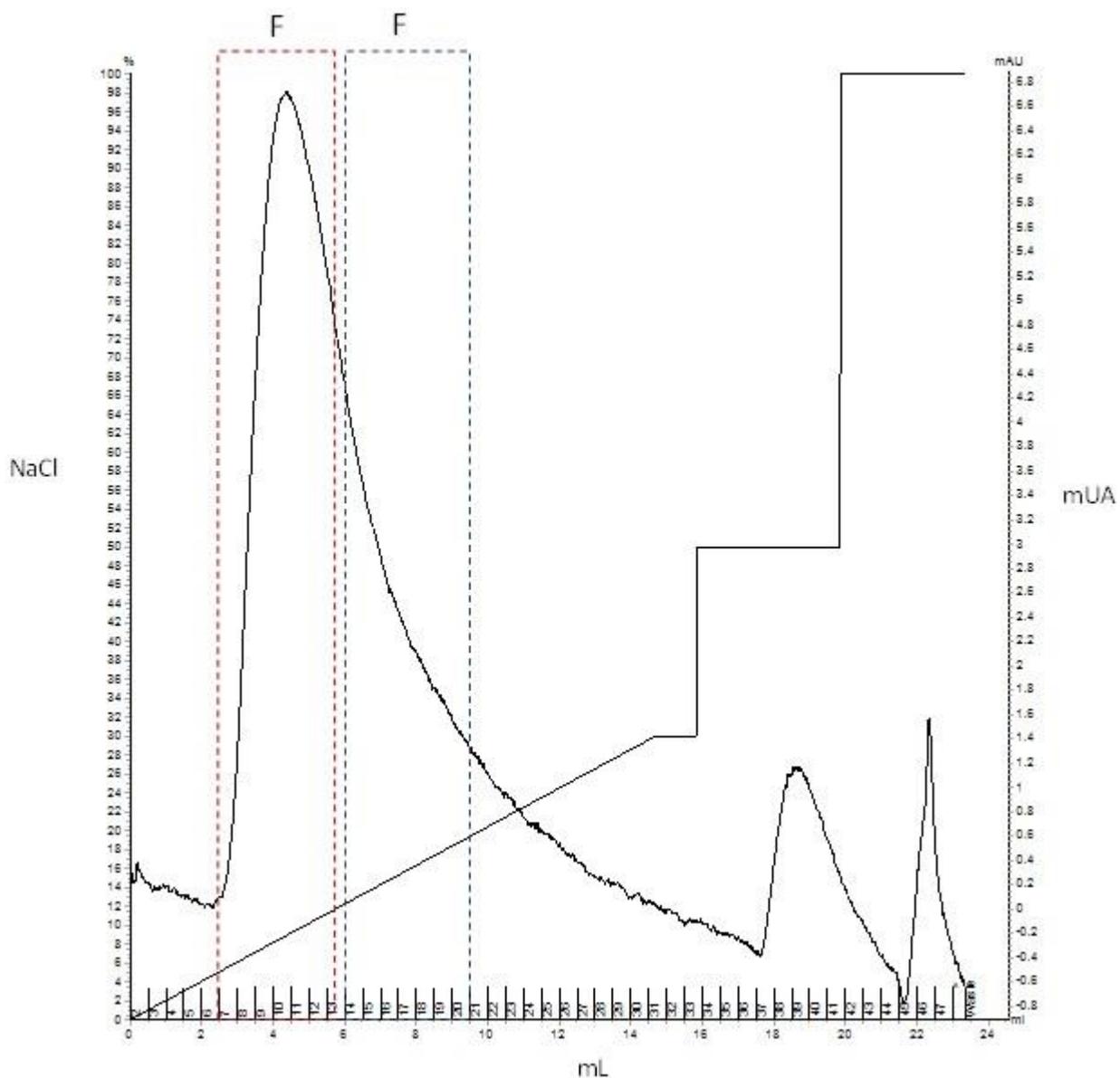
Con fines exploratorios en esta investigación, la enzima parcialmente purificada FG se sometió a un segundo proceso cromatográfico por medio de CII empleando una columna Mono Q 5/50 GL. Las fracciones recuperadas FNIC<sub>Q</sub>, F1<sub>(7-13)</sub> y F2<sub>(14-20)</sub> (**Figura 13**) se analizaron por SDS-PAGE y por ensayo de AP. EL perfil proteico presentado en la **Figura 14** reveló que cada fracción posee una sola banda proteica con masa molecular aparente de 70 kDa, variando únicamente la intensidad entre cada una de ellas. Por otro lado, las fracciones FNIC<sub>Q</sub>, F1<sub>(7-13)</sub> y F2<sub>(14-20)</sub> presentaron AP de 6.5, 5,1 y 4.7 U/mL, respectivamente (datos no mostrados). La ausencia de proteínas con masas moleculares menores a los 70 kDa, que se visualizan en la **Figura 13** (FG) y que no se observan en esta figura, puede deberse a la menor concentración de proteína cargada en el gel o a que ocurrió una degradación inducida por el agente proteolítico de 70 kDa, tras ser almacenado a 8°C (pH 7.5 condición de fase móvil) por aproximadamente cinco días previo a su análisis.



**Figura 11.** Cromatograma de exclusión molecular de la fracción CIH de *S. elaeagnifolium*. Esta cromatografía se realizó en un sistema FPLC (AKTA Pure 25) empleando una columna Superdex 200 Increase 10/300 GL previamente equilibrada con acetato de sodio 50 mM (pH 5.0, 0.1 M NaCl). Se inyectaron 500  $\mu$ L de muestra proveniente de CIH a un flujo de 0.5 mL/min y recuperando fracciones de 0.25 mL.

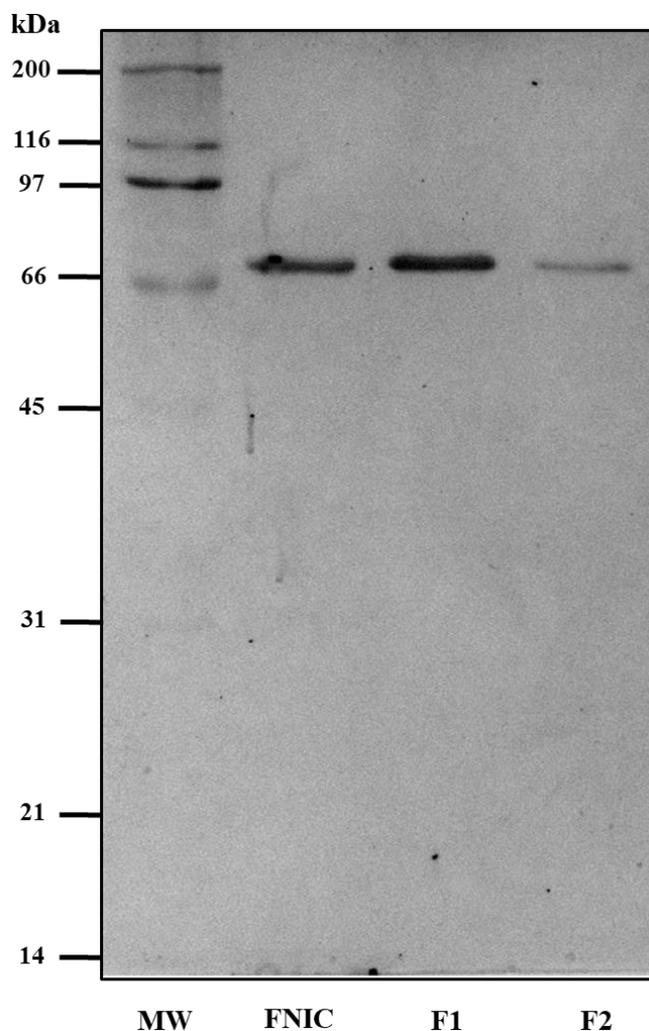


**Figura 12.** Cromatograma de exclusión molecular para la fracción CIH: dos picos constituyentes. Esta cromatografía se realizó para la fracción CIH en un sistema FPLC (AKTA Pure 25) empleando una columna Superdex 200 Increase 10/300 GL previamente equilibrada con acetato de sodio 50 mM (pH 5.0, 0.1 M NaCl). Se inyectaron 500  $\mu$ L de muestra de CIH a un flujo de 0.5 mL/min y recuperando fracciones de 0.25 mL.



**Figura 13.** Perfil de elución isocrática de la enzima parcialmente purificada FG de *S. elaeagnifolium*.

F1: fracciones 7-13 y F2: fracciones 14-20. Las fracciones fueron juntadas y concentradas para cada una de las muestras definidas como F1 y F2. La fracción proteica que no interactuó con la columna (FNIC<sub>0</sub>) también fue recuperada. Las diferentes fracciones proteicas de 0.25 mL se colectaron hasta alcanzar 30% de NaCl en la fase móvil (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5), a flujo de 0.75 mL/min empleando una columna MonoQ 5/50GL.



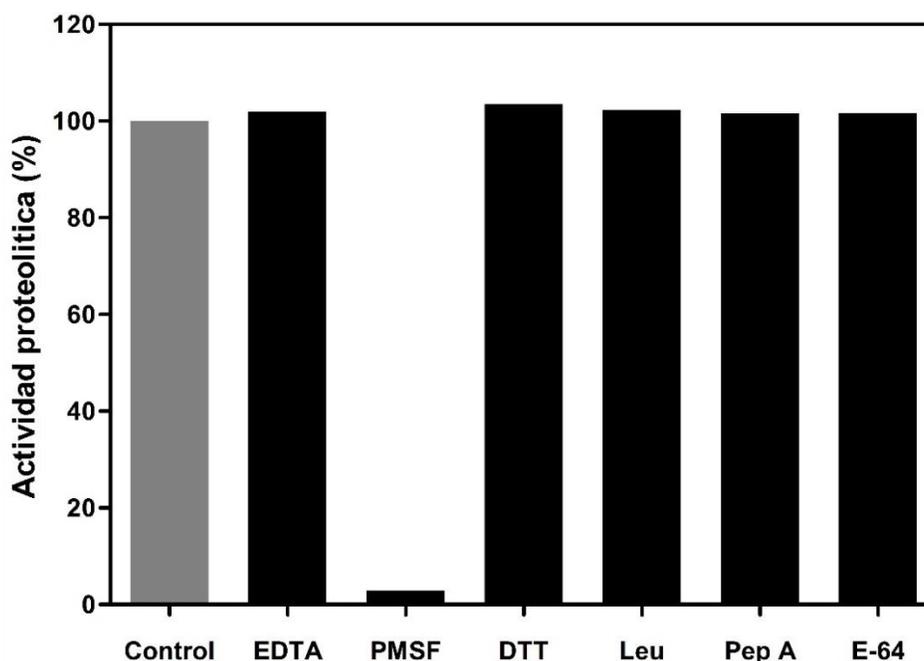
**Figura 14.** Perfil proteico de fraccionamiento de la fracción FG mediante CII usando MonoQ **MW:** Marcador de masa molecular; **FNIC:** fracción que no interactúa con la columna, **F1:** Fracción<sub>(f7-f12)</sub> y **F2:** Fracción<sub>(f13-f20)</sub> recuperadas por cromatografía de interacción iónica (Mono Q 5/50 GL). Se cargaron de 1-2 µg de proteína por carril para las fracciones FNIC, F1 y F2.

#### 6.10. Caracterización Bioquímica de la Proteasa Parcialmente Purificada de *S. elaeagnifolium*

La proteasa parcialmente purificada de *S. elaeagnifolium* FG, se sometió a un proceso de caracterización bioquímica con inhibidores específicos para determinar la clase de proteasa a la cual pertenece. Como se muestra en la **Figura 15**, la máxima inhibición de actividad de la enzima ocurre en presencia de PMSF, mientras que la actividad proteolítica de la enzima no se vio afectada (caseinato de sodio al 1 %, como sustrato, pH 7.0) por el resto de los inhibidores. La fuerte

reducción de más del 97 % de actividad de la enzima incubada durante 40 min a temperatura ambiente en presencia del inhibidor específico para serina proteasas PMSF, indica que la proteasa purificada de *S. elaeagnifolium* es una serina proteasa (**Sela SP1**). Hasta el momento, solo se han aislado y caracterizado cuatro enzimas proteolíticas del género *Solanum*: dubiumina (*S. dubium*), StSBTc-3 (*S. tuberosum*), STAP1 y SATP3 (*S. tuberosum*), siendo las dos primeras serina proteasas mientras que las últimas dos corresponden a aspártico proteasas (Ahmed *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2015; Guevara *et al.*, 2001; Guevara *et al.*, 2003).

Hasta ahora, de acuerdo con la base de datos MEROPS, las proteasas tipo serina se agrupan en 54 familias subdivididas en 12 clanes con características estructurales diferentes. Sin embargo, de acuerdo con los mecanismos de acción, se considera que existen al menos cuatro orígenes evolutivos que dieron parte a los diferentes clanes de serina proteasas. Siendo quimotripsina (SA), subtilisina (SB), carboxipeptidasa C (SC) y Peptidasa A (SE) las familias que comparten un mismo mecanismo de acción por la triada catalítica Ser-His-Asp, pero con orden de distribución espacial diferente (Rao *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 2008). Dentro de las cuatro familias de serina proteasas, las subtilisinas (o subtilasas) son la familia más importante y abundante en las plantas. La presencia de proteasas en diferentes órganos y tejidos de plantas similares a subtilisina está fuertemente relacionada con un amplio espectro de funciones biológicas tales como: mecanismos de defensa ante factores bióticos y abióticos, recambio de proteínas, muerte celular, entre otros (Figueiredo *et al.*, 2018).



**Figura 15.** Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica de la enzima parcialmente purificada FG de *S. elaeagnifolium*.

Inhibidores: EDTA (5 Mm): ácido etilendiaminotetraacético; PMSF (1mM): fluoruro de fenilmetilsulfonilo; DTT (5Mm): Ditioteitrol; Leupeptina (Leu, 0.1mM); Pepstatina A (Pep A, 0.01Mm) y E-64 (1mM). El ensayo de AP se realizó empleando caseinato de sodio al (1%) a pH 7.0 y 50 °C. Se incubaron 160  $\mu$ L de solución enzimática con cada inhibidor durante 40 min a temperatura ambiente antes del ensayo enzimático.

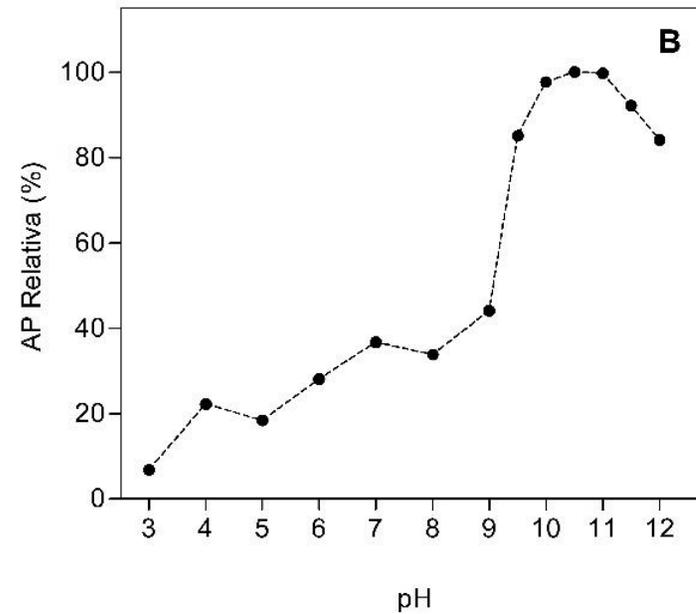
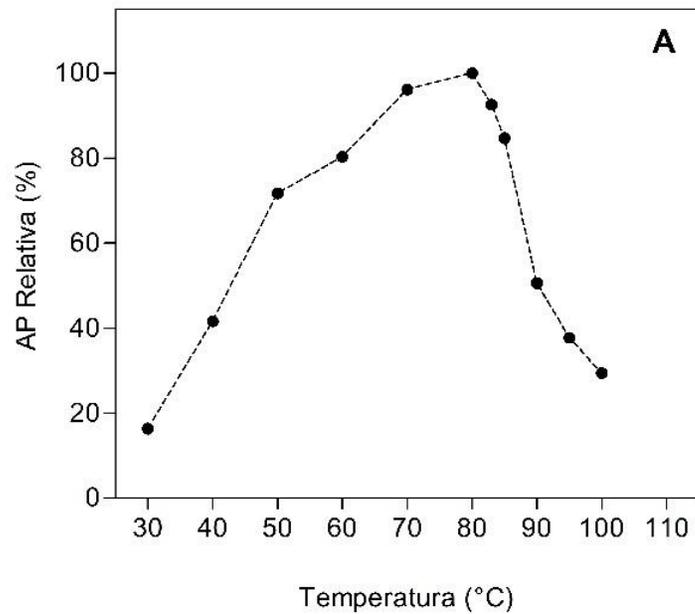
En cuanto a las propiedades de actividad en función de temperatura y pH, la proteasa Sela SP1 presenta actividad en el rango de temperatura de 30 a 100 °C y pH de 3.0 a 12.0. Las condiciones de temperatura y pH óptimo de actividad se presentan a 70-80 °C y 9.5-11.0, respectivamente (**Figura 16 A y B**). La máxima actividad proteolítica observada a temperatura de 80 °C (**Figura 16A**) y que incluso a 90 °C, preserva cerca del 50 % de actividad relativa, resulta ser una propiedad atípica entre las proteasas serina de origen vegetal conocidas a la fecha. A manera de consenso, las serinas proteasas que han sido aisladas y purificadas de diferentes partes de plantas presentan máxima actividad a condiciones de temperatura entre 30 y 75 °C (Pande *et al.*, 2006; Ahmed *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2008). No obstante, la característica atípica de máxima actividad a 80 °C se comparte con las proteasas serina tipo-subtilisina Indicain y Ara12 de *Morus indica* cv. K2 y *Arabidopsis thaliana*, respectivamente (Singh *et al.*, 2008; Hamilton *et al.*, 2003). La glicosilación resulta ser una de las características más sobresalientes de fitoproteasas que son activas y estables a temperaturas superiores a los 50 °C; se considera que la presencia de

carbohidratos anclados a la estructura de proteínas/enzimas desempeñan funciones de protección ante degradación, facilitan su transporte celular, además de mejorar su solubilidad y estabilidad térmica (Sharma *et al.*, 2009; Yadav *et al.*, 2006; Tripathi *et al.*, 2010). Cabe mencionar que la propiedad de actividad y estabilidad a altas temperaturas suele ser resultado de un conjunto de diversas características estructurales propias de cada proteína que, en suma, contribuyen a mantener íntegra la estructura funcional (Argos *et al.*, 1979; Pucci y Rooman, 2017). Por lo anterior, Sela SP1 representa un excelente sistema para estudios biofísicos futuros enfocados a elucidar relaciones de estructura-función de enzimas termoestables.

Por otro lado, Sela SP1 fue activa en un rango amplio de pH (4.0-12.0), indicando su posible aplicación en diferentes procesos biotecnológicos. A medida que el medio se vuelve más alcalino, la enzima purificada incrementa su afinidad sobre hemoglobina, alcanzando un máximo de actividad a condiciones de pH de 10.0 a 11.0 (**Figura 16B**). La conservación de actividad máxima bajo diferentes condiciones de pH alcalino resulta ser una propiedad poco usual entre las serinas proteasas de origen vegetal, debido a que en su mayoría solo exhiben máxima actividad catalítica en un solo valor de pH. Debe señalarse que la serina proteasa criptolepaina (*Cryptolepis buchmanii*) es una excepción a lo antes mencionado, dado que su actividad máxima comprende desde pH 8.0 a 10.5 (Pande *et al.*, 2006). Por otro lado, a manera de comparación, Sela SP1 y la Ser proteasa de *S. dubium* manifiestan la máxima actividad relativa a pH 11.0 (Ahmed *et al.*, 2009). En primera instancia, se podría considerar que ambas enzimas estén estructuralmente relacionadas por ser aisladas de fuentes pertenecientes al mismo género y órgano (bayas); sin embargo, sus propiedades fisicoquímicas (pH y Temperatura óptimo) difieren entre una y otra, lo cual expone que son biocatalizadores estructuralmente diferentes. Actualmente, no se han abordado estudios (en ambas enzimas) estructurales y de rol biológico que esclarezcan la función que desempeñan dentro de las bayas, por lo cual es recomendable direccionar trabajos que discutan lo antes mencionado.

Sin duda, la fuerte actividad a condiciones alcalinas sugiere que Sela SP1 podría representar un aditivo adecuado para la industria de detergentes, sector que demanda enzimas proteolíticas activas en un rango amplio de pH alcalino y en un rango amplio de temperatura (20 a 70 °C) (Vojcic *et al.*, 2015; Shahid *et al.*, 2016). Actualmente, proteasas tipo subtilisina de origen microbiano (e.g. *Bacillus amyloliquefaciens* y *B. licheniformis*) poseen relevancia comercial en la industria de detergentes (Vojcic *et al.*, 2015). Además de este sector, el uso de las proteasas de *S. elaeagnifolium*

podrían ser atractiva en procesos biotecnológicos tales como la producción de quesos  
ablandamiento enzimático de carne, producción de péptidos funcionales y bioactivos, entre otros.



**Figura 16.** Efecto de la temperatura (A) y pH (B) sobre la actividad proteolítica de Sela SP1 de *S. elaeagnifolium*.

Los resultados representan el porcentaje de AP (en función de la máxima actividad observada) bajo las condiciones de temperatura (caseinato de sodio al 1%, fosfato de sodio 50 mM, pH 7.0) y pH (hemoglobina al 1%, solución amortiguadora 50 mM).

### 6.11. Temperatura de Transición Media ( $T_m$ ) de la Proteasa Sela SP1 por DSC

Hoy en día, se cuenta con abundante información respecto a la temperatura óptima de actividad de proteasas de diferentes fuentes vegetales; sin embargo, se ha considerado que este parámetro tiene poca validez porque es una propiedad que depende del coeficiente de temperatura y de las condiciones de ensayo (Daniel *et al.*, 2001). Ante esto, la temperatura media de desnaturalización ( $T_m$ ) resulta ser el mejor descriptor de estabilidad térmica en proteínas, ésta corresponde a la temperatura en la cual el estado nativo y desnaturalizado de la proteína (enzima) coexisten en equilibrio (Daniel y Danson, 2010). En este trabajo, el valor(s)  $T_m$  de la serina proteasa Sela SP1 de *S. elaeagnifolium* se determinó por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por su acrónimo en inglés) a condición de pH 7.0 y, con 0.5 M de NaCl.

El **Cuadro 4** presenta información respecto a las  $T_m$  que fueron observadas durante el proceso de purificación. Para el EC no fue posible apreciar transiciones precisas debido a un exceso de ruido en el termograma (datos no mostrados), posiblemente, debido a la alta abundancia de compuestos orgánicos (*e.g.*, carbohidratos, vitaminas, lípidos, polifenoles, ácidos orgánicos) de naturaleza no proteica que sufren desnaturalización en el rango de temperatura evaluado (25 a 110 °C). No obstante, la etapa correspondiente a cromatografía de interacción iónica (CII) permitió apreciar más de 10 transiciones entre 42 y 103 °C, tratándose de una mezcla compleja de proteínas. Por otro lado, en el termograma de CIH se observaron transiciones a 70.7, 86.14 y 95.3 °C, mientras que para la proteasa Sela SP1, las transiciones se redujeron a tres ubicándose entre las temperaturas de 76 y 95 °C. La etapa cromatográfica CIH contribuyó fuertemente a reducir en un 68 % la complejidad proteica de CII. Por otro lado, CIH y Sela SP1 presentaron el mismo número de transiciones térmicas  $T_m$ , existiendo únicamente discrepancias en los valores de temperatura. Estas diferencias pueden relacionarse a la concentración de cada una de las proteínas y a la sensibilidad del calorímetro utilizado para detectar la liberación de energía asociada a eventos de desnaturalización. Curiosamente en las tres muestras analizadas se presentan transiciones en el rango de temperatura definido como [80-90 °C) (**Cuadro 4**), lo cual se relaciona fuertemente con la temperatura máxima de AP observada (80 °C) tanto para Sela SP1 como para EC; del mismo modo la información generada concuerda con las propiedades de estabilidad térmica y de máxima actividad coagulante (ACL) del EC a 80 y 85 °C, respectivamente. Por las propiedades de actividad

antes expuestas y con fines prácticos, se especula que la transición de Sela SP1 corresponde a la observada en aproximadamente 87 °C; sin embargo, como se ha mencionado en secciones anteriores, no se descarta la existencia de microheterogeneidad de la enzima purificada.

Desafortunadamente, hasta el momento el valor  $T_m$  se desconoce para la mayoría de las fitoproteasas que han sido purificadas, solo unos pocos casos están documentados en literatura lo cual limita hacer comparaciones significativas. Mazorra-Manzano y col. (2010) reportaron un valor  $T_m$  de 60.8 °C para la proteasa aspártica heterodimérica rAtAP A1 de *Arabidopsis thaliana* a pH 7.0, sin embargo, a pH 5.0 presentó transiciones a 68.6 y 79.6 °C; mientras que Pina y col. (2010) indicaron que la proteasa aspártica cardosina A de *C. cardunculus* L. presentó transiciones térmicas a 55.65 y 60.75 °C (pH 7.0).

El valor de  $T_m$  ( $87.64 \pm 1.20$  °C) determinado para Sela SP1 resulta ser una propiedad intrínseca atípica entre las proteasas de origen vegetal, incluso la  $T_m$  (74 °C, pH 7.0) de la serina proteasa termoestable NprotI (*Nocardiosis sp*) (Rohamare *et al.*, 2015), de origen microbiano, no es comparable con la exhibida por Sela SP1. Esto indica que Sela SP1 posee mayor estabilidad térmica respecto a las proteasas antes mencionadas. Ante lo expuesto en estos párrafos, resulta imprescindible continuar con estudios enfocados a desentrañar las características estructurales que le confieren estabilidad a Sela SP1.

**Cuadro 4.** Temperatura media de desnaturalización  $T_m$  observada para la serina proteasa de *S. elaeagnifolium* (Sela SP1) durante el proceso de purificación.

Muestra	Temperatura media de desnaturalización ( $T_m$ )			
	Rango de temperatura (°C)			
	[40-70)	[70-80)	[80-90)	[90-110)
CII	43.50 ± 1.33	72.07 ± 2.12	81.21 ± 0.87	91.07 ± 0.92
	52.13 ± 1.98	76.40 ± 1.12	84.48 ± 1.16	94.67 ± 0.82
	57.33 ± 1.13		87.75 ± 1.13	102.01 ± 0.71
CIH	.....	70.73 ± 0.00	86.14 ± 0.00	91.13 ± 0.59
Sela SP1	.....	76.39 ± 0.24	87.64 ± 1.20	95.39 ± 0.20

CII: fracción de cromatografía de interacción iónica; CIH: cromatografía de interacción hidrofóbica; Sela AP1: Serina proteasa uno de *S. elaeagnifolium*. Todas las muestras fueron resuspendidas en 50 mM de fosfato de sodio (pH 7.0) con 0.5 M de NaCl.

#### 6.12. Especificidad Sobre Sustratos y Caracterización Cinética de la Serina Proteasa Sela SP1

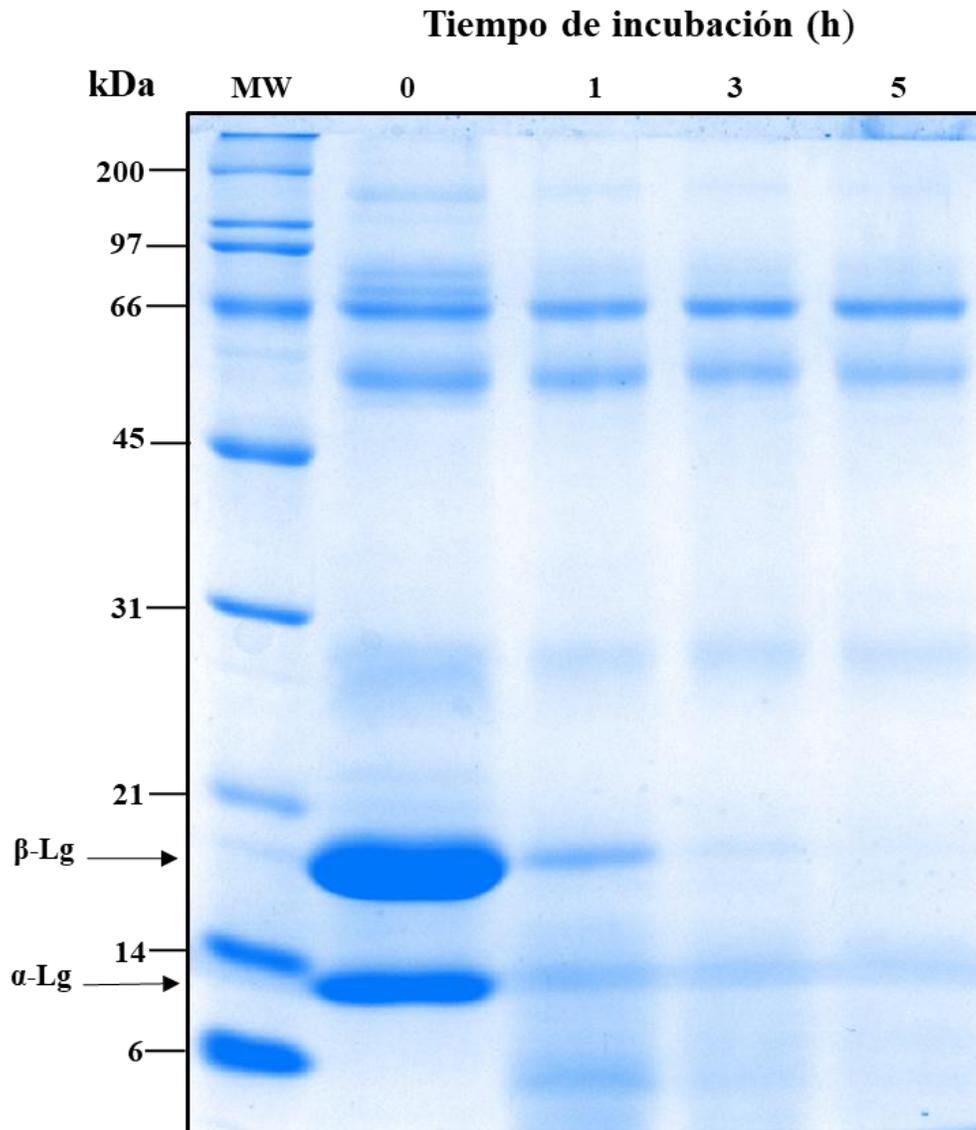
El incremento de demanda de enzimas proteolíticas con aplicación en procesos específicos ha incentivado la búsqueda, aislamiento, purificación y caracterización de nuevas enzimas. En cuanto a su caracterización, las propiedades y parámetros cinéticos (*e.g.*, velocidad de reacción, radio de formación de producto, entre otros) resulta de suma importancia su conocimiento para direccionar sus aplicaciones potenciales. Definir un protocolo para la adquisición de la información antes mencionada implica contar con premisas del comportamiento cinético, los cuales proporcionen criterios para la elección del sustrato, tiempo de reacción y concentraciones de enzima/sustrato que resulten adecuados para obtener resultados claros y contundentes (Stroberg y Schnell, 2016). En este sentido, la afinidad y especificidad de la serina proteasa Sela SP1 para hidrolizar sustratos naturales y sintéticos fue evaluada. Sela SP1 no exhibió afinidad por sustratos sintéticos tales como BAPNA, BTPNA, N-Succinil-L-phenylalanine-p-nitroanilide y el sustrato específico para caspasa I Ac-YVAD-pNA (Datos no mostrados). Sin embargo, mostró tener capacidad de hidrolizar sustratos naturales como colágeno (gelatina), hemoglobina, caseína y las proteínas del lactosuero  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina. La acción sobre las primeras ha sido evidenciada previamente

mediante los ensayos por zimografía, actividad proteolítica y actividad coagulante de la leche. El patrón de degradación de las proteínas del lactosuero por la acción de Sela SP1 se muestra en la **Figura 17**. La acción de Sela SP1 sobre las proteínas del lactosuero, especialmente sobre  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina, es de gran relevancia, ya que la primera es resistente a la acción de tripsina y la  $\beta$ -lactoglobulina es una proteína muy inmunorreactiva y resistente a la acción de enzimas proteolíticas como pepsina (Cheison *et al.*, 2012).

La exclusión de sustratos sintéticos a la acción de Sela SP1 y su afinidad sobre sustratos naturales señala que puede tratarse de una serina endopeptidasa, debido a que los sustratos sintéticos anteriores son específicos para identificar y diferenciar exopeptidasas. Tripathi y col. (2010) también reportaron ausencia de actividad de la serina proteasa estreblina para BAPNA y N-Succinil-L-phenylalanine-p-nitroanilide, atribuyendo tal efecto a la ausencia de residuos como ácido glutámico y cisteína carboximetilada en la estructura de estos sustratos. Sin embargo, la proteasa estándar cucumisina (serina proteasa) si posee una alta tasa de hidrólisis sobre estos sustratos. Por otro lado, Coffen y Wolpert (2004) reportaron que dos proteasas tipo serina de *Avena sativa* exhiben actividad tipo caspasa, sin embargo, Sela SP1 no presentó afinidad sobre el sustrato Ac-YVAD-pNA específico para caspasa 1; por tanto, se descarta su especificidad de caspasa.

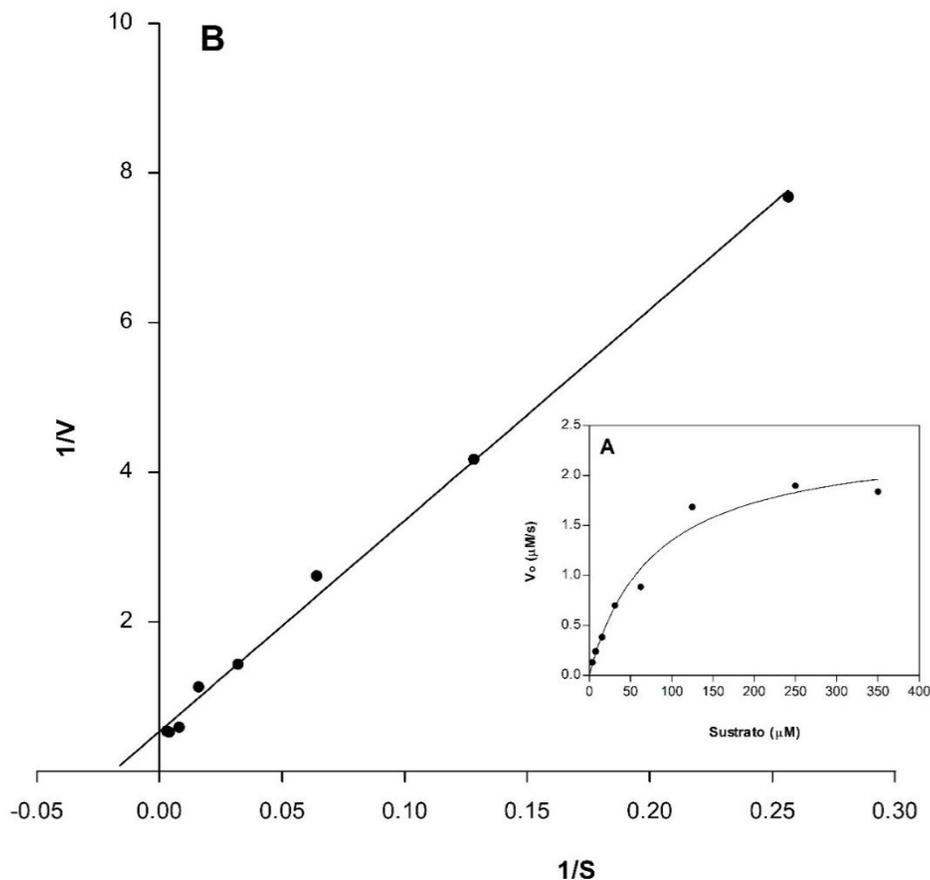
Con la finalidad de examinar el comportamiento cinético de Sela SP1, se realizó su caracterización utilizando azocaseína como sustrato. La **Figura 18A** muestra la variación de concentración de azocaseína ( $\mu\text{M}$ ) sobre la velocidad de reacción catalizada por la serina proteasa purificada. Se puede observar un comportamiento de Michaelis-Menten: curvatura hiperbólica y saturación de la reacción a alta concentraciones de sustrato. Por otro lado, en función del gráfico de Lineweaver Burk (**Figura 18B**), los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  para la serina proteasa Sela SP1 fueron de  $77.8 \mu\text{M}$  y  $2.4 \mu\text{M/s}$ , respectivamente. Estos parámetros corresponden a la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción representa la mitad de la  $V_{max}$  y, punto máximo en el cual el orden de la reacción se vuelve cero debido a la saturación de la enzima. A manera de comparación, Sela SP1 tiene menor afinidad sobre azocaseína respecto a la proteasa criptolepaina que posee un valor de  $K_m$  de  $10 \mu\text{M}$  (Pande *et al.*, 2006). Las condiciones experimentales bajo las cuales se determinó dicha propiedad para Sela SP1 fue fosfato de sodio 50 Mm, pH 7.0; sustrato: 4-350  $\mu\text{M}$ , 30 min de reacción, mientras que para criptolepaina fue Tris-HCl 0.1M, pH 8.0; 1-150  $\mu\text{M}$ , 10 min tiempo de reacción, lo cual podría influir en la discrepancia de los parámetros cinéticos

observados entre ambas enzimas (considerando que la máxima actividad para Sela SP1 ocurre a pH 11 y para criptolepaina de pH 8.0 a pH 10.0).



**Figura 17.** Hidrolisis de proteínas de lactosuero por Sela SP1 bajo diferentes tiempos de incubación.

MW: marcador de masa molecular; BSA: albumina de suero bovino; IgG: inmunoglobulina G;  $\alpha$ -Lg:  $\alpha$ -Lactoalbúmina y  $\beta$ -Lg:  $\beta$ -Lactoglobulina. El perfil de degradación de proteínas de lactosuero se obtuvo tras incubar lactosuero reconstituido al 2% en 0.1 M fosfato de sodio pH 7.0 con Sela SP1 por 1, 3 y 5 h a 50 °C.



**Figura 18.** Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción (A) y gráfico de Lineweaver-Burk (B) para la serina proteasa Sela SP1.

### 6.13. Perfil de degradación de caseínas por la serina proteasa de *S. elaeagnifolium* (Sela SP1) y quimosina

La aplicación biotecnológica de nuevas enzimas proteolíticas implica hacer previamente un análisis comparativo de especificidad que posee la enzima candidato sobre el sustrato de relevancia tecnológica, respecto al de un agente proteolítico modelo. En la **Figura 19 A y B** se presenta el perfil de degradación por SDS-PAGE de caseínas por la serina proteasa de Trompillo (Sela SP1) y quimosina (proteasa aspártica), en función del tiempo de incubación a 37 °C. Sela SP1 muestra tener actividad proteolítica sobre  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ -caseína (PM aprox. de 34, 31 y 19 kDa, respectivamente), actuando inmediatamente a los 5 min de incubación sobre  $\kappa$ -caseína (figura 17 A). Así mismo, a

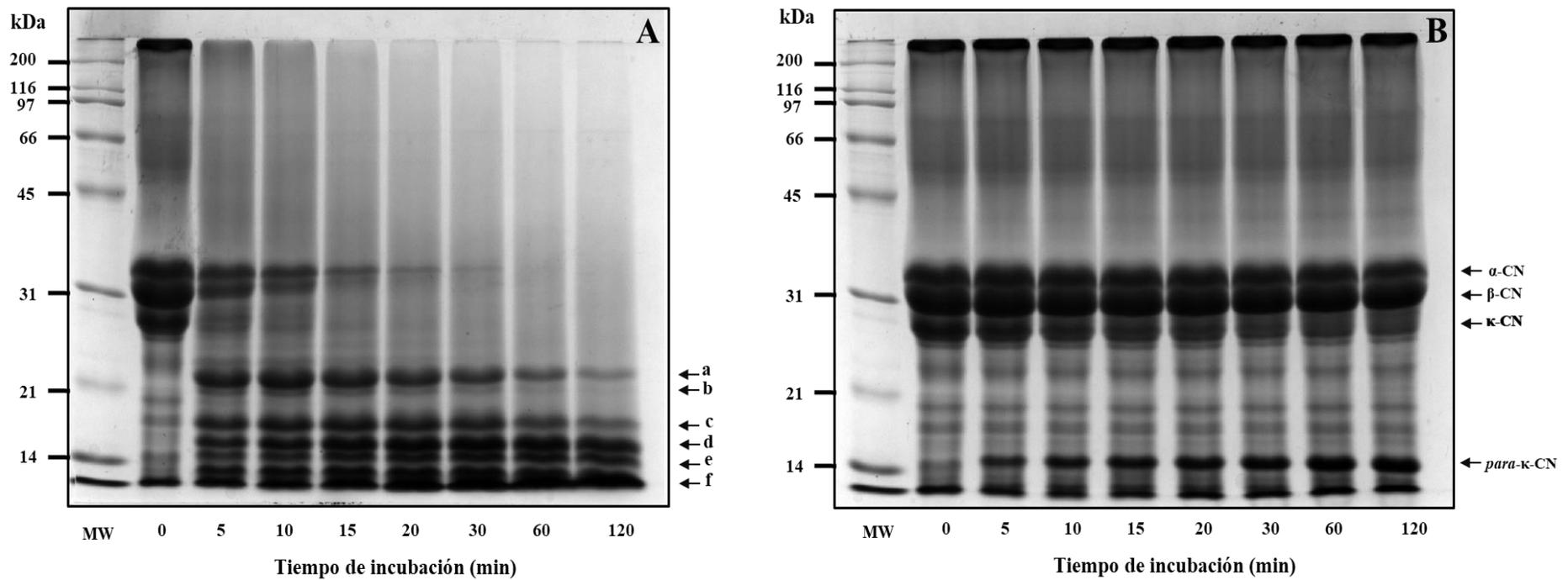
medida que transcurre el tiempo se observa que  $\beta$ -caseína es la segunda proteína degradada, mientras que  $\alpha$ -caseína es la proteína que resiste por más tiempo a la acción de Sela SP1.

Tras la hidrólisis de caseínas por Sela SP1, se generaron diferentes fragmentos proteicos con masa molecular aparente comprendida entre 12 y 24 kDa, siendo los más significativos en intensidad aquellos con masa molecular de 14(e) 16(d), 15.5(e), 17.5(c) y 24(a) kDa (**Figura 19A**). En función del tiempo  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ -caseína son degradadas por completo tras 60, 20 y 10 min de incubación a 37 ° C (pH 7.0), respectivamente. El perfil proteico reveló que el número de bandas proteicas mejor definidas (n=6) se mantiene en todo momento, variando únicamente la intensidad a cada tiempo evaluado. Lo descrito con anterioridad concuerda con el perfil de degradación de caseínas (rango de masa molecular y número de fracciones, orden de degradación) reportado para la proteasa de semillas de *S. dubium* (Ahmed *et al.*, 2010), existiendo únicamente una discrepancia en los tiempos de degradación total observados para de cada una de las proteínas constituyentes de caseína ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ -CN), lo cual puede estar relacionada a la concentración de enzima utilizada. Así mismo, Tito y col. (2020) observaron una proteólisis no específica de StAP1 y StAP3 de *S. tuberosum* sobre caseínas, siendo el orden de degradación  $\kappa$ ,  $\alpha$  y  $\beta$ -caseína para ambas proteasas.

Por otro lado, el perfil de degradación obtenido por el agente coagulante quimosina (control) (**Figura 19 B**) solo señaló la aparición de un fragmento de masa molecular aparente de 14 kDa. Dicha banda proteica corresponde al fragmento *para*-CN, que deriva de una alta especificidad de escisión del enlace peptídico Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> en  $\kappa$ -caseína por quimosina. La aparición de una banda proteica con masa molecular aparente de 14 kDa en el perfil de degradación de la **Figura 19A**, sugiere que Sela SP1 también posee especificidad de escisión semejante a quimosina; sin embargo, de acuerdo con las diferentes bandas proteicas generadas, se infiere que la especificidad de escisión de enlaces peptídicos en caseínas es muy variada. Desde el punto de vista tecnológico en la manufactura de quesos, la proteólisis no específica sobre las proteínas de la leche (caseínas) compromete las propiedades sensoriales y reológicas, así como del rendimiento de la cuajada para el queso específico. No obstante, la actual diversidad de quesos a nivel mundial, con características diferentes en sabor y textura, ha llevado a considerar que la excesiva actividad proteolítica de proteasas podría ser ventajosa para acelerar los tiempos de maduración y conferir nuevas cualidades sensoriales (Ahmed *et al.*, 2010; Delgado *et al.*, 2010).

Hasta el momento, las proteasas aspárticas cardosinas y ciprosinas de *C. cardunculus*, son las fitoproteasas de las cuales se conoce mejor su especificidad sobre enlaces peptídicos en caseínas,

lo cual ha contribuido a definir aplicaciones potenciales sobre sustratos con importancia industrial. Por todo lo anterior, estudios posteriores sobre la evaluación de especificidad de escisión sobre enlaces peptídicos por parte de Sela SP1 esclarecerían la razón de su afinidad por  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ -caseína.



**Figura 19.** Perfil de degradación de caseínas por Sela SP1 (A) y quimosina (B).

Cada carril corresponde a los diferentes tiempos de incubación (min), se cargaron 80  $\mu$ g de proteína. MW: marcador de masa molecular;  $\alpha$ -CN:  $\alpha$ -caseínas;  $\beta$ -CN:  $\beta$ -caseínas;  $\kappa$ -CN;  $\kappa$ -caseínas y *para*- $\kappa$ -CN: *para*- $\kappa$ -caseína. Las flechas a-f en el panel A, señalan algunos fragmentos peptídicos resultantes de la hidrólisis de caseínas ( $\alpha$ -CN,  $\beta$ -CN y  $\kappa$ -CN) por la acción de Sela SP1. Para el perfil A se utilizaron 2.2 UCL/mL mientras que para el perfil B se utilizaron 0.28 UMC/mL.

#### 6.14. Identificación de Proteasas de *S. elaeagnifolium* por Espectrometría de Masas

En función de la actividad proteolítica (AP) exhibida por las tres fracciones recuperadas por CII empleando la columna MonoQ 5/50 GL, correspondientes al fraccionamiento de FG, donde se observa la presencia de una sola banda proteica con masa molecular aparente de 70 kDa (**Figura 14**) resultó conveniente proceder a su identificación mediante LC-MS/MS. Las bandas proteicas identificadas como A, B y C en el **Anexo 10.1**, se digirieron en gel con tripsina grado espectrometría de masas, se analizaron por LC-MS/MS y se identificaron empleando el motor de búsqueda Mascot v2.3 (Matrix Science, London, U.K.) y la base de datos de proteínas del género *Solanum* del NCBI (303135 secuencias, junio 2021). Se consideraron como proteínas identificadas aquellas para las que se obtuvieron al menos dos péptidos (**Anexo 10.2**). Con base en el análisis realizado, las bandas de proteínas corresponden a proteasas tipo-subtilisina STB, siendo *Solanum pennellii* el organismo filogenéticamente más cercano. Las proteasas tipo-subtilisina STB 1.1 (Mr 81858), STB 1.4 (Mr 66700), STB1.7 (Mr 78820 y 78942) y STB 1.8 (Mr 79005) se identificaron distintivamente entre cada una de las bandas: en la banda A se identificó a STB 1.1, STB 1.4, STB 1.7 y STB 1.8 y en la banda B a STB 1.1, STB 1.7 (dos proteasas con diferente Mr) y a STB 1.8. Mientras que, para la banda C, solo se precisó la identificación de STB 1.7 (Mr 78820). Las proteasas STB1.7 y STB1.8 comparten las secuencias peptídicas **IKATVK**, **DSNYGK**, **LTYQVTFK**, **TVTNVGDATSSYK** y **STFNIISGTSMSCPHLSGVAALLK**. Mientras que STB 1.4 tiene en común las secuencias **STFNIISGTSMSCPHLSGVAALLK** y **SADAHVLPALVVSAADGTK** con STB 1.7 y STB 1.8. Por otro lado, ninguno de los péptidos registrados para la proteasa tipo-subtilisina STB 1.1 se comparte con el resto de las proteasas STB de *S. pennellii*. La similitud de péptidos entre las proteasas mencionadas señala la posible existencia de microheterogeneidad de la serina proteasa purificada de *S. elaeagnifolium*. Por lo anterior, los resultados de análisis por LC-MS/MS, así como su inhibición con PMSF, contribuyen a confirmar que la enzima purificada Sela SP1 de *S. elaeagnifolium* corresponde a una serina proteasa.

## 7. CONCLUSIONES

Los hallazgos de esta investigación sustentan que el extracto de *Solanum elaeagnifolium* es una fuente potencial de enzimas proteolíticas con propiedades fisicoquímicas y de termoestabilidad poco comunes entre las fuentes alternativas de proteasas de origen vegetal hasta ahora conocidas. El protocolo de purificación permitió aislar una serina proteasa del extracto crudo de fruto de *S. elaeagnifolium* con masa molecular aparente de alrededor de 70 kDa, con propiedades bioquímicas atractivas que la convierten en un excelente candidato para diferentes procesos biotecnológicos. Las características de estabilidad térmica atípicas y de actividad sobre varios sustratos naturales de la serina proteasa de trompillo (*S. elaeagnifolium*) Sela SP1, señalan que se trata de una enzima que posee propiedades fisicoquímicas y bioquímicas atractivas para uso en distintos procesos industriales y que podría ser utilizada como proteína modelo para estudios de relación estructura-función.

## 8. RECOMENDACIONES

Las propiedades fisicoquímicas y bioquímicas exhibidas por la proteasa Sela SP1, la hacen atractiva para continuar con estudios que definan su perfil como biocatalizador en aplicaciones biotecnológicas (preferencia sobre sustratos y especificidad de escisión sobre enlaces pépticos), su viabilidad a nivel industrial, así como trabajos de investigación que aborden los aspectos estructurales que permitan esclarecer los principios asociados a su termoestabilidad.

La expresión de una enzima en determinados tejidos u órganos marca la necesidad de cumplir una función específica, por ello se recomienda estudiar su localización celular y el rol biológico que desempeña dentro del fruto de *S. elaeagnifolium*.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abada, E. A. (2019). Application of microbial enzymes in the dairy industry. In *Enzymes in Food Biotechnology* (pp. 61-72). Academic Press.
- Abdel-Naeem H. H., & Mohamed, H. M. (2016). Improving the physico-chemical and sensory characteristics of camel meat burger patties using ginger extract and papain. *Meat science*, 118, 52-60
- Agboola, S., Chen, S., & Zhao, J. (2004). Formation of bitter peptides during ripening of ovine milk cheese made with different coagulants. *Le Lait*, 84(6), 567-578.
- Ahmad, M. N., Hilmi, N. H. N., Normaya, E., Yarmo, M. A., & Bulat, K. H. K. (2020). Optimization of a protease extraction using a statistical approach for the production of an alternative meat tenderizer from *Manihot esculenta* roots. *Journal of Food Science and Technology*, 1-11.
- Ahmed, I. A. M., Babiker, E. E., y Mori, N. (2010). pH stability and influence of salts on activity of a milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds and its enzymatic action on bovine caseins. *LWT-Food Science and Technology*, 43(5), 759-764.
- Ahmed, I. A. M., Morishima, I., Babiker, E. E., & Mori, N. (2009). Dubiumin, a chymotrypsin-like serine protease from the seeds of *Solanum dubium* Fresen. *Phytochemistry*, 70(4), 483-491.
- Ahmed, I. A. M., Morishima, I., Babiker, E. E., & Mori, N. (2009). Dubiumin, a chymotrypsin-like serine protease from the seeds of *Solanum dubium* Fresen. *Phytochemistry*, 70(4), 483-491.
- Almonte A. G., & Sweatt, J. D. (2011). Serine proteases, serine protease inhibitors, and protease-activated receptors: roles in synaptic function and behavior. *Brain research*, 1407, 107-122.
- Antão C. M., & Malcata, F. X. (2005). Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(7), 637-650.
- Argos, P., Rossmann, M. G., Grau, U. M., Zuber, H., Frank, G., & Tratschin, J. D. (1979). Thermal stability and protein structure. *Biochemistry*, 18(25), 5698-5703.
- Arima K, Yu J y Iwasaki S. (1970). Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press. Gertrude E. Perlmann L.L., vol. Volume 19. pp. 446-459.
- Balah, M. A., & AbdelRazek, G. M. (2020). Pesticidal activity of *Solanum elaeagnifolium* Cav. Leaves against nematodes and perennial weeds. *Acta Ecologica Sinica*, 40(5), 373-379.
- Balakireva, A. V., Kuznetsova, N. V., Petushkova, A. I., Savvateeva, L. V., y Zamyatnin Jr, A. A. (2019). Trends and prospects of plant proteases in therapeutics. *Current medicinal chemistry*, 26(3), 465-486.
- Banerjee, G., & Ray, A. K. (2017). Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33(2), 119-143.
- Barberis, S., Quiroga, E., Barcia, C., & Liggieri, C. (2013). Effect of laundry detergent formulation

on the performance of alkaline phytoproteases. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(3), 3-3.

- Barekat S., & Soltanizadeh, N. (2017). Improvement of meat tenderness by simultaneous application of high-intensity ultrasonic radiation and papain treatment. *Innovative food science & emerging technologies*, 39, 223-229.
- Bayer, S. B., Gearry, R. B., & Drummond, L. N. (2017). Putative mechanisms of kiwifruit on maintenance of normal gastrointestinal function. *Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(14), 2432-2452.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). Enzymes can be inhibited by specific molecules. *Biochemistry*.
- Beers E. P. (1997). Programmed cell death during plant growth and development. *Cell Death & Differentiation*, 4(8), 649-661.
- Beka, R. G., Krier, F., Botquin, M., Guïama, V. D., Donn, P., Libouga, D. G., ... & Vercaigne-Marko, D. (2014). Characterisation of a milk-clotting extract from *Balanites aegyptiaca* fruit pulp. *International Dairy Journal*, 34(1), 25-31.
- Ben Amira A., Besbes, S., Attia, H., & Blecker, C. (2017). Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. *International journal of food properties*, 20(sup1), S76-S93.
- Bersi, G., Vallés, D., Penna, F., Cantera, A. M., y Barberis, S. (2018). Valorization of fruit by-products of *Bromelia antiacantha* Bertol.: Protease obtaining and its potential as additive for laundry detergents. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101099.
- Bodansky A. (1924). A study of a milk-coagulating enzyme of *Solanum elaeagnifolium*. *Journal of Biological Chemistry*, 61(2), 365-375.
- Chávez-Garay D. R., Gutiérrez-Méndez, N., Valenzuela-Soto, M. E., & García-Triana, A. (2016). Partial characterization of a plant coagulant obtained from the berries of *Solanum elaeagnifolium*. *CyTA-Journal of Food*, 14(2), 200-205.
- Chew L. Y., Toh, G. T., & Ismail, A. (2019). Application of proteases for the production of bioactive peptides. In *Enzymes in Food Biotechnology* (pp. 247-261). Academic Press.
- Cheison, S. C., Bor, E. K., Faraj, A. K., & Kulozik, U. (2012). Selective hydrolysis of  $\alpha$ -lactalbumin by Acid Protease A offers potential for  $\beta$ -lactoglobulin purification in whey proteins. *LWT*, 49(1), 117-122.
- Claverie-Martín, F., & Vega-Hernández, M. C. (2007). Aspartic proteases used in cheese making. In *Industrial enzymes* (pp. 207-219). Springer, Dordrecht.
- Coffeen, W. C., & Wolpert, T. J. (2004). Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *The Plant Cell*, 16(4), 857-873.
- Daniel, R. M., & Danson, M. J. (2010). A new understanding of how temperature affects the catalytic activity of enzymes. *Trends in biochemical sciences*, 35(10), 584-591.
- Daniel, R. M., Danson, M. J., y Eisenthal, R. (2001). The temperature optima of enzymes: a new perspective on an old phenomenon. *Trends in biochemical sciences*, 26(4), 223-225.
- Dash C., Kulkarni, A., Dunn, B., & Rao, M. (2003). Aspartic peptidase inhibitors: implications in

- drug development. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 38(2), 89-119.
- de Farias, V. A., da Rocha Lima, A. D., Costa, A. S., de Freitas, C. D. T., da Silva Araújo, I. M., dos Santos Garruti, D., ... & de Oliveira, H. D. (2020). Noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit as a new source of milk-clotting cysteine proteases. *Food Research International*, 127, 108689.
- de Gante, A. V., Moreno, A. S. y Escoto, F. C. (2016). *Los quesos mexicanos tradicionales*. Universidad Autónoma Chapingo.
- Dekker P. (2019). Dairy enzymes. Vogel, A., & May, O. (Eds.). *Industrial enzyme applications* (pp. 143-166). Weinheim, Germany. John Wiley & Sons.
- Delgado, F. J., Rodríguez-Pinilla, J., González-Crespo, J., Ramírez, R., y Roa, I. (2010). Proteolysis and texture changes of a Spanish soft cheese ('Torta del Casar') manufactured with raw ewe milk and vegetable rennet during ripening. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(3), 512-519.
- Destá, W., Shumbahri, M., & Gebrehiwot, S. (2020). Application of *Ficus carica* L. and *Solanum incanum* L. Extracts in Coagulation of Milk: The Case of Traditional Practice in Ab'ala Area, Afar Regional State, Ethiopia. *Biochemistry Research International*, 2020.
- Di Cera, E. (2009). Serine proteases. *IUBMB life*, 61(5), 510-515.
- Díaz-López M., Moyano-López, F. J., Alarcón-López, F. J., García-Carreno, F. L., & del Toro, M. A. N. (1998). Characterization of fish acid proteases by substrate-gel electrophoresis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 121(4), 369-377.
- Díaz-Mendoza M., Díaz, I., & Martínez, M. (2019). Insights on the Proteases Involved in Barley and Wheat Grain Germination. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2087.
- Dubey, V. K., & Jagannadham, M. V. (2003). Differences in the unfolding of procerain induced by pH, guanidine hydrochloride, urea, and temperature. *Biochemistry*, 42(42), 12287-12297.
- Ekchaweng K., Evangelisti, E., Schornack, S., Tian, M., & Churngchow, N. (2017). The plant defense and pathogen counterdefense mediated by *Hevea brasiliensis* serine protease HbSPA and *Phytophthora palmivora* extracellular protease inhibitor PpEPI10. *PloS one*, 12(5).
- Ellis A. (2019). Protein Modification to Meet the Demands of the Food Industry. *Industrial Enzyme Applications*, 125-141.
- Espósito T. S., Amaral, I. P., Buarque, D. S., Oliveira, G. B., Carvalho Jr, L. B., & Bezerra, R. S. (2009). Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. *Food Chemistry*, 112(1), 125-130.
- Feijoo-Siota, L., & Villa, T. G. (2011). Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 1066-1088.
- Fernández, M. B., Daleo, G. R., & Guevara, M. G. (2015). Isolation and characterization of a *Solanum tuberosum* subtilisin-like protein with caspase-3 activity (StSBTc-3). *Plant Physiology and Biochemistry*, 86, 137-146.
- Figueiredo, J., Sousa Silva, M., & Figueiredo, A. (2018). Subtilisin-like proteases in plant defence: the past, the present and beyond. *Molecular plant pathology*, 19(4), 1017-1028.
- Gajanan, P. G., Elavarasan, K., & Shamasundar, B. A. (2016). Bioactive and functional properties of protein hydrolysates from fish frame processing waste using plant proteases.

Environmental Science and Pollution Research, 23(24), 24901-24911.

- García-Sánchez, G., Sotelo-Romero, C. R., Pacheco-Aguilar, R., Ramírez-Suárez, J. C., Sotelo-Mundo, R., Scheuren-Acevedo, S. M., & Martínez-Porchas, M. (2015). Effect of freezing on protein denaturation and gelling capacity of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 737-742.
- González-Rábade N., Badillo-Corona, J. A., Aranda-Barradas, J. S., & del Carmen Oliver-Salvador, M. (2011). Production of plant proteases in vivo and in vitro—a review. *Biotechnology advances*, 29(6), 983-996.
- Graycar, T. P., Bott, R. R., Power, S. D., & Estell, D. A. (2013). Subtilisins. N. D. Rawlings and G. Salvesen (Ed.), *Handbook of proteolytic enzymes* (Vol. 3). 3148-3155. Academic press.
- Grzonka Z., Jankowska, E., Kasprzykowski, F., Kasprzykowska, R., Lankiewicz, L., Wiczak, W., & Kozak, M. (2001). Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochimica Polonica*, 48(1), 1-20.
- Guiama V. D., Libouga, D. G., Ngah, E., & Mbofung, C. M. (2010). Milk-clotting activity of berries extracts from nine *Solanum* plants. *African Journal of Biotechnology*, 9(25), 3911-3918.
- Gupta, R., Beg, Q., Khan, S., & Chauhan, B. (2002). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(4), 381-395.
- Gurumallesh P., Alagu, K., Ramakrishnan, B., & Muthusamy, S. (2019). A systematic reconsideration on proteases. *International journal of biological macromolecules*, 128, 254-267.
- Hamilton, J. M., Simpson, D. J., Hyman, S. C., Ndimba, B. K., & Slabas, A. R. (2003). Ara12 subtilisin-like protease from *Arabidopsis thaliana*: purification, substrate specificity and tissue localization. *Biochemical Journal*, 370(1), 57-67
- Hamouda, A. B., Zarrad, K., Laarif, A., & Chaieb, I. (2015). Insecticidal effect of *Solanum elaeagnifolium* extracts under laboratory conditions. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 3(3), 187-190.
- Hayes, M. G., Hurley, M. J., Larsen, L. B., Heegaard, C. W., Magboul, A. A., Oliveira, J. C., & Kelly, A. L. (2001). Thermal inactivation kinetics of bovine cathepsin D. *The Journal of dairy research*, 68(2), 267.
- Hedayati, G., & Sani, A. M. (2016). Application of melon serine protease in food processes. *Biotechnol. Ind. J*, 12(1), 18-24.
- Horimoto Y., Dee, D. R., & Yada, R. Y. (2009). Multifunctional aspartic peptidase prosegments. *New biotechnology*, 25(5), 318-324.
- Hou S., Jamieson, P., & He, P. (2018). The cloak, dagger, and shield: proteases in plant pathogen interactions. *Biochemical Journal*, 475(15), 2491-2509.
- Hu, M. L., Rayner, C. K., Wu, K. L., Chuah, S. K., Tai, W. C., Chou, Y. P., ... & Hu, T. H. (2011). Effect of ginger on gastric motility and symptoms of functional dyspepsia. *World journal of gastroenterology: WJG*, 17(1), 105.
- Inouye, K., Kuzuya, K., & Tonomura, B. I. (1998). Effect of salts on the solubility of thermolysin:

a remarkable increase in the solubility as well as the activity by the addition of salts without aggregation or dispersion of thermolysin. *The Journal of Biochemistry*, 123(5), 847-852.

- Jany, K. D., Lederer, G., & Mayer, B. (1986). Amino acid sequence of proteinase K from the mold *Tritirachium album* Limber: Proteinase K a subtilisin-related enzyme with disulfide bonds. *FEBS letters*, 199(2), 139-144.
- Kim J. S., Kim, Y. O., Ryu, H. J., Kwak, Y. S., Lee, J. Y., & Kang, H. (2003). Isolation of stress related genes of rubber particles and latex in fig tree (*Ficus carica*) and their expressions by abiotic stress or plant hormone treatments. *Plant and cell physiology*, 44(4), 412-414.
- Knapp, S., Sagona, E., Carbonell, A. K., & Chiarini, F. (2017). A revision of the *Solanum elaeagnifolium* clade (Elaeagnifolium clade; subgenus *Leptostemonum*, Solanaceae). *PhytoKeys*, (84), 1.
- Kohli A., Narciso, J. O., Miro, B., & Raorane, M. (2012). Root proteases: reinforced links between nitrogen uptake and mobilization and drought tolerance. *Physiologia Plantarum*, 145(1), 165-179.
- Kraut J. (1977). Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annual review of biochemistry*, 46(1), 331-358.
- Kumar, S., Dangi, A. K., Shukla, P., Baishya, D., & Khare, S. K. (2019). Thermozyms: adaptive strategies and tools for their biotechnological applications. *Bioresource technology*, 278, 372-382.
- Kumari M., Sharma, A., & Jagannadham, M. V. (2012). Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. *Food chemistry*, 131(4), 1295-1303.
- Lamsal, B. P., Jung, S., & Johnson, L. A. (2007). Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. *LWT-Food Science and Technology*, 40(7), 1215-1223.
- Lowry O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.
- Mahajan R., Chaudhari, G., & Chopadaa, M. (2015). Report on Biotechnological applications of proteolytic enzymes from lattices of euphorbian plants. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 2(4), 33-337.
- Mamo J., & Assefa, F. (2018). The role of microbial aspartic protease enzyme in food and beverage industries. *Journal of Food Quality*, 2018.
- Mandujano-González V., Villa-Tanaca, L., Anducho-Reyes, M. A., & Mercado-Flores, Y. (2016). Secreted fungal aspartic proteases: a review. *Revista iberoamericana de micología*, 33(2), 76-82.
- Mazorra-Manzano M. A., Moreno-Hernández, J. M., Ramírez-Suarez, J. C., de Jesús 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. *LWT-Food Science and Technology*, 54(2), 325-330.
- Mazorra-Manzano M. A., Ramírez-Suarez, J. C., & Yada, R. Y. (2018). Plant proteases for bioactive peptides release: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(13), 2147-2163.

- Mazorra-Manzano, M. A., Mora-Cortes, W. G., Leandro-Roldan, M. M., González-Velázquez, D. A., Torres-Llanez, M. J., Ramírez-Suarez, J. C., y Vallejo-Córdoba, B. (2020). Production of whey protein hydrolysates with angiotensin-converting enzyme-inhibitory activity using three new sources of plant proteases. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28, 101724.
- 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(5-6), 515-523.
- Mendieta J. R., Pagano, M. R., Munoz, F. F., Daleo, G. R., & Guevara, M. G. (2006). Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization. *Microbiology*, 152(7), 2039-2047.
- Misas-Villamil J. C., van der Hoorn, R. A., & Doehlemann, G. (2016). Papain-like cysteine proteases as hubs in plant immunity. *New Phytologist*, 212(4), 902-907.
- Moreno-Hernández, J. M. (2013). Caracterización de la actividad coagulante y proteolítica de extractos de flor de naranja (*Citrus aurantium* L.) y purificación parcial de una de sus proteasas (Tesis de maestría). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo Sonora, México.
- Moreno-Hernández, J. M., Hernández-Mancillas, X. D., Navarrete, E. L. C., Mazorra-Manzano, M. Á., Osuna-Ruiz, I., Rodríguez-Tirado, V. A., & Salazar-Leyva, J. A. (2017a). Partial characterization of the proteolytic properties of an enzymatic extract from “Aguama” *Bromelia pinguin* L. fruit grown in Mexico. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(1), 181-196.
- Moreno-Hernández, J. M., Pérez, M. D. J. B., Osuna-Ruiz, I., Salazar-Leyva, J. A., Ramirez-Suarez, J. C., & Mazorra-Manzano, M. Á. (2017b). Exploring the milk-clotting properties of extracts from *Bromelia pinguin* fruit. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2019, 62-66.
- Moussaoui A., Nijs, M., Paul, C., Wintjens, R., Vincentelli, J., Azarkan, M., & Looze, Y. (2001). Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(4), 556-570
- Nagase H. (2001). Metalloproteases. *Current protocols in protein science*, 24(1), 21-4.
- Nasr, A. I., Mohamed Ahmed, I. A., & Hamid, O. I. (2016). Characterization of partially purified milk-clotting enzyme from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Food science & nutrition*, 4(5), 733-741.
- Niyonzima, F. N., & More, S. (2015). Detergent-compatible proteases: microbial production, properties, and stain removal analysis. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45(3), 233-258.
- Ortiz S. E. M., & Wagner, J. R. (2002). Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. *Food research international*, 35(6), 511-518.
- Otegui M. S., Noh, Y. S., Martínez, D. E., Vila Petroff, M. G., Andrew Staehelin, L., Amasino, R. M., & Guamet, J. J. (2005). Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity

- develop in leaves of Arabidopsis and soybean. *The Plant Journal*, 41(6), 831-844.
- Page, M. J., & Di Cera, E. (2008). Serine peptidases: classification, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(7), 1220-1236.
- Pande M., Dubey, V. K., Yadav, S. C., & Jagannadham, M. V. (2006). A novel serine protease cryptolepain from *Cryptolepis buchmanii*: purification and biochemical characterization. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(26), 10141-10150.
- Patel A. K., Singh, V. K., & Jagannadham, M. V. (2007). Carnein, a serine protease from noxious plant weed *Ipomoea carnea* (morning glory). *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(14), 5809-5818.
- Philipps-Wiemann, P. (2018). Proteases general aspects. In *Enzymes in Human and Animal Nutrition* (pp. 257-266). Academic Press.
- Pratish, A., Gupta, A., & Bhalla, T. C. (2013). Microbial proteases: Prospects and challenges. In *Microbiology application* (pp. 30-48). Bhalla Publishers Dehradun.
- Pucci, F., & Rooman, M. (2017). Physical and molecular bases of protein thermal stability and cold adaptation. *Current opinion in structural biology*, 42, 117-128.
- Ramos, M. V., Freitas, C. D. T., Morais, F. S., Prado, E., Medina, M. C., & Demarco, D. (2019). Plant Latex and Latex-Borne Defense.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 597-635.
- Rawlings N. D. (2020). Twenty-five years of nomenclature and classification of proteolytic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1868(2), 140345.
- Rigoldi, F., Donini, S., Redaelli, A., Parisini, E., & Gautieri, A. (2018). Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *APL bioengineering*, 2(1), 011501.
- Roberts, I. N., Caputo, C., Criado, M. V., & Funk, C. (2012). Senescence-associated proteases in plants. *Physiologia Plantarum*, 145(1), 130-139.
- Rocha G. L., Fernández, J. H., Oliveira, A. E. A., & Fernández, K. V. S. (2017). Programmed cell death-related proteases in plants. *Enzyme Inhibitors and Activators*, 25.
- Rohamare, S., Javdekar, V., Dalal, S., Nareddy, P. K., Swamy, M. J., & Gaikwad, S. M. (2015). Acid stability of the kinetically stable alkaline serine protease possessing polyproline II fold. *The protein journal*, 34(1), 60-67.
- Salas, C. E., Dittz, D., & Torres, M. J. (2018). Plant proteolytic enzymes: Their role as natural pharmacophores. In *Biotechnological applications of plant proteolytic enzymes* (pp. 107-127). Springer, Cham.
- Salguero-Linares J., & Coll, N. S. (2019). Plant proteases in the control of the hypersensitive response. *Journal of experimental botany*, 70(7), 2087-2095.
- Scaldeferro M., Chiarini, F., Santiñaque, F. F., Bernardello, G., & Moscone, E. A. (2012). Geographical pattern and ploidy levels of the weed *Solanum elaeagnifolium* (Solanaceae) from Argentina. *Genetic resources and crop evolution*, 59(8), 1833-1847.
- Shah M A., Mir, S. A., & Paray, M. A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in

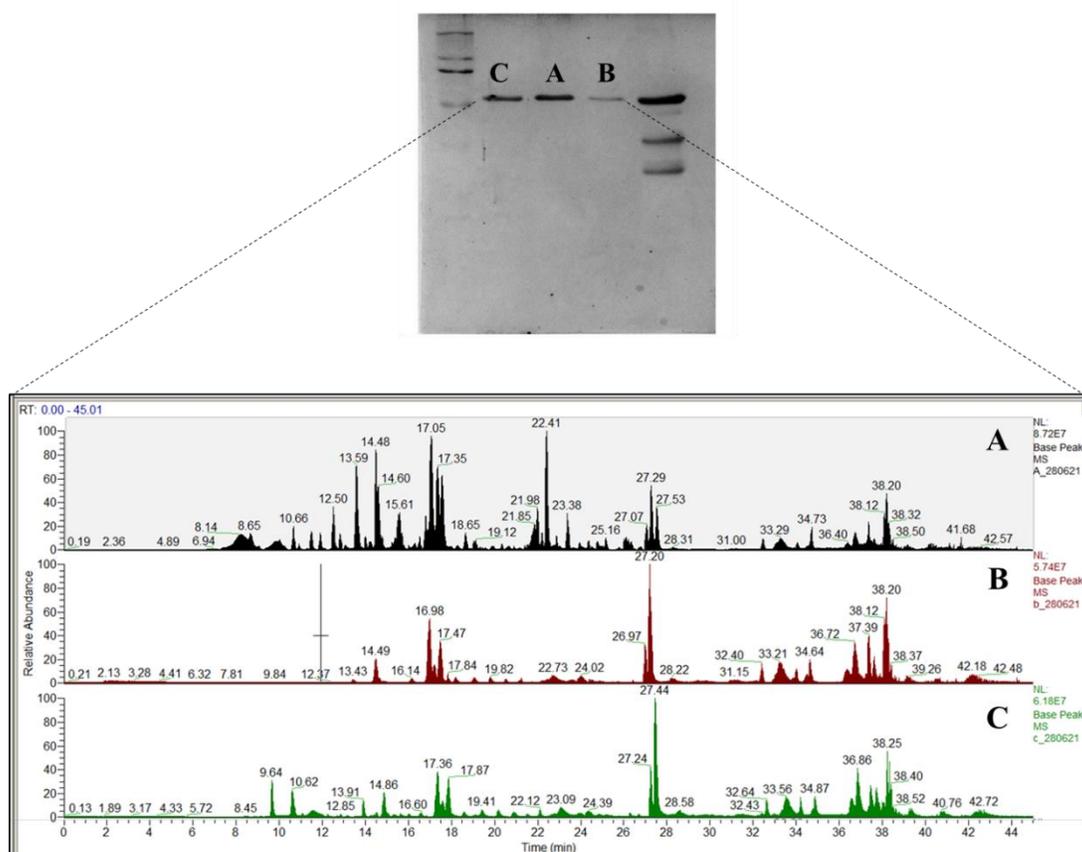
cheesemaking: a review. *Dairy Science & Technology*, 94(1), 5-16.

- Shahid, M., Mohammad, F., Chen, G., Tang, R. C., & Xing, T. (2016). Enzymatic processing of natural fibres: white biotechnology for sustainable development. *Green Chemistry*, 18(8), 2256-2281.
- Sharma, A., & Kishan, K. R. (2011). Serine protease inhibitor mediated peptide bond re-synthesis in diverse protein molecules. *FEBS letters*, 585(21), 3465-3470.
- Sharma, A., Kumari, M., & Jagannadham, M. V. (2009). Benghalensin, a highly stable serine protease from the latex of medicinal plant *Ficus benghalensis*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(23), 11120-11126.
- Sharma, A., Kumari, M., & Jagannadham, M. V. (2012). Religiosin C, a cucumisin-like serine protease from *Ficus religiosa*. *Process Biochemistry*, 47(6), 914-921.
- Siddiqui, K. S. (2015). Some like it hot, some like it cold: Temperature dependent biotechnological applications and improvements in extremophilic enzymes. *Biotechnology advances*, 33(8), 1912-1922.
- Siklos M., Ben., Aissa, M., & Thatcher, G. R. (2015). Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(6), 506-519.
- Singh, V. K., Patel, A. K., Moir, A. J., & Jagannadham, M. V. (2008). Indicain, a dimeric serine protease from *Morus indica* cv. K2. *Phytochemistry*, 69(11), 2110-2119.
- Sinha, R., & Khara, S. K. (2013). Thermostable proteases. *Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology, biotechnology of thermophiles*.
- Stroberg, W., & Schnell, S. (2016). On the estimation errors of KM and V from time-course experiments using the Michaelis–Menten equation. *Biophysical chemistry*, 219, 17-27.
- Štulík, K., Pacáková, V., & Tichá, M. (2003). Some potentialities and drawbacks of contemporary size-exclusion chromatography. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 56(1-3), 1-13.
- Synowiecki, J. (2010). Some applications of thermophiles and their enzymes for protein processing. *African journal of biotechnology*, 9(42), 7020-7025.
- Szewińska J., Simińska, J., & Bielawski, W. (2016). The roles of cysteine proteases and phytocystatins in development and germination of cereal seeds. *Journal of plant physiology*, 207, 10-21.
- Takahashi K., Athauda, S. B., Matsumoto, K., Rajapakshe, S., Kuribayashi, M., Kojima, M., & Inoue, H. (2005). Nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases: enzymatic and structural characteristics. *Current Protein and Peptide Science*, 6(6), 513-525.
- Tantamacharik, T., Carne, A., Agyei, D., Birch, J., & Bekhit, A. E. D. A. (2018). Use of Plant Proteolytic Enzymes for Meat Processing. In *Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes* (pp. 43-67). Springer, Cham.
- Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1-11.
- Tito, F. R., Pepe, A., Tonon, C. V., Daleo, G. R., y Guevara, M. G. (2020). Determination and characterisation of milk-clotting activity of two *Solanum tuberosum* aspartic proteases

- (StAPs). *International Dairy Journal*, 104, 104645.
- Tripathi, P., Tomar, R., & Jagannadham, M. V. (2011). Purification and biochemical characterisation of a novel protease streblin. *Food Chemistry*, 125(3), 1005-1012.
- Veríssimo, P., Esteves, C., Faro, C., & Pires, E. (1995). The vegetable rennet of *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. *Biotechnology letters*, 17(6), 621-626.
- Vojcic, L., Pitzler, C., Körfer, G., Jakob, F., Martinez, R., Maurer, K. H., & Schwaneberg, U. (2015). Advances in protease engineering for laundry detergents. *New biotechnology*, 32(6), 629-634.
- Wallace, A., Eady, S., Drummond, L., Hedderley, D., Ansell, J., & Gearry, R. (2017). A pilot randomized cross-over trial to examine the effect of kiwifruit on satiety and measures of gastric comfort in healthy adult males. *Nutrients*, 9(7), 639.
- Wang, W., Ma, T., Zhang, B., Yao, N., Li, M., Cui, L., ... & Cheng, J. (2014). A novel mechanism of protein thermostability: a unique N-terminal domain confers heat resistance to Fe/Mn-SODs. *Scientific reports*, 4(1), 1-9.
- Ward, O. P. (2011). Proteases. *Comprehensive biotechnology*, 571.
- Wei, Z. Y., Zhang, Y. Y., Wang, Y. P., Fan, M. X., Zhong, X. F., Xu, N., ... & Xing, S. C. (2016). Production of bioactive recombinant bovine chymosin in tobacco plants. *International journal of molecular sciences*, 17(5), 624.
- Whitmore L., & Wallace, B. A. (2004). DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic acids research*, 32(suppl\_2), W668-W673.
- Woinue Y., Ayele, A., Hailu, M & Chaurasiya, R.S. (2019). Comparison of different meat tenderization methods: a review. *Food Research*, 4(3), 571-577.
- Yadav, S. C., Pande, M., & Jagannadham, M. V. (2006). Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant *Euphorbia milii*. *Phytochemistry*, 67(14), 1414-1426.
- Yousif, B. H., McMahon, D. J., & Shammet, K. M. (1996). Milk-clotting enzyme from *Solanum dobium* plant. *International Dairy Journal*, 6(6), 637-644.
- Yousif, B. H., McMahon, D. J., y Shammet, K. M. (1996). Milk-clotting enzyme from *Solanum dobium* plant. *International Dairy Journal*, 6(6), 637-644.
- Želisko A., García-Lorenzo, M., Jackowski, G., Jansson, S., & Funk, C. (2005). AtFtsH6 is involved in the degradation of the light-harvesting complex II during high-light acclimation and senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(38), 13699-13704.
- Zhou, X. X., Wang, Y. B., Pan, Y. J., & Li, W. F. (2008). Differences in amino acids composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins. *Amino acids*, 34(1), 25-33.

## 10. ANEXOS

### 10.1. Cromatogramas de Iones Totales del Análisis LC-MS/MS de las Bandas de Proteínas de las Fracciones Recuperadas por CII Empleando una Columna MonoQ 5/50 GL



\*Bandas **A** y **B** corresponden a las fracciones F1 y F2, respectivamente. La banda **C** corresponde a la fracción que no interactúa con la columna.

10.2. Proteínas de *S. elaeagnifolium* Identificadas por Espectrometría de Masas en Tándem (LC-MS/MS)

Banda	Proteína	Organismo	Identificador	Mr/pI	pid/CS	Péptidos identificados
A	Subtilisin-like-protease STB1.7	<i>Solanum pennellii</i>	XP_015085422.1	78820/6.22	13/21.7%	<b>IKATVK</b> <b>DSNYGK</b> VNCSEVK + Carbamidomethyl (C) KVNCSEVK + Carbamidomethyl (C) RGS LTDPAIR <b>LTYQVTFK</b> CTHPDWSPAAIK <b>TVTNVGDATSSYK</b> <b>NAPTVAAFSSRGPSR</b> <b>GVCESNFTN</b> NCNNK + 2 Carbamidomethyl (C) <b>SADAHVLPALVVSAADGTK</b> <b>STFNII</b> SGTSMSCPHLSGVAALLK + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M) <b>SILEAQLN</b> YPSFSIFGLG <b>STPQTYTR</b> TVTNVGDATSSYK
A	Subtilisin-like-protease STB1.4	<i>Solanum pennellii</i>	XP_027774882.1	66700/6.36	7/15.8%	IVLCR + Carbamidomethyl (C) GKIVLCR + Carbamidomethyl (C) <b>GVCESNFTNK</b> <b>NAPMVA</b> AFSSR + Oxidation (M) <b>SADAHVLPALVVSAADGTK</b> <b>STFNII</b> SGTSMSCPHLSGVAALLK + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M) SYKLGNGSPIDDDGHGHTASTAAGAFVK
A	Subtilisin-like-protease STB1.8	<i>Solanum pennellii</i>	XP_027774880.1	79005/6.41	12/14.4%	<b>IKATVK</b> <b>DSNYGK</b> EVGKMLQR + Oxidation (M) GVCESNLTNK DAGGVGMIVIK + Oxidation (M) <b>LTYQVTFK</b> GVCESNLTNK + Carbamidomethyl (C) LGSTPQTYTR

						MLQRQVNCLK + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M) <b>TVTNVGDATSSYK</b> GVCESNLTKCENK + Carbamidomethyl (C) <b>STFNISGTSMSCPHLSGVAALLK</b> + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M)
<b>A</b>	Subtilisin-like-protease STB1.1	<i>Solanum pennellii</i>	XP_015080708.1	81858/9.18	9/16.1%	IAVYK IVVCEK GKIVVCEK APIVAAFSSR DSGMPPVPSR + Oxidation (M) SVHRDWSPAIAK GEQVKLAGGAGMIMVNR + 2 Oxidation (M) MNFRCMFLACIVSVISSTLAEQDIYVVHMDK + Carbamidomethyl (C) LAGGAGMIMVNRVEEGDELYADAHVLPATSLGASAGIAIK + 2 Oxidation (M)
<b>B</b>	Subtilisin-like-protease STB1.8	<i>Solanum pennellii</i>	XP_027774880.1	79005/6.41	4/7.9%	<b>LTYQVTFESK</b> LGSTPQTYTR <b>TVTNVGDATSSYK</b> NTKSTFNISGTSMSCPHLSGVAALLK + Oxidation (M)
<b>B</b>	Subtilisin-like-protease STB1.7	<i>Solanum pennellii</i>	XP_015085422.1	78820/6.22	4/9.1%	<b>LTYQVTFESK</b> <b>TVTNVGDATSSYK</b> <b>SADAHVLPALVVSADGTK</b> NTKSTFNISGTSMSCPHLSGVAALLK + Oxidation (M)
<b>B</b>	Subtilisin-like-protease STB1.7	<i>Solanum pennellii</i>	XP_015085423.1	78942/5.69	3/4.6%	LTYQVTFESK STHPDWSPAIAK <b>TVTNVGDATSSYK</b>
<b>B</b>	Subtilisin-like-protease STB1.1	<i>Solanum pennellii</i>	XP_015080708.1	81858/9.18	2/2%	IAVYK APIVAAFSSR
<b>C</b>	Subtilisin-like-protease STB1.7	<i>Solanum pennellii</i>	XP_015085422.1	78820/6.22	8/16.6%	VNCSEVK + Carbamidomethyl (C) <b>LTYQVTFESK</b> LTAEQVKEMEK + Oxidation (M) <b>TVTNVGDATSSYK</b>

						TSSSSNIEVVEGFLK SADAHVLPALVVSAADGTK STFNISGTSMSCPHLSGVAALLK + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M) ILAYMNSTSSPVATIAFQGTIIGDK + Oxidation (M)
--	--	--	--	--	--	--

\*Los nombres de las bandas corresponden a los presentados en el anexo **10.1**. Mr/pI: masa molecular/punto isoelectrico; pid/CS: número de péptidos identificados/cobertura de secuencia en %. El número de acceso para cada proteína corresponden a la base de datos de proteínas del NCIB. Las secuencias marcadas con el mismo color corresponden a péptidos identificados en las diferentes secuencias de Subtilisin like- proteasas de *Solanum pennellii*.