



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

**CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD
COAGULANTE Y PROTEOLÍTICA DE EXTRACTOS DE
FLOR DE NARANJO (*Citrus aurantium* L.) Y
PURIFICACIÓN PARCIAL DE UNA DE SUS PROTEASAS**

por:

Jesús Martín Moreno Hernández

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

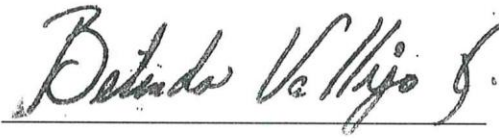
APROBACIÓN

Los miembros del comité asignado para revisar la tesis de Jesús Martín Moreno Hernández, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, dentro del programa de Maestría en Ciencia de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal.



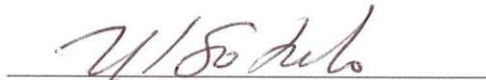
Dr. Miguel Ángel Mazorra Manzano

Director de Tesis



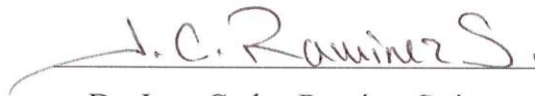
Dra. Belinda Vallejo Galland

Asesor



Dr. Rogerio Sotelo Mundo

Asesor



Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez

Asesor



Dr. Esteban Sánchez Chávez

Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis 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 del autor, 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 del Director 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 de tesis.



Dr. Pablo Wong González

Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el financiamiento otorgado para la realización de mis estudios de maestría.

Agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD); por permitirme realizar mis estudios de posgrado. A la Coordinación en Tecnología de Alimentos de Origen Animal por darme la oportunidad de formar parte de esta coordinación y concluir satisfactoriamente este trabajo.

A la Coordinación de Programas Académicos, por todo el manejo de la documentación y trámites correspondientes para la realización de mis estudios de maestría y culminación de los mismos.

A mi director de tesis el **Dr. Miguel Ángel Mazorra Manzano**, por abrirme la puerta del conocimiento. Por permitirme realizar mi estancia de verano científico y darme la oportunidad de ser su primer estudiante de maestría. Gracias por todo el apoyo moral e intelectual brindado para la realización de mi trabajo de tesis, además de la confianza y paciencia durante el desarrollo y culminación de mi trabajo experimental. Gracias por todos los consejos y experiencias compartidos durante esta etapa. Por permitirme formar parte del grupo de trabajo de lácteos y sobre todo por formar parte importante de mí desarrollo profesional. ¡Gracias!

A los miembros del comité: **Dra. Belinda Vallejo Galland, Dr. Rogerio Sotelo Mundo, Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez y Dr. Esteban Sánchez Chávez**, por sus observaciones y sugerencias para el mejoramiento y culminación de este trabajo.

Al **Dr. Aarón F. González Córdova y el Dr. Adrián Hernández Mendoza**, por todos sus comentarios para la realización de este trabajo y por abrirme las puertas de sus laboratorios para el desarrollo del trabajo experimental. ¡Muchas gracias!

A la **Dra. María de Jesús Torres Llenez**, por todos los consejos y observaciones durante mis estudios de maestría, sobre todo el apoyo técnico e intelectual durante el trabajo de tesis. ¡Gracias por todo!

A la M.C. Carmen Estrada y el M.C. Ricardo Reyes por todo el apoyo técnico otorgado para la realización de este trabajo.

Al personal del Laboratorio de Bioquímica y Calidad de Productos Pesqueros, M.C. María E. Lugo, M.C. Guillermina García, M.C. Gisela Carvallo, Dra. Susana Scheuren, M.C. Aristeo Villalobos, M.C. Hugo Ramírez, M.C. Aarón Salazar por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de mi trabajo de tesis. ¡Gracias!

A mis compañeros del Laboratorio de Productos Lácteos, por todos los momentos vividos así como el apoyo durante mi trabajo.

Gracias a **Ángel Ortiz, Ángeles de la Rosa, José A. Martínez y Monserrat Félix** por todos esos momentos especiales, por esas charlas y experiencias compartidas, gracias por brindarme su amistad sincera y por formar parte de mi desarrollo personal.

A todos mis profesores por haber contribuido de una manera importante en mi desarrollo profesional y que sin sus enseñanzas y conocimientos no hubiera sido posible la culminación de mis estudios de maestría. ¡Gracias por todo!

Sobre todo gracias a **Gerardo Reyna** por todo el apoyo prestado en la facilitación de información y bibliografía para el desarrollo de esta tesis.

Gracias a todos los que directa e indirectamente formaron parte de este trabajo, sin su colaboración no hubiera sido posible la realización del mismo.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a toda mi familia, mis padres **Martín Moreno Rochín** y **Aidé Mercedes Hernández Sánchez**, por darme la vida, por apoyarme en todas las decisiones que he tomado y estar siempre cuando más los he necesitado. Quiero expresar mi reconocimiento y admiración para ustedes, por demostrarme que con trabajo duro y dedicación se logran grandes cosas. Siempre he tratado que se sientan orgullosos de cada uno de mis logros, pero no lo habría logrado sin sus palabras de aliento y motivación. Gracias por existir.

¡Hoy y siempre el reconocimiento es para ustedes!

A mis hermanos **José y Alejandro Moreno Hernández**, por ser siempre una motivación para seguir adelante en mi preparación profesional, porque siempre he hecho las cosas pensando en ustedes. Este logro no es sólo mío; sino de ustedes también.

Para mi tía **Teresa de Jesús López Sánchez**, por ser una gran mujer y como una madre para mí, por todo el apoyo brindado en mi desarrollo profesional y personal. Por ser uno de los pilares en mi vida, las páginas de esta tesis no bastarían para agradecerle todo el amor y el cariño. Especialmente quiero dedicar este trabajo a mi primo **Carlos Saúl Ruffo López**, aunque ya no estas con nosotros, te llevaremos por siempre en el corazón, siempre serás parte de esta familia que te amo desde el primer día. DEP, algún día nos volveremos a ver. Se te extraña.

En especial quiero dedicar no sólo este, sino todos y cada uno de mis logros a **Arlet Gpe. Cruz Calderón**, por ser el amor de mi vida, una parte indisoluble de mí ser. Por apoyarme hoy y siempre. Gracias por todos esos momentos tan maravillosos que hemos vivido y por amarme con esa forma tan especial. Gracias a ti y a toda tu familia que me han mostrado un cariño sincero desde el primer día que los conocí. Gracias por existir.

Este trabajo es dedicado a todas y cada una de las personas que han formado parte de mi vida; porque lo que hoy soy, se los debo a ustedes. Gracias

CONTENIDO

	Página
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tablas	x
Resumen	xi
Abstract	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Clasificación y Distribución de las Enzimas Proteolíticas.....	3
2.2. Características Bioquímicas de las Proteasas	7
2.2.1. Cisteín Proteasas (CPs).....	7
2.2.2. Serín Proteasas (SPs).....	11
2.2.3. Proteasas Aspárticas (PAs).....	12
2.3. Funciones Biológicas de las Proteasas Vegetales	14
2.4. Aplicaciones Biotecnológicas de las Proteasas Vegetales	18
2.4.1. Formulación y Tratamiento de Bebidas.....	18
2.4.2. Ablandamiento Enzimático de Carnes.....	19
2.4.3. Producción de Hidrolizados Proteicos Funcionales y Péptidos Bioactivos.....	20
2.4.4. Nuevos Coagulantes de la Leche para la Elaboración de Quesos.....	21
2.5. Flor de Naranja como Nueva Fuente de Proteasas	23
III. HIPÓTESIS.....	25
IV. OBJETIVOS	26
V. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1. Materia Prima	27
5.2. Obtención de los Extractos Crudos de Flor de Naranja (ECFN).....	27
5.3. Determinación del Contenido de Proteína	28
5.4. Actividad Coagulante de la Leche	28
5.5. Actividad Proteolítica Total en ECFN.....	29
5.6. Efecto del pH Sobre la Actividad Proteolítica de ECFN	30
5.7. Actividad Proteolítica con Sustrato Específico.....	30
5.8. Hidrólisis de Sustratos Naturales por ECFN	31
5.9. Protocolo de Purificación.....	32

5.10. Análisis de Proteínas por Electroforesis SDS-PAGE	33
5.11. Actividad de Proteasas por Zimografía.....	34
5.12. Efecto de Inhibidores Sobre la Actividad Proteolítica.....	34
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
6.1. Contenido de Proteína en Extractos Crudos de Flor de Naranja	36
6.2. Caracterización de la Actividad Coagulante en Extractos Crudos de Flor de Naranja... 38	
6.3. Efecto del pH sobre la Actividad Proteolítica.....	41
6.4. Efecto del Tipo de Sustrato Sobre la Actividad Proteolítica	44
6.5. Hidrólisis de Proteínas Miofibrilares por Extractos Crudos de Flor de Naranja	46
6.6. Comparación del Perfil Peptídico de Caseínas Hidrolizadas por ECFN y Quimosina... 49	
6.7. Efecto de Inhibidores Sobre la Actividad Proteolítica en ECFN.....	52
6.8. Purificación Parcial de una Proteasa de Citrus aurantium (CitrusP).....	55
VII. CONCLUSIONES.....	65
VIII. REFERENCIAS.....	67

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Clasificación de peptidasas de acuerdo al sitio de corte.....	5
Figura 2. Estructura terciaria de la papaína y su mecanismo catalítico.	8
Figura 3. Análisis de proteínas por SDS-PAGE de extractos de flor y hojas de naranjo.	37
Figura 4. Efecto de la temperatura sobre la actividad coagulante de ECFN.....	39
Figura 5. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica de flor de naranjo.	42
Figura 6. Hidrólisis de seroalbúmina bovina, hemoglobina y caseínas por proteasas de flor de naranjo.	45
Figura 7. Hidrólisis de proteínas del músculo de tilapia por proteasas de ECFN.....	47
Figura 8. Hidrólisis de caseínas por proteasas de flor de naranjo y su comparación con quimosina.	50
Figura 9. Efecto de inhibidores sobre la actividad de proteasas del ECFN utilizando hemoglobina como sustrato.....	53
Figura 10. Efecto de inhibidores sobre la actividad caseinolítica de proteasas del ECFN.	54
Figura 11. Cromatografía de intercambio aniónico utilizando DEAE-Sepharose.....	56
Figura 12. Monitoreo de la purificación por SDS-PAGE y zimografía.....	60
Figura 13. Efecto de inhibidores de proteasas sobre la actividad de CitrusP.	62
Figura 14. Degradación de hemoglobina por CitrusP parcialmente purificada y su inhibición.	63
Figura 15. Hidrólisis de caseínas por CitrusP parcialmente purificada y su inhibición. .	64

Lista de Tablas

	Página
Tabla 1. Características bioquímicas de las proteasas vegetales.....	9
Tabla 2. Purificación parcial de una proteasas de <i>C. aurantium</i> (CitrusP).....	59

Resumen

Las enzimas proteolíticas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Su diversidad en funciones biológicas y múltiples aplicaciones en medicina, industria y alimentos ha incentivado su aislamiento a partir de diferentes microorganismos, animales y plantas. Una de las aplicaciones de proteasas en alimentos contempla el uso de quimosina (renina o cuajo) para la coagulación de la leche en la producción de quesos. Tradicionalmente, la fuente natural de quimosina ha sido el estómago de terneros, no obstante, su forma obtenida por expresión recombinante es la que más se comercializa para este fin. Las características de algunas proteasas vegetales similares a quimosina han incentivado la búsqueda de nuevas fuentes y permitido su utilización en la manufactura de diferentes tipos de quesos en países tales como España y Portugal. El objetivo de este trabajo fue evaluar las características proteolíticas y coagulantes de extractos de flor de naranjo (ECFN) *Citrus aurantium*, así como, determinar el tipo de proteasas involucradas en su actividad. La determinación de actividad proteolítica evidenció la presencia de más de un tipo de proteasas activas en distintas regiones de pH (2.5-12.0). La actividad coagulante del ECFN mostró un rango óptimo de coagulación entre 60 y 70°C y tiempos comparables al obtenido con cuajo comercial. La inhibición de la actividad proteolítica del ECFN con pepstatina A, sugirió la presencia de proteasas aspárticas; por otra parte la sensibilidad a leupeptina y al agente reductor ditiotreitól, la presencia de proteasas tipo serina y cisteína. La acción de las proteasas ECFN sobre distintas proteínas alimentarias tales como albúmina de suero bovino, hemoglobina, caseínas y proteínas miofibrilares, permitió explorar su posible uso en la producción de hidrolizados proteicos. Además, el establecimiento de un protocolo de purificación parcial de una de las proteasas en el ECFN, permitió identificar que proteasas tipo serina y cisteína se encuentran involucradas en el proceso de coagulación de la leche. Los resultados de la presente investigación demuestran que la flor de naranjo representa una fuente de enzimas proteolíticas con potencial de aplicación en distintos procesos tecnológicos (e.g., producción de quesos, hidrolizados proteicos funcionales y/o péptidos bioactivos). Se recomienda profundizar en estudios de aislamiento y caracterización de

proteasas presente en flor de cítricos para un mejor entendimiento de su relación estructura-función, así como su participación en los distintos procesos fisiológicos de la planta (e.g., desarrollo, reproducción y senescencia).

Palabras clave: *Citrus aurantium*, flor de naranjo, actividad coagulante de la leche, proteasas vegetales, hidrolizados proteicos, caracterización enzimática, flor de azahar.

Abstract

Proteolytic enzymes are wide-distributed in nature. Their diversity of biological functions and multiple applications in medicine, food and industry have motivated their isolation from microorganisms, animals and plants. A typical application of proteases in food includes the use of chymosin (rennet) for milk coagulation during cheese-making. Traditionally, the natural source of chymosin is the fourth stomach of calves; however its recombinant form is the most commercialized. Plants are an attractive source of proteases as natural coagulants for cheese making and have stimulated the search of new sources. Plant proteases with chymosin-like characteristics have been used in the manufacturing of traditional cheeses in countries such as Portugal and Spain. The objectives of this research were to evaluate the proteolytic and milk-clotting activities of citrus flower extracts (CFE) from *Citrus aurantium* as potential source of proteases for cheese-making and elucidate the type of proteases involved in these activities. The proteases in CFE were active in a broad pH range (2.5-12.0) due possibly to the presence of different types of proteases. Milk-clotting activity was temperature dependent with a maximum between 60 and 70 °C. Inhibition studies suggested that enzymatic activity in CFE was due to the action of aspartic, serine and cysteine proteases since it was sensitivity to pepstatin A, leupeptine and DTT. CFE proteases were able to act against several food proteins such as bovine serum albumin, hemoglobin, casein and myofibrillar proteins showing its potential use in the production of protein hydrolysates. In addition, the partial purification of one citrus flower proteases present in CFE and inhibitions studies support that serine and cysteine proteases are involved in the milk coagulation process. In conclusion, citrus flowers offer a new source of proteases with potential use in biotechnological processes such as cheese and protein hydrolysates production. Further studies related with the isolation and characterization of proteases present in citrus plant and their role in various physiological processes such as development, reproduction and senescence for a better understanding in structure-function relationship, are recommended.

Key words: *Citrus aurantium*, citrus blossom, proteolytic activity, milk-clotting activity, plant proteases, protein hydrolysates, enzymatic characterization, protein purification.

I. INTRODUCCIÓN

Las proteasas pertenecen a un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza, desempeñando diferentes funciones regulatorias tanto en organismos procariotas como eucariotas. Estas enzimas se encuentran involucradas en diferentes procesos fisiológicos tales como digestión, defensa, reproducción, senescencia y muerte celular (van der Hoorn y Jones, 2004; Mithofer, 2011; Roberts *et al.*, 2012). En esencia todas las proteasas catalizan la hidrólisis de proteínas, es decir la ruptura del enlace peptídico. Estas enzimas se han clasificado de acuerdo a sus características bioquímicas y estructurales (Barrett *et al.*, 2001). Su diversidad de funciones ha incentivado a la comunidad científica y a la industria para su obtención, caracterización e incorporación en diversos procesos biotecnológicos tales como el tratamiento enzimático de efluentes, clarificación de bebidas, formulación de detergentes, agentes para el ablandamiento de carne y en la coagulación de la leche para la elaboración de quesos (Kirk *et al.*, 2002; Kong *et al.*, 2007; Mazorra-Manzano *et al.*, 2013).

La industria láctea utiliza ampliamente una preparación enzimática, compuesta principalmente de quimosina denominada “cuajo” (también conocida como renina), para coagular la leche y elaborar diferentes tipos de quesos. La quimosina es una proteasa ácida que hidroliza de manera específica las proteínas de la leche (i.e., Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la κ -caseína) provocando la coagulación de la leche (Fox, 1993; Horne y Banks, 2004). Inicialmente esta enzima fue extraída del estómago de terneros, sin embargo debido al aumento en la producción industrial de quesos y la disminución de su fuente de aislamiento, se ha promovido la búsqueda de nuevas fuentes de proteasas con características similares a quimosina. Sin embargo, la mayoría de las enzimas propuestas como coagulante han resultado ser ineficientes para este proceso por la excesiva proteólisis que presentan, generando sabores desagradables en los quesos producidos

(Jacob *et al.*, 2011). Recientemente se ha encontrado que extractos de enzimáticos de algunas plantas contienen proteasas con características tipo quimosina que pueden ser utilizadas para coagular la leche (Llorente *et al.*, 2004; Sidrach *et al.*, 2005). Por ejemplo, la flor de *Cynara cardunculus* posee diferentes tipos de proteasas con la capacidad para coagular la leche en condiciones adecuadas y producir quesos con características únicas. Sus extractos enzimáticos se han utilizado desde hace muchos años en la elaboración de quesos artesanales altamente valorados en países como Portugal (i.e. Serra da Estrella) y España (i.e. Torta del Casar) (Verissimo *et al.*, 1995; Fernández-Salguero *et al.*, 2002). No obstante, aún persiste la necesidad de nuevos sustitutos del cuajo por lo que se siguen explorando nuevas fuentes con este propósito.

En este trabajo se exploran las características de la flor de naranjo (*C. aurantium* L.) como nueva fuente de proteasas y su potencial de aplicación en procesos biotecnológicos alimentarios. El objetivo de la presente investigación consistió en la caracterización de la actividad proteolítica y coagulante de extractos de flor de naranjo, así como, elucidar el tipo de proteasas involucradas en el proceso de coagulación mediante protocolos de purificación e inhibición. Los aportes de este trabajo permitirán la utilización de proteasas de naranjo en procesamiento de alimentos y otros procesos biotecnológicos en futuras investigaciones. Los resultados expuestos en este trabajo demuestran la necesidad de continuar profundizando en la purificación y caracterización de las proteasas de cítricos para un mejor entendimiento de la relación estructura-función y elucidar su presencia a los cambios fisiológicos que experimenta la flor de naranjo durante sus diferentes estadios de desarrollo.

II. ANTECEDENTES

2.1. Clasificación y Distribución de las Enzimas Proteolíticas

Las proteasas (enzimas proteolíticas) son un grupo amplio e importante de enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos de proteínas. Estas enzimas ocupan una posición central en el metabolismo de todos los organismos, intervienen en diferentes procesos fisiológicos y su actividad se encuentra estrictamente regulada por la célula (Alonso y Granell, 1995; Otegui *et al.*, 2006). En esencia, las proteasas catalizan la hidrólisis del enlace amida que uno a los residuos de las proteínas, siendo este rompimiento selectivo y específico dependiendo de la enzima y proteína utilizada como sustrato (Barrett *et al.*, 1998). De acuerdo al tipo de corte que realizan, las proteasas se han clasificado en exopeptidasas y endopeptidasas (Barrett *et al.*, 2001). Las primeras requieren de extremos amino y carboxilo libres para iniciar la hidrólisis del sustrato, mientras que las endopeptidasas (EP) catalizan el rompimiento de los enlaces internos de la proteína (Figura 1).

Las EP pueden ser clasificadas de acuerdo al residuo catalítico localizado en el sitio activo de la enzima. Las subclase de endopeptidasas cuyo aminoácido catalítico es una cisteína con residuo tiol libre (-SH) se denominan cistein proteasas (Grzonka *et al.*, 2001). Aquellas EP que poseen el grupo correspondiente al ácido aspártico (-COOH) son llamadas proteasas aspárticas (Dunn y Hung, 2000). Las proteasas del tipo serina llevan a cabo la catálisis gracias a un residuo serina (-OH) en su sitio activo (Hedstrom, 2002), mientras que las metaloproteasas son dependientes de un cofactor metálico en el sitio activo (e.g., Zn^{+2} , Co^{+2} , Mn^{+2}) para llevar a cabo el proceso catalítico (Gomis, 2008). Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido

aisladas de diferentes géneros bacterianos (e.g. *Bacillus*, *Streptomyces*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Aeromonas*) y cepas selectas de los géneros fúngicos *Aspergillus*, *Rhizomucor*, *Fusarium*, *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* (Jacob *et al.*, 2011).

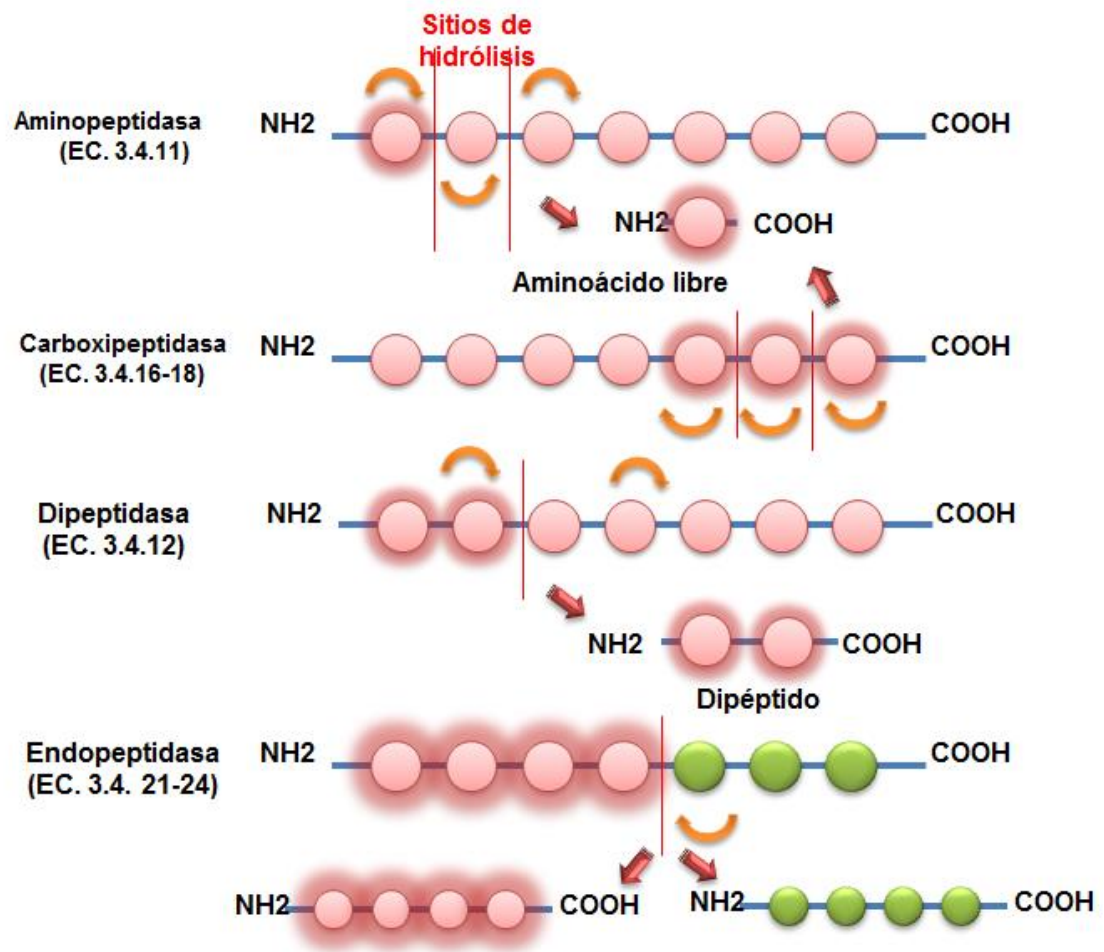


Figura 1. Clasificación de peptidasas de acuerdo al sitio de corte.
Adaptado de Barrett *et al.* (1998).

Otro número importante de enzimas proteolíticas se ha obtenido a partir de diferentes tejidos animales (e.g. tracto digestivo de mamíferos y especies marinas). En los últimos años las proteasas vegetales han recibido especial interés debido a sus características, así como la diversidad de aplicaciones biotecnológicas que presentan (Rao *et al.*, 1998; Brandelli *et al.*, 2010; Jacob *et al.*, 2011).

Las plantas constituyen una fuente importante de proteasas representando más del 40% de las enzimas de interés industrial comercializadas en la actualidad (Mahajan y Badgular, 2010). De los cuatro grupos de proteasas serina y cisteína se encuentran con gran frecuencia en tejidos vegetales como hojas, tallo, raíces, frutos y flores (Chazarra *et al.*, 2007; Bruno *et al.*, 2008; Adamczyk *et al.*, 2009; Mohamed *et al.*, 2009; Tomás *et al.*, 2009). De igual manera las proteasa aspárticas están ampliamente distribuidas en estos organismos y han sido asiladas, aunque en menor proporción, de diferentes especies de los géneros *Arabidopsis* y *Populus*, tan sólo estos dos últimos géneros contienen en sus genomas más de 720 y 950 genotipos, respectivamente, los cuales codifican para diferentes proteasas, siendo un ejemplo claros de la diversidad e importancia de estas enzimas en las plantas (Veríssimo *et al.*, 1996; García *et al.*, 2006; Mazorra-Manzano y Yada, 2008).

2.2. Características Bioquímicas de las Proteasas

El esquema de clasificación MEROPS propuesto por Barret y Rawling en 1993, reúne el conocimiento actual de las proteasas permitiendo clasificarlas en diferentes familias de acuerdo a su patrón de plegamiento, inhibidor específico y características bioquímicas del sitio activo (www.merops.ac.uk).

2.2.1. Cisteín Proteasas (CPs)

Las cisteín proteasas (EC 3.4.22) se encuentran distribuidas en diferentes organismos como virus de hepatitis A y la poliomelitis, bacterias (proteasa de *S. aureus* y tripaina de *Cl. histolyticum*), hongos (catepsina B de *Aspergillus flavus*), hasta mamíferos (calpainas y catepsinas) y plantas (papaína del fruto de papaya) (Otto y Schirmeister, 1997). Se conocen 21 familias de CPs (C1-C21), siendo la superfamilia C1 la de mayor número de miembros, agrupando aquellas enzimas que guardan una estrecha relación estructural con papaína (Figura 2A) (Grzonka *et al.*, 2001).

Las CPs tienen en su sitio activo los residuos catalíticos C25 y H159 altamente conservados, por lo que presentan un mecanismo catalítico similar al de papaína. El mecanismo de las CPs involucra la formación de un intermediario acil-tiol (Figura 2B), inicia con la formación del complejo enzima-sustrato, estabilizado por puentes de hidrógeno entre la enzima y el sustrato. La presencia de una molécula de agua provoca el desplazamiento del carbonilo del enlace peptídico y la disociación del complejo regenerando así la forma libre de enzima (Otto y Schirmeister, 1997). La mayoría de las proteasas agrupadas en la familia C1 son proteínas de bajo-mediano peso molecular (20-50 kDa) que exhiben su máxima actividad a en un rango de pH de 5.0-8.0 y temperaturas de 45-55°C (Tabla 1).

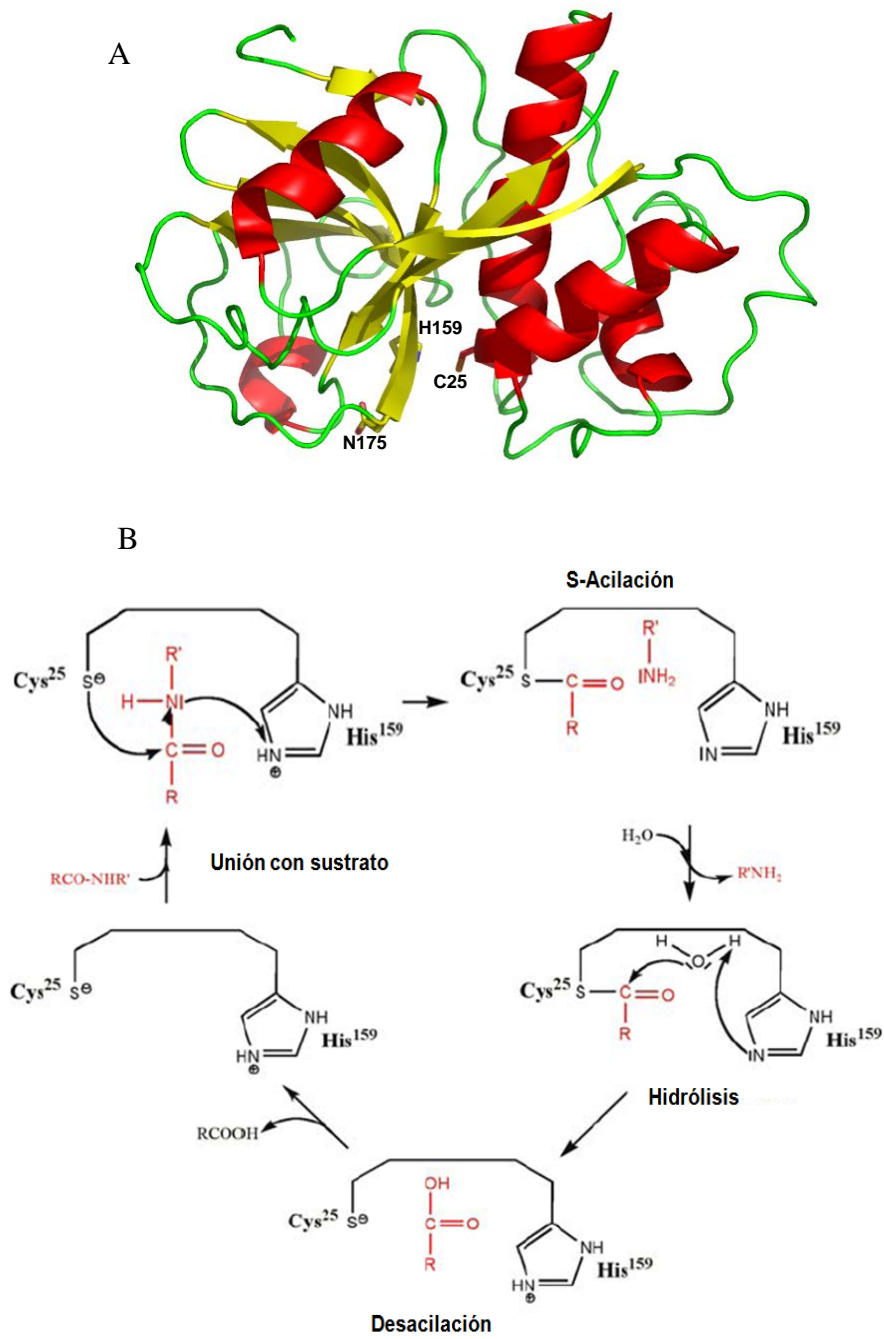


Figura 2. Estructura terciaria de la papaína y su mecanismo catalítico.
Adaptado de Grzonka *et al.* 2001.

Tabla 1. Características bioquímicas de las proteasas vegetales.

Enzima	Fuente	Tipo de proteasa	PM (kDa)	pI	pH óptimo	Estabilidad pH	Temperatura óptima (°C)	Estabilidad térmica (°C)	Referencia
Streblin	<i>S. asper</i>	Serina	64	9.2	9.0	3.0-12.5	65	15-85	1
Dubiumin	<i>S. dubium</i>	Serina	66	9.3	11.0	3.0-12.0	70	60-70	2
Crinumín	<i>C. asiaticum</i>	Serina	67	6.9	8.5	4.5-11.5	70	20-75	3
Carnein	<i>I. carnea</i>	Serina	80	5.6	6.5	3.0-10.0	65	37-75	4
Milin	<i>E. milii</i>	Serina	51	6.9	8.0	5.5-12.0	60	20-70	5
AiCP	<i>A. integer</i>	Cisteína	69	NR	10.0	9.0-11.0	40	40-70	6
Asclepain f	<i>A. fruticosa</i>	Cisteína	23.6	9.3	10.0	8.0-11.0	37	37-55	7
Emiliin	<i>E. milii</i>	Cisteína	30	NR	8.0	6.0-8.0	37	NR	8
Araujain I	<i>A. hortorum</i>	Cisteína	24	9.3	8.5	6.0-9.0	60	37-70	9
Hieronymain	<i>B. hieronymi</i>	Cisteína	25	5.9	9.0	7.5-9.5	37	NR	10
Asclepain cII	<i>A. curassavica</i>	Cisteína	23.5	9.3	8.5	8.5-10.0	40	40-60	11
HvCP3	<i>H. vulgare</i>	Cisteína	50	NR	8.0	5.5-8.5	37	30-80	12

Tabla 1. Continuación.

Enzima	Fuente	Tipo de proteasa	PM (kDa)	pI	pH óptimo	Estabilidad pH	Temperatura óptima (°C)	Estabilidad térmica (°C)	Referencia
Procerain B	<i>C. procera</i>	Cisteína	25.7	9.5	8.5	6.5-8.5	40	40-60	13
<i>CcAP</i>	<i>C. calcitrapa</i>	Aspártica	50	NR	5.0	4.5-6.5	52	25-37	14
<i>VrAP</i>	<i>V. radiata</i>	Aspártica	47.5	NR	3.5	2-10	37	5-50	15
<i>Onopordosin</i>	<i>O.acanthium</i>	Aspártica	45	4.4	3.0	2.0-5.0	30	NR	16
<i>BGAP</i>	<i>M. charantia</i>	Aspártica	60	4.8	7.0	5.0-8.0	45	45-65	17
<i>HaAP</i>	<i>H. annuus</i>	Aspártica	48	NR	3.0	2.0-5.0	35	30-45	18
Cinarasa A	<i>C. scolymus</i>	Aspártica	43	3.1	3.0	3.0-7.0	70	50-60	19

(1) Tripathi *et al.* (2011); (2) Mohamed *et al.* (2009); (3) K.A. Singh *et al.* (2010); (4) Kumar *et al.* (2007); (5) Yadav y Jagannadham (2009), (6) Siti y Rosma (2011), (7) Trejo *et al.* (2001), (8) Fonseca *et al.* (2010), (9) Priolo *et al.* (2000), (10) Bruno *et al.* (2008), (11) Liggieri *et al.* (2009), (12) Watanabe *et al.* (2009), (13) A.N. Singh *et al.* (2010), (14) Raposo y Domingos (2008), (15) Kulkarni y Rao (2007), (16) Brutti *et al.* (2012), (17) Wang *et al.* (2008), (18) Park *et al.* (2000), (19) Sidrach *et al.* (2005).

Las reacciones catalizadas por CPs pueden ser reguladas por inhibidores naturales o sintéticos (Otto y Schirmeister, 1997). Las cistatinas corresponden a un grupo de inhibidores reversibles para CPs de carácter proteico entre 12-16 kDa (Grzonka *et al.*, 2001). Estos inhibidores naturales se han encontrado en diferentes tejidos vegetales (semillas, raíces, frutos y hojas) regulando la actividad proteolítica endógena y contra el ataque de algunos insectos (Benchabane *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2012). El compuesto E-64, un epóxido proteico aislado de *A. japonicus* y es un potente inhibidor de CPs utilizado para la identificación de este tipo de enzimas (Powers *et al.*, 2002).

2.2.2. Serín Proteasas (SPs)

La base de datos MEROPS engloba a más de 26000 SPs (EC 3.4.21) organizadas en 13 clanes y subdivididas en 40 familias (www.merops.ac.uk). Cada clan describe a un grupo de enzimas estrechamente relacionadas en secuencia y estructura. Los representantes de cada clan, quimotripsina (SA), subtilisina (SB), carboxipeptidasa C (SC) y *E. coli* peptidasa A (SE) difieren en algunos aspectos estructurales pero conservan en su secuencia los residuos catalíticos Ser195, His57 y Asp102. Al igual que las otras proteasas, el mecanismo catalítico de las SPs involucra la formación de un intermediario tetraédrico entre el aminoácido catalítico y un aminoácido del sustrato, este intermediario colapsa en presencia de agua liberando el producto ácido y la forma libre de la enzima (Antao y Malcata, 2005).

La actividad de SPs puede ser inhibida por compuestos alquilantes (metilcetonas, diazometilcetonas y epóxidos), agentes acilantes (carbamato, acil hidroxamatos e inhibidores heterocíclicos) así como agentes fosforilantes y sulfonantes (Powers *et al.*, 2002). Entre los inhibidores más estudiados para serín proteasas se encuentran los agentes PMSF (fosfato de fenilmetilsulfonilo), SBTI (inhibidor de tripsina de soya) y AEBSF (fluoruro de benenilsulfonilo) con los cuales forman complejos tetraédricos con la enzima imposibilitando la unión con el sustrato (Hedstrom, 2002; Powers *et al.*, 2002).

Las SPs son enzimas poseen una masa molecular entre los 18 y 35 kDa, variando sus puntos isoeléctricos entre 4.4 y 6.2. Generalmente son activas en la región neutra-alcalina, con un pH óptimo entre 7.0-11.0 (Tabla 1). Las proteasas alcalinas producidas por algunas bacterias, hongos y levaduras son activas a temperaturas superiores a los 50°C y pH entre 9.0-11.0. *Bacillus* spp. producen proteasas alcalinas llamadas subtilisinas, las cuales son ampliamente utilizadas en la formulación de detergentes debido a su amplia especificidad y estabilidad a elevadas temperaturas (Rao *et al.*, 1998). Las plantas representan una fuente importante de estas enzimas. Recientemente un gran número de SPs han sido aisladas de diferentes especies. Estas proteasas vegetales presentan diferentes características, varían entre los 20 a 100 kDa, encontrándose la mayoría entre los 60-80 kDa. El pH óptimo para su actividad se encuentra entre 9.0-11.0, excepto algunas enzimas aisladas de cebada la cuales son más activas en el rango de 6.0-6.5 (Antao y Malcata, 2005). La cucumisina de melón (*Cucumis melo*) es una proteasa encontrada en el jugo del fruto, es una proteasa altamente termoestable (óptimo 70°C) cuya estructura ha sido perfectamente elucidada en diferentes estudios (Yamagata *et al.*, 1994; Murayama *et al.*, 2012).

2.2.3. Proteasas Aspárticas (PAs)

Las proteasas aspárticas (E.C. 3.4.23) se clasifican en 14 familias, la familia A1 (APs tipo pepsina), proteasas retrovirales agrupadas la familia A2, A3 proteasas del virus del tabaco y A4 que agrupa a las proteasas fúngicas tipo pepsina y penicilopepsina (Simoes y Faro, 2004). Las PAs se caracterizan por poseer dos residuos de ácido aspártico altamente conservados (Asp32 y Asp125) en el sitio activo (Dunn, 2010). Están presentes en animales, plantas y virus, estrechamente relacionadas con diferentes funciones fisiológicas incluyendo la digestión de nutrientes (quimosina y pepsina A), defensa contra patógenos (catepsina D), interacción polen-pistilo (cardosina A), control de la presión sanguínea (renina), degradación de hemoglobina (plasmepsinas) y maduración de proteínas virales (retropepsina en VIH) (Dunn y Hung, 2000; Claverie y

Vega, 2007). Estructuralmente la mayoría de las proteasa aspárticas pertenecen a la familia de pepsina A1 y todas son sintetizadas como zimógenos, para posteriormente ser activadas autocatalíticamente tras el corte del péptido señal bajo un ambiente ácido (Cooper, 2002; Mazorra-Manzano y Yada, 2008).

Las reacciones catalizadas por PAs consisten un mecanismo ácido base no covalente. Uno de los dos residuos de Asp cataliza el ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico del sustrato (Claverie y Vega, 2007). Una molécula de agua provoca el ataque nucleofílico hacia el carbonilo desestabilizando el intermediario tetraédrico (forma acilada de la enzima) con la subsecuente liberando el producto (Andreeva y Rumsh, 2001). La actividad de PAs es inhibida por pepstatina A, un hexapéptido Val-Val-Sta-Ala-Sta que contiene un aminoácido inusual estatina (Dash *et al.*, 2003). Este compuesto se aisló originalmente a partir de cultivos bactrianos de *Actinomyces* sp. y *Streptomyces testacus* y tiene capacidad para inhibir la pepsina D y E a muy baja concentraciones (Dunn, 2002).

Las PAs están involucradas en muchos procesos biológicos como digestión, senescencia, degradación de proteínas de almacenamiento, reproducción y muerte celular (Simoes y Faro, 2004). Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en plantas, detectándose tanto en plantas monocotiledóneas como arroz, cebada y trigo (Kervinen *et al.*, 1993; Kervinen *et al.*, 1995) como en dicotiledóneas como girasol, cacao, espinaca, patata, tabaco, *C. cardunculus* y plantas carnívoras del género *Nepenthes* (Castanheira *et al.*, 2005; Feijoo y Villa, 2011; Hatano y Hamada, 2012).

2.3. Funciones Biológicas de las Proteasas Vegetales

Las proteasas tienen un papel importante en la fisiología y desarrollo de las plantas; están presentes en cada compartimento celular (e.g. cloroplastos, mitocondria, aparato de Golgi) y su actividad está estrictamente regulada durante todo el ciclo de vida de la planta (Schaller, 2004). La mayoría de las plantas obtienen del suelo los minerales y nutrientes que necesitan para su desarrollo; sin embargo, algunas habitan en lugares donde la calidad nutrimental del suelo y agua limitan de manera importante diferentes funciones metabólicas. Debido a ello, las plantas han desarrollado diferentes estrategias para asimilar compuestos y utilizarlos para su beneficio. Algunas plantas evolucionaron para formar complejas estructuras en sus raíces y sofisticados sistemas de secreción enzimática que les permiten incorporar una gran variedad de compuestos y utilizarlos para su nutrición (Adamczyk *et al.*, 2012).

El conocimiento tradicional sugería que las plantas sólo podían adquirir formas inorgánicas de nitrógeno (amoníaco y nitratos); sin embargo, las evidencias actuales demuestran que algunas plantas son capaces de secretar enzimas proteolíticas para incrementar la disponibilidad de fuentes alternativas de nitrógeno (aminoácidos libres y péptidos) y de esta manera utilizarlos para la síntesis de nuevas biomoléculas (Godlewski y Adamczyk, 2007; Takeda *et al.*, 2007). Las diferentes especies del género *Nepenthes* (plantas insectívoras) han adoptado mecanismos sofisticados para obtener energía a través de la digestión de diferentes insectos (Mithofer, 2011). Los cuerpos fructíferos de estas plantas contienen fluidos digestivos con altas concentraciones de proteasas necesarias para la degradación de las proteínas del alimento (Mithofer, 2011; Hatano y Hamada, 2012).

Las proteasas también forman parte activa durante el procesamiento de proteínas de reserva. Algunas especies vegetales almacenan una gran variedad de proteínas en sus semillas (e.g., albúminas, globulinas, prolaminas y gluteninas), las cuales serán indispensables para las primeras etapas de desarrollo tras la germinación (Tan-Wilson y Wilson, 2012). El procesamiento de estas proteínas está mediado por diferentes eventos proteolíticos que involucran una gran variedad de proteasas. Las investigaciones han

demostrado la participación de proteasas con actividad tipo pepsina, papaína y quimotripsina durante las diferentes etapas de germinación en semillas de soya, arroz y cebada (Kulkarni y Rao, 2009; Mahajan y Badgujar, 2010; Capocchi *et al.*, 2011; Karmous *et al.*, 2012). Aunque el papel de estas enzimas en estos procesos aún no es claro, los diferentes grupos de trabajo suman esfuerzos para desentrañar las incógnitas que rodean estos eventos.

El látex, las resinas y otros exudados de plantas contienen una gran cantidad de metabolitos (e.g. alcaloides, terpenoides y ácidos fenólicos) que participan en la respuesta al ataque de depredadores y patógenos. Recientemente se han encontrado que el látex de algunas plantas pertenecientes a las familias *Moraceae*, *Caricaceae*, *Euphorbiaceae* y *Cucurbitaceae* poseen una gran variedad de proteínas y enzimas (oxidoreductasas, quitinasas, glucosidasas y proteasas) relacionadas con estos mecanismos de defensa. Aunque el papel de la mayoría de estas enzimas aún es incierto, aparentemente las proteasas juegan un papel central en la regulación de estos mecanismos. Diferentes investigaciones han relacionado la presencia de proteasas tipo cisteína en exudados de hojas y frutos de *Carica papaya*, *Calotropis procera*, *Vasconcellea quercifolia* y *Euphorbia nivula* con el efecto protector contra el ataque de insectos. Sin embargo no se ha podido establecer la relación directa proteasa-insecto, debido a la amplia especificidad de estas enzimas y la compleja composición del látex de estas plantas (Konno, 2011; Shivaprasad *et al.*, 2011; Adamczyk *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2012).

La proteólisis es un proceso clave para mantener la homeostasis durante la vida de estos organismos. Los cloroplastos contienen una diversidad de enzimas proteolíticas necesarias para mantener la dinámica de proteínas (e.g. maduración, control y degradación). Estas enzimas se encuentran estratégicamente distribuidas en el estroma y algunas de ellas están incrustadas en la membrana del tilacoide. La actividad de estas enzimas se ha relacionado con el procesamiento de los sistemas fotosintéticos y proteínas involucradas en la producción de energía (Clarke, 2005). Los eventos proteolíticos en estos organelos han sido ampliamente estudiados, especialmente su

estrecha relación en respuesta a factores de estrés y muerte celular en plantas (Adam, 2004; Sjogren y Clarke, 2011; Chi *et al.*, 2012).

Los cloroplastos evidencian los primeros síntomas de deterioro atribuidos a los procesos de senescencia, lo anterior debido a la pérdida de diferentes pigmentos, movilización de nutrientes y oxidación lipídica; pero sobre todo a la degradación de proteínas (Parrott *et al.*, 2005; Gregersen *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008). Estos eventos proteolíticos involucran diferentes proteasas (e.g., ClpP, FtsH, DegP y VPs) responsables del procesamiento del fotosistema II y proteínas como la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa y ribulosa 5-fosfato kinasa (Adam, 2004; Thoenen *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2008; Chi *et al.*, 2012). Teixeira y Glaser (2013), Chi *et al.* (2012) y Adam (2004), han profundizado sobre la importancia de estos procesos para célula, incorporando el conocimiento actual sobre las proteasas caracterizadas y en concreto los mecanismos de reconocimiento para la degradación de sustratos específicos en cada compartimiento celular. Si bien, estos eventos han sido documentados desde hace tiempo, diferentes grupos de investigación han propuesto estrategias para elucidar los claros-oscuros que envuelven a estas enzimas, los cambios en su actividad en presencia de inhibidores endógenos, sobre todo durante los diferentes eventos de muerte celular.

Aunque los procesos proteolíticos en cloroplastos son los más estudiados, actualmente se exploran nuevos modelos para evaluar la expresión y actividad de diferentes proteasas en respuesta a distintos tipos de estrés o bajo la influencia de hormonas específicas de los fenómenos de senescencia. En este sentido, diferentes investigaciones han elucidado el papel que juegan las proteasas durante los procesos de senescencia, esto a través de modelos sensibles a etileno o bajo condiciones limitadas de nutrientes (Thoenen *et al.*, 2007). En todos los casos se ha encontrado un aumento en la actividad proteolítica y una disminución progresiva de la concentración de proteína soluble (Wagstaff *et al.*, 2002; Lerslerwong *et al.*, 2009; Battelli *et al.*, 2011). Macnish *et al.* (2010), evaluó los cambios fisiológicos y moleculares durante la floración y senescencia en pétalos de *Nicotiana mutabilis*, encontrando una relación entre los niveles de transcripción de *SAG12* (CP regulada por etileno) asociada a los cambios en

color y emisión de compuestos volátiles al tercer día de senescencia. Aunque se han relacionado otras proteasas involucradas en este proceso, aparentemente se ha identificado a las CP como las enzimas proteolíticas más comunes durante los estadios de senescencia en plantas. Battelli *et al.* (2011), reportaron un aumento en la actividad específica tipo caspasa (cistein proteasa) utilizando un modelo insensible a etileno con *L. longiflorum*, si bien la actividad de caspasas es propia de los sistemas animales, en plantas las metacaspasas desarrollan funciones similares a las que suceden durante los procesos de muerte celular (Beers *et al.*, 2000; Rotari *et al.*, 2005).

2.4. Aplicaciones Biotecnológicas de las Proteasas Vegetales

Las proteasas vegetales poseen características catalíticas atractivas desde el punto de vista industrial. Actualmente, las proteasas vegetales acaparan más del 50% de las enzimas comercializadas a nivel industrial con un valor de mercado que excede los \$ 1.5 billones de dólares anuales (McAuliffe, 2012). Los campos de aplicación de las proteasas vegetales son muy diversos, incluyendo aplicaciones farmacéuticas, formulación de detergentes, industria cárnica y tecnología de productos lácteos (Feijoo y Villa, 2011). Un factor determinante para definir la aplicación biotecnológica de una proteasa es su especificidad hacia diferentes sustratos y su actividad proteolítica. Una alta actividad proteolítica es deseable para los procesos de tratamiento de aguas residuales o la producción de hidrolizados proteicos (Neklyudov *et al.*, 2000; Chalamaiah *et al.*, 2012). Por otra parte, ciertos procesos demandan una alta especificidad en las reacciones enzimáticas, debido a la importancia económica de los productos. Este tipo de enzimas son altamente demandadas por la industria farmacéutica, láctea para la manufactura de quesos, así como en la industria cárnica para los procesos de ablandamiento de carnes.

2.4.1. Formulación y Tratamiento de Bebidas

Las proteasas de plantas han sido utilizadas por largo tiempo en diferentes procesos industriales. Algunas preparaciones enzimáticas con bromelaina, papaína y ficina han sido empleadas en la industria cervecera y vinícola. La aplicación de estas proteasas es con el fin de clarificar las preparaciones coloidales y mejorar su estabilidad a bajas temperaturas (Mahajan y Badgujar, 2010; Benucci *et al.*, 2011; Feijoo y Villa, 2011). Durante la preparación de las malta algunas proteasas son utilizadas para hidrolizar las proteínas presentes en los grano, previniendo la agregación de polifenoles y oligosacáridos (Jones, 2005). Recientemente se exploran nuevas aplicaciones para la

estabilización de proteínas en vinos y mejorar la calidad del producto final (Benucci *et al.*, 2011).

2.4.2. Ablandamiento Enzimático de Carnes

La aceptabilidad de la carne por los consumidores está fuertemente influenciada por la jugosidad, sabor y terneza de la carne (Shackelford *et al.*, 2001). Debido a esto un gran número de estudios han evaluado y desarrollado métodos para mejorar la terneza y calidad general de la carne, entre los que tenemos el estiramiento muscular o estimulación eléctrica (Hope *et al.*, 2010). Recientemente se han implementado tratamientos con enzimas proteolíticas exógenas para acelerar el proceso de ablandamiento. Los tratamientos consisten en la hidrólisis parcial de las proteínas miofibrilares de la carne (actina y miosina), proteínas de tejido conectivo (colágeno y elastina) y otras proteínas accesorias (Ashie *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2007).

El tratamiento más estudiado para el ablandamiento de carnes se basa en la aplicación de papaína y ha resultado ser el más potente para este propósito. Sin embargo, la excesiva actividad proteolítica y baja especificidad presentada por esta enzima en ocasiones conlleva la formación de productos desagradables en el producto, es por ello que debe utilizarse con cautela (Sullivan y Calkins, 2010). Trabajos recientes contemplan el uso de otras enzimas como alternativa al tratamiento con papaína. Por ejemplo, la aplicación de infusiones de kiwi (*Actinidia deliciosa*) ha mejorado la terneza de lomo de puerco y cordero en comparación con los tratamientos convencionales (Han *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011). Ha *et al.* (2012), exploraron el efecto de los tratamientos con papaína, bromelaina, actinidina y zingibaina sobre la hidrólisis de proteínas miofibrilares, encontrando que el tratamiento con zingibaina, proteasa del jengibre, fue el agente más efectivo para el ablandamiento. Recientemente Rawdkuen *et al.* (2013) propuso el uso de extractos de *C. procera* como una fuente alternativa para el tratamiento de carnes.

2.4.3. Producción de Hidrolizados Proteicos Funcionales y Péptidos Bioactivos

Los procesos enzimáticos utilizados para la hidrólisis de proteínas han sido uno de los métodos más prometedores para la recuperación y modificación de proteínas alimentarias y algunos subproductos proteicos. Una hidrólisis controlada lleva a la formación de fragmentos polipeptídicos que eventualmente pueden mejorar las propiedades funcionales de estas proteínas (e.g. solubilidad, capacidad espumante y capacidad emulsificante) (Neklyudov *et al.*, 2000; Pacheco-Aguilar *et al.*, 2008). Por otra parte, los péptidos bioactivos son producto de la hidrólisis inespecífica y excesiva de las proteínas. La formación de estas fracciones proteicas ayudan a mejorar las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de algunos alimentos (Sakanaka *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007; Memarpoor-Yazdi *et al.*, 2012). Otros estudios han relacionado estos péptidos con la capacidad de inhibir la enzima convertidora de angiotensina I (actividad IECA), proponiéndose como una alternativa para el tratamiento y control de la presión arterial (Chen *et al.*, 2012; Mäkinen *et al.*, 2012). La correcta selección de las condiciones de hidrólisis es el paso más importante para la producción de hidrolizados proteicos. Los parámetros como el tipo de proteasa, la relación enzima/sustrato (E/S), pH, temperatura y grado de hidrólisis determinan las propiedades de los hidrolizados y su uso como ingrediente funcional y/o compuesto bioactivo (He *et al.*, 2013).

Las proteasas más utilizadas para la producción de los hidrolizados de proteína corresponden a las preparaciones enzimáticas comerciales Alcalasa®, Flavorzima®, Neutrasa® y Protamex®, las cuales han sido exitosas para la hidrólisis de proteínas musculares y sub-productos de pescado (Raghavan *et al.*, 2008; Shamloo *et al.*, 2012). Dentro de las proteasas vegetales utilizadas para la modificación de proteínas alimentarias destaca el uso de papaína, bromelaina y ficina (Feijoo y Villa, 2011); sin embargo los procesos de producción de hidrolizados con proteasas vegetales se limita al uso de papaína, existiendo una limitada información sobre el uso de otro tipo de proteasas para este fin (Wang *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2013). Actualmente se exploran nuevas fuentes para la obtención de proteasas involucradas en la producción de hidrolizados proteicos funcionales y la producción de péptidos bioactivos.

2.4.4. Nuevos Coagulantes de la Leche para la Elaboración de Quesos

El cuajo y otros coagulantes son preparaciones enzimáticas que se han utilizado en la manufactura de quesos durante cientos de años. Quimosina es la enzima por excelencia utilizada para la coagulación de la leche durante la manufactura de quesos. Las características de esta enzima permiten obtener altos rendimientos en la cuajada minimizando la pérdida de proteína en el suero. Esta proteasa actúa específicamente sobre la fracción κ -caseína (Phe₁₀₅-Met₁₀₆) liberando el glicomacropéptido y provocando la coagulación de la leche (Fox, 1993). Inicialmente esta enzima fue extraída de estómago del ternero, sin embargo, su limitada la creciente producción de quesos y limitada fuente de obtención ha llevado a la búsqueda de alternativas al uso de quimosina (Horne y Banks, 2004). Entre los sustitutos del cuajo más importantes se incluyen las proteasas microbianas de *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* y *M. bacilliformis*, y la forma recombinante de quimosina expresada con éxito en *E. coli*, *S. cerevisiae* y *A. niger* (Jacob *et al.*, 2011). Aunque se ha demostrado la alta eficiencia de estas enzimas para la industria láctea, su uso no ha sido del todo satisfactorio, especialmente en países cuya legislación y tradición prohíbe aplicación, por ello nuevas fuentes continúan explorándose.

Las plantas han sido propuestas como una fuente natural atractiva de proteasas coagulantes de la leche, cuyas investigaciones al respecto han abierto la oportunidad a nuevos sustitutos del cuajo. Las flores de *C. cardunculus* han sido utilizadas por siglos para la manufactura de los quesos Serra da Estrela, Torta del Casar, La Serena y Serpa en algunos países del Mediterráneo (Verissimo *et al.*, 1995). Subsecuentes estudios sobre purificación y caracterización enzimática, han confirmado la presencia de proteasas tipo quimosina (cardosina, cinarasas y ciprosinas) en estas flores (Veríssimo *et al.*, 1996; Veríssimo *et al.*, 1998). Las PAs vegetales parecen ser proteasas adecuadas para la manufactura de quesos, debido a su elevada actividad coagulante en relación a su actividad proteolítica.

Los frutos de *Solanum* contiene enzimas coagulantes que han sido utilizados para la producción de quesos blandos en Sudan. Guiama *et al.* (2010) estudiaron nueve especies de este género encontrando que poseían la capacidad de coagular la leche bajo condiciones similares de ensayo. Otras fuentes potenciales han sido propuestas para la obtención de proteasas coagulantes de la leche, incluyendo *E. mili* (Fonseca *et al.*, 2010), *C. procera* (A.N. Singh *et al.*, 2010), *F. racemosa* (Devaraj *et al.*, 2008) e *I. carnea* (Kumar *et al.*, 2007).

El éxito de una enzima para su aplicación en la producción de quesos depende no solo de su habilidad para coagular la leche sino de la relación adecuada entre su actividad coagulante/actividad proteolítica. La determinación de dicha relación es recomendable como un parámetro que define el potencial que representan los nuevos coagulantes por estar estrechamente relacionado con la especificidad de la enzima para coagular la leche (Mazorra-Manzano *et al.*, 2013).

2.5. Flor de Naranja como Nueva Fuente de Proteasas

El género *Citrus* conocido comúnmente como cítrico, es originario de las regiones tropicales y subtropicales del Sureste de Asia. Este género comprende tres ancestros principales, *Citrus medica* (citrón), *Citrus maxima* (pomelo) y *Citrus reticulata* (mandarinas) de los cuales se derivan más de 60 especies híbridas conocidas y que actualmente son cultivadas en el mundo (Mabberley, 2004).

México se encuentra entre los mejores productores de cítricos (4.6% del total mundial) después de China (21%), Brasil (18) E.U.A. (8%), y la India (6%) (SIAP., 2010; SAGARPA., 2013). La producción nacional de cítricos es de aproximadamente 7 millones de toneladas (MMt) en promedio por cosecha, destacando la producción de cítricos dulces con 4.2 MMt principalmente de naranja (83%) (FAO, 2012). Dentro de los principales estados productores se encuentran Veracruz (51%), Tamaulipas (10%), San Luis Potosí y Nuevo León (8%), Sonora (5%) y Tabasco (4%) los cuales destinan grandes superficies para el cultivo de este producto (FAO, 2012). Las especies de naranja más cultivadas son *Citrus sinensis* (naranjos dulces) y *Citrus aurantium* (naranjos agrios). El sabor particular de cada especie se debe a la proporción genética de cada ancestro, donde los naranjos dulces deben su sabor dulce al compartir una mayor proporción del genoma con *C. reticulata*, mientras que *C. aurantium* posee el sabor amargo característico de los pomelos *C. maxima* (Mabberley, 1997).

A lo largo de muchos años los cítricos se han empleado como árboles ornamentales en numerosos lugares. Especialmente el naranja amargo (*Citrus aurantium*) se puede encontrar en parques, jardines, calles y avenidas de muchas ciudades. Esta especie es ampliamente cultivada en México y uno de los frutos distintivo del Estado de Sonora. En la medicina tradicional, los frutos y flores de esta especie se han utilizado como auxiliares para tratar problemas digestivos así como para controlar la ansiedad (Fugh y Myers, 2004; Akhlaghi *et al.*, 2011). Las flores de esta especie también han sido utilizadas con fines medicinales; sin embargo, el interés industrial en esta fuente es debido a su alto contenido en compuestos aromáticos y aceites esenciales

(Moraes *et al.*, 2009). Los procesos para la obtención de estos compuestos se basan en destilación con arrastre de vapor a partir de hojas, pequeños frutos y flores inmaduras, obteniendo concentrados con propiedades aromáticas muy apreciadas por la industria de perfumería, cosmética y de alimentos (Mamma y Christakopoulos, 2013).

Dado a la importancia económica del recurso se han realizado diferentes investigaciones para mantener la calidad y sanidad del producto; sin embargo, los estudios de exploración de nuevas alternativas para el aprovechamiento de este recurso son escasos. En esta investigación se contempla el aprovechamiento extractos de flor de naranjo agrio *Citrus aurantium* como una nueva fuente de proteasas, así como su evaluación como sustituto potencial del cuajo.

III. HIPÓTESIS

La flor de naranjo agrio representa una nueva fuente de proteasas con características proteolíticas y coagulantes de la leche adecuadas para su posible aplicación en procesos biotecnológicos (e.g., producción de quesos).

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar las características proteolíticas y coagulantes de los extractos de flor de naranjo que permitan mediante protocolos de purificación e inhibición elucidar las proteasas involucradas en la coagulación de la leche.

4.2. Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad coagulante de la leche de extractos crudos de flor de naranjo.
2. Determinar el efecto del pH sobre la actividad proteolítica en extractos crudos de flor de naranjo.
3. Evaluar el potencial biotecnológico de extractos de naranjo mediante análisis del perfil peptídico obtenido de la hidrólisis de proteínas alimentarias.
4. Elucidar el tipo de proteasas involucradas en la actividad de los extractos crudos de flor de naranjo mediante protocolos de purificación e inhibición.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materia Prima

Las flores de naranjo fueron recolectadas de árboles adultos de parques y zonas de Hermosillo, Sonora donde se cultivaran arboles de naranjo amargo. Las muestras fueron colectadas del árbol por agitación, depositadas en bolsas plásticas Ziploc[®] y transportadas al laboratorio de Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Las flores se limpiaron de impurezas, sumergidas en un recipiente con agua destilada, secadas al sol por 3 h y almacenadas a -20°C para su posterior análisis.

Todos los reactivos químicos utilizados durante la investigación fueron grado analítico marca Sigma (St. Louis, MO) cuando no se indique lo contrario.

5.2. Obtención de los Extractos Crudos de Flor de Naranja (ECFN)

Para la obtención de los extractos crudos de flor de naranjo, las flores secas fueron homogenizadas en solución Tris-HCl 0.02 M pH 7.0 en una relación 1:10 (p:v) utilizando un procesador de alimentos Osterizer modelo 450-10 (Osterizer Mexicana, S.A.). La muestra homogenizada se filtró en malla cielo y posteriormente fue centrifugada a 7000g por 30 min a 4°C utilizando una centrífuga refrigerada Thermo Fisher Scientific, modelo D-375 (Thermo Fisher Scientific Inc, Alemania). El

sobrenadante obtenido por decantación fue almacenado en refrigeración (4°C) para su posterior análisis.

5.3. Determinación del Contenido de Proteína

La concentración de proteína fue determinada utilizando el kit DC Protein Assay (BioRad Laboratories), basado en el método de Lowry *et al.* (1951). El protocolo consistió en mezclar 5 µL de extracto con 25 µL de reactivo A (Tartrato de cobre alcalino) y 200 µL de Reactivo B (Folin-Ciocalteu) en una microplaca. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 15 min para el desarrollo de color (azul); posteriormente la absorbancia registrada a 630 nm utilizando un lector de microplaca para ELISA (Opsys MR, Dynex, USA). El contenido de proteína se determinó utilizando una curva estándar de albumina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés) a concentraciones de 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25 y 1.47 mg/mL.

5.4. Actividad Coagulante de la Leche

Para la determinación de actividad coagulante se utilizó leche fresca pasteurizada baja en grasa (1% grasa) obtenida del mercado local. La actividad coagulante consistió en mezclar 10 mL de leche (con 0.021% de CaCl₂) con 1 mL de extracto enzimático e incubación a 60°C. El tiempo requerido para la formación del coágulo fue registrado mediante observación visual, con cronómetro en mano, mismo que fue utilizado para determinar la actividad coagulante de la leche. El mismo procedimiento fue utilizado para evaluar el efecto de la temperatura, incubando la mezcla a temperaturas de 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 y 80°C. Cada determinación fue realizada por triplicado y el experimento realizado en tres ocasiones con extractos frescos preparados cada día. Los

resultados fueron expresados en porcentaje de actividad relativa respecto al máximo obtenido. La determinación de la actividad coagulante en las diferentes fracciones obtenidas durante los protocolos de purificación, se realizó mediante el mismo procedimiento (sólo a 60°C), ajustando el volumen de la solución enzimática para lograr la coagulación de la leche en tiempos menores a 60 min. El cálculo de las unidades coagulantes por mL (U/mL) de extracto se realizó de acuerdo a Arima *et al.* (1970) mediante la siguiente fórmula modificada.

$$ACL (U/mL) = (2400/t \times S/E)/100 \quad (1)$$

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 coagulante (U) se define como la cantidad de extracto (mL) requerido para coagular 100 mL de leche en 40 min bajo condiciones de ensayo.

5.5. Actividad Proteolítica Total en ECFN

La actividad proteolítica de ECFN fue determinada de acuerdo a Kumar *et al.* (2007), utilizándose diferentes soluciones proteicas: hemoglobina 0.5%, BSA al 1%, caseinato de sodio al 2%, azocaseína al 1% y azoalbúmina al 1% como sustrato. En condiciones ácidas los sustratos fueron disueltos en amortiguador de acetato de sodio 0.1M pH 5.0, mientras que en condiciones neutras en Tris-HCl 20 mM pH 7.0. Las mezclas de ensayo contenían 450 µL de sustrato con 50 µL de ECFN, las cuales fueron incubadas durante 60 min a 50°C. Tras el tiempo de incubación, la reacción enzimática se detuvo mediante la adición de ácido tricloroacético (TCA) al 5%. Una muestra testigo fue preparado bajo el mismo procedimiento pero sin incubación y con la adición directa de TCA a la mezcla.

Todas las mezclas (incluyendo el blanco) se mantuvieron en baño de hielo por 30 min y posteriormente fueron centrifugadas a 15000g por 30 min a 4°C. La absorbancia

del sobrenadante a 280 nm fue registrada en un espectrofotómetro Cary 50 Bio (Varian, USA). La actividad fue expresada en unidades de actividad proteolítica (UAP). 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. Para el caso de los ensayos con Azocaseína y Azoalbúmina, 0.5 mL del sobrenadante fue mezclado con 0.5 mL de NaOH 0.5 M e incubado a temperatura ambiente por 15 min. Tras el tiempo de incubación se determinó la absorbancia de la mezcla a 440 nm y se calcularon las unidades de actividad proteolítica de acuerdo a Kumar y Jagannadham (2003).

5.6. Efecto del pH Sobre la Actividad Proteolítica de ECFN

Para evaluar el efecto del pH sobre la actividad proteolítica fue determinado de acuerdo a Mohamed *et al.* (2009). Para esto BSA al 1% fue disuelto en Citrato de sodio 0.1M (pH: 2.5-3.5), Acetato de sodio 0.1M (pH: 4.0-5.5), Fosfato de sodio 0.1M (pH: 6.0-7.5), Tris-HCl 0.1 M (pH: 8.0) y Carbonato de sodio 0.1M (pH: 9.0-12.0) respectivamente. Los ensayos de actividad se desarrollaron de acuerdo al procedimiento descrito y las UAP fueron calculadas para cada condición. Los resultados fueron expresados como UAP relativas respecto al máximo.

5.7. Actividad Proteolítica con Sustrato Específico

La actividad proteolítica específica fue determinada de acuerdo con Stauffer (1990) con algunas modificaciones. El ensayo consistió en incubar 10 μ L de extracto enzimático con el sustrato sintético N-benzoil-*DL*-arginina-p-nitroanilina (BAPNA) 5 mM en Tris-HCl 0.1M (pH 7, 0.1M NaCl) a 37°C. La liberación del producto nitroanilina fue monitoreado a 385 nm durante los primeros 10 min de reacción. Una

unidad de actividad específica fue definida como la cantidad de proteína que provoca un incremento de 1 Unidad de absorbancia por minuto a 385 nm.

5.8. Hidrólisis de Sustratos Naturales por ECFN

Para visualizar la preferencia sobre diferentes sustratos naturales, BSA 1% y caseinato 2% (disuelto en Tris-HCl 20 mM pH 7.0) y hemoglobina (disuelto en acetato de sodio 0.1 M pH 5.0) fueron incubados con 50 μ L de ECFN durante 60 min a 50°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se detuvo la reacción con la adición de una parte de solución muestra de SDS 2X (Tris-HCl 0.15 M pH 6.8/1.2% de SDS, 30% de glicerol, 15% de 2-mercaptoetanol y 0.001% de azul de bromofenol) y calentamiento a 100°C durante 5 min. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 15000g por 2 min a 4°C. Para visualizar el patrón de degradación de los diferentes sustratos, las muestras fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 18%. Para comparar los productos de la hidrólisis, se prepararon testigos negativos (inactivadas antes de la incubación) de cada proteína sustrato de acuerdo a A.N. Singh *et al.* (2010).

Para efecto de comparar el patrón de degradación de caseínas de ECFN y quimosina comercial, se incubaron 450 μ L de Caseinato al 2% con 50 μ L ECFN y 10 μ L de cuajo estandarizado Cuamex[®] (diluido 15:100 v/v), respectivamente. Para los ECFN se incubaron las muestras a 60°C inactivando a diferentes tiempos de hidrólisis (0, 20, 40, 60, 120, 240 y 360 min). En el caso del cuajo estándar, la reacción de hidrólisis se llevó a cabo a 35°C tomando muestras a los mismos tiempos. Todas las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida para su análisis de acuerdo a (Wagstaff *et al.*, 2002).

Para visualizar el efecto de las proteasas de ECFN sobre proteínas miofibrilares de pescado se procedió de la siguiente manera: músculo de tilapia fue homogenizado con H₂O destilada previamente calentada a 95°C a una relación 1:1 (p/v). El homogenado fue mantenido en baño de agua a 95°C por 15 min para la inactivación

térmica de las enzimas endógenas del músculo. Transcurrido el tiempo de inactivación, el homogenado fue puesto en baño de hielo. Posteriormente el pH homogenado fue ajustado a pH 4.0 y 7.0, fue llevado a 50°C y a continuación se adicionó el ECFN a una concentración final del 5%. Las muestras fueron colectadas e inactivadas a 100°C/15 min a los tiempos 0, 30, 60, 120 y 240 min para monitorear el proceso hidrolítico. Los hidrolizados fueron resuspendidos en una solución de 5% de dodecilsulfato de sodio y 0.1% de 2-mercaptoetanol en una relación 1:9 (p/v). con una solución que contenía. Las mezclas se calentaron a 80°C por 15 min con agitación constante y posteriormente fueron enfriadas a temperatura ambiente. Una vez finalizado el proceso de solubilización las muestras fueron centrifugadas a 5000g por 15 min a 25°C. Para el análisis por SDS-PAGE las muestras se prepararon bajo el procedimiento descrito por Shamloo *et al.* (2012).

5.9. Protocolo de Purificación

El protocolo de purificación parcial de proteasas del ECFN consistió principalmente de 3 pasos; el primer paso fue pasar el ECFN a través de una columna de vidrio (26 mm DI × 20 cm) conteniendo 25 mL de resina a DEAE-Sepharose CL-6B (GE Healthcare) pre-equilibrada con solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM, pH 7.0. Después de aplicar 200 mL de muestra (100 mL ECFN diluido con 100 mL de solución amortiguadora) a un flujo 1 mL/min, la columna fue lavada con aproximadamente 200 mL de la misma solución amortiguadora y posteriormente lavada con 200 mL Tris-HCl 20 mM pH 7.0, NaCl 50 mM en la misma solución. La proteína retenida en la matriz fue recuperada mediante la elución con gradiente de NaCl de 0.05 a 0.5 M en 200 mL a un flujo de 1 mL/min y colectando fracciones de 10 mL. Las fracciones activas se juntaron y fueron dializadas y concentradas por ultrafiltración utilizando membranas con peso molecular de corte de 10 kDa. A 100 mL de la muestra dializada y concentrada DEAE_{>0.05-0.4M} se le adicionó sulfato de amonio al 50% de saturación con agitación moderada para su precipitación en frío. El pellet recuperado por centrifugación (7000g

por 30 min/4°C) fue solubilizado en Tris-HCl 20mM, pH 7.0 y posteriormente dializada. La muestra obtenida de este proceso (SA_{50%}) se sometió a una segunda cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna de Q-Sepharose HiTrap HP de 5x1 mL (GE Healthcare) equilibrada con 50 mL de Tris-HCl 20 mM, pH 7.0. Después de aplicar la muestra, la columna se lavó con 25 mL de la misma solución. La elución de la proteína unida a la matriz se realizó por etapas utilizando Tris-HCl 20 mM, pH 7.0 con NaCl a concentración 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 M a un flujo de 1 mL/min. Las distintas fracciones (aproximadamente 150 mL) fueron posteriormente concentradas y dializadas por ultrafiltración en frío. Las fracciones activas QSeph_{>0.02-0.1M}, QSeph_{>0.1-0.2M}, QSeph_{>0.2-0.3M}, y QSeph_{>0.3-0.4M} fueron mantenidas a 4°C para análisis de actividad coagulante, análisis de proteínas por SDS-PAGE y actividad por zimografía.

5.10. Análisis de Proteínas por Electroforesis SDS-PAGE

Para determinar el peso molecular y la pureza de la proteína durante cada etapa de purificación, las fracciones se analizaron por electroforesis de SDS-poliacrilamida en geles discontinuos, utilizando un gel de resolución al 15% de acrilamida y un gel concentrador al 5% de acrilamida. Todas las muestras (ECFN, fracciones e hidrolizados) fueron preparadas bajo el mismo procedimiento. Las muestras fueron mezcladas con solución de SDS 2X (conteniendo Tris-HCl 0.15 M pH 6.8, 1.2% de SDS, 30% de glicerol, 15% de β-mercaptoetanol y 0.001% de azul de bromofenol) a una relación 1:1 (v:v). La mezcla fue calentada a 100°C por 5 min y centrifugada a 15000×g por 2 min 20°C. Se cargaron los volúmenes adecuados para ajustar la concentración de proteína en cada carril. Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo en un equipo Mini-PROTEAN 3 Cell de BioRad a 40V/20 min para concentración y 120V/2h para separación. Se utilizó un estándar de amplio rango para proteína (14.5-200 kDa). Después de la separación electroforética los geles fueron teñidos con solución de Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0.25%, 45% metanol y 10% ácido acético. Posteriormente los geles fueron desteñidos con solución de metanol:ácido acético

(45:10%) y fotografiados en un fotodocumentador BioRad G-700 para su análisis de acuerdo a Laemmli (1970).

5.11. Actividad de Proteasas por Zimografía

La actividad enzimática fue visualizada en geles de acrilamida polimerizados con gelatina, de acuerdo a la metodología de Díaz-López *et al.* (1998) con modificaciones. La gelatina fue polimerizada en el gel durante su elaboración a una concentración final de 0.1% de sustrato, 12% de acrilamida y urea al 0.1M. Las muestras fueron mezcladas con solución SDS 2X (sin β -mercaptoetanol) a una relación 1:1 (v:v) y sin someterse a calentamiento. La electroforesis se llevó a cabo de acuerdo a la sección anterior. Posteriormente los geles fueron tratados con Triton X-100 al 2.5% durante 1 h con agitación constante seguido de tres lavados con H₂O destilada. Los geles fueron incubados en acetato de sodio 0.1M, pH 5.0 por 12 h a 50°C con agitación constante. Transcurrido el tiempo de incubación los geles fueron teñidos y desteñidos bajo el procedimiento descrito y fotografiados para su análisis. La observación de zonas blancas (sin teñir) en los geles fueron consideradas como zonas de actividad proteolítica.

5.12. Efecto de Inhibidores Sobre la Actividad Proteolítica

La inhibición de la actividad enzimática por pepstatina A (0.01 mM), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 1 mM), leupeptina (0.1 mM), E-64 (1 mM), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 5 mM), ditrioteitol (DTT, 5 mM) fue determinada incubando 50 μ g de enzima con cada inhibidor por 45 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se incorporó el sustrato (hemoglobina en acetato de sodio 0.1 M pH 5.0) a la mezcla de reacción y fue incubada por 60 min a 50°C. La reacción se detuvo con la

adición de TCA al 5%, para posteriormente centrifugarse a 15000g por 10 min a 4°C. El incremento en la absorbancia del sobrenadante a 280 nm fue utilizado para calcular la actividad residual con respecto a la actividad en ausencia de inhibidor bajo condiciones normales de ensayo (Kumar *et al.*, 2007).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Contenido de Proteína en Extractos Crudos de Flor de Naranja

Los tejidos vegetales poseen una amplia variedad de proteínas cuya estructura, función y concentración depende de varios factores tales como fuente y tipo de tejido. Se ha reportado que el contenido de proteínas en las flores frescas de naranja disminuye de 15 a 8 mg/g durante el desarrollo floral y que la proteína soluble puede representar hasta el 85% de la proteína total (Sagee y Lovatt, 1991). Los extractos obtenidos de flores secas en el presente estudio mostraron un contenido de proteína en el rango de 25 a 35 mg/mL utilizando una relación 1:10 (p:v) muestra:solución extractora. La concentración de proteínas en extractos vegetales depende de factores tales como procedimiento de extracción, pH y fuerza iónica de solución extractora, así como la fuente y tipo de tejido. El contenido de proteína ECFN en polvo liofilizado fue de 27 g/100g (base seca, factor de conversión de nitrógeno 6.25), un contenido mayor que el valor de 15.2 g/100g (b.s.) reportado para extractos de *Cynara carduculus* en su forma liofilizada (Fernández-Salguero *et al.*, 2002).

El perfil proteico del ECFN obtenido mediante el análisis por SDS-PAGE (Figura 3A) mostró una gran diversidad de bandas proteicas donde se pueden observar entre 8-12 bandas de las cuales 6 de estas se encuentran en el rango de peso molecular de 32 a 90 kDa. El número de bandas observables depende de la integridad de la muestra y los protocolos utilizados para su visualización y análisis. Muccilli *et al.* (2009), logró identificar, mediante protocolos para análisis proteómico de hojas de naranja, la presencia de 55 bandas proteicas en SDS-PAGE.

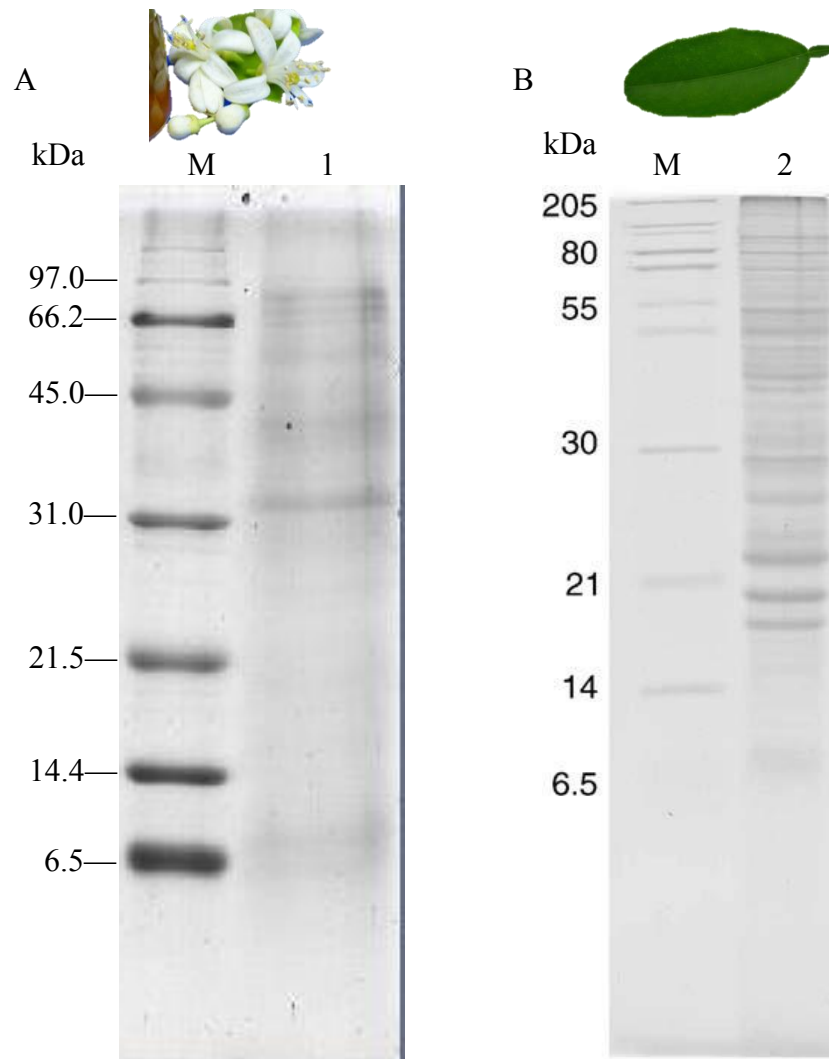


Figura 3. Análisis de proteínas por SDS-PAGE de extractos de flor y hojas de naranjo.

(A) Perfil proteico del extracto crudo de flor de naranjo (ECFN) obtenido en este estudio: (M) marcador de peso molecular, (1) ECFN 40 μ g de proteína. (B) Perfil típico de hojas de naranjo, adaptado de Muccilli *et al.* (2009) y reportado para análisis proteómico mediante extracción con TCA/acetona (línea 2),

6.2. Caracterización de la Actividad Coagulante en Extractos Crudos de Flor de Naranja

Las proteasas presente en extractos vegetales pueden encontrarse en concentraciones adecuadas para lograr la coagulación de la leche en tiempos cortos como ocurrió cuando se utilizaron ECFN obtenidos en este estudio. Extractos de ECFN llegaron a presentar fuerza coagulantes de aproximadamente 0.33 unidades coagulantes de la leche/mL de extracto (UCL/mL) en un rango de temperatura de 60 a 70°C, condición a la cual el extracto mostró su máxima actividad coagulante (Figura 4). Lo anterior indica que bajo estas condiciones de ensayo se requiere aproximadamente 3 mL de ECFN para coagular 100 mL de leche en 40 min. No obstante para coagular el mismo volumen de leche a temperatura de 40°C, el volumen requerido de extracto fue de aproximadamente 5 mL. Lo anterior debido a que la actividad coagulante de los ECFN mostró una dependencia de la temperatura, observándose una disminución progresiva del tiempo de coagulación cuando la temperatura se incrementó de 35 a 60°C. Al incrementar la temperatura por encima de los 70°C se logra observar una caída drástica de la actividad coagulante, lo anterior debido posiblemente a la desnaturalización de las proteasas a temperaturas elevadas (Chazarra *et al.*, 2007; Mohamed *et al.*, 2010; Kumari *et al.*, 2012).

Para efectos de comparación, generalmente la actividad coagulante se determina bajo condiciones de temperatura entre los 30-35°C óptimas para el cuajo comercial (Uchikoba y Kaneda, 1996; Guiama *et al.*, 2010; Pontual *et al.*, 2012). Sin embargo la mayoría de las preparaciones enzimáticas obtenida de plantas muestran su máxima actividad coagulante entre los 40-70°C. La actividad tipo quimosina mostrada por proteasas vegetales se ve influenciada por diferentes factores, tales como estadio fisiológico, concentración, tipo de proteasa y fuente vegetal. Las enzimas coagulantes presentes en extractos de *Actinidia deliciosa*, *Cucumis melo*, *Zingiber officinale*, *Moringa oleífera*, *Ficus religiosa* y *Solanum dubium*, mantienen una alta actividad coagulante (de entre 50-60°C) durante el ensayo (Huang *et al.*, 2011; Pontual *et al.*, 2012; Mazorra-Manzano *et al.*, 2013).

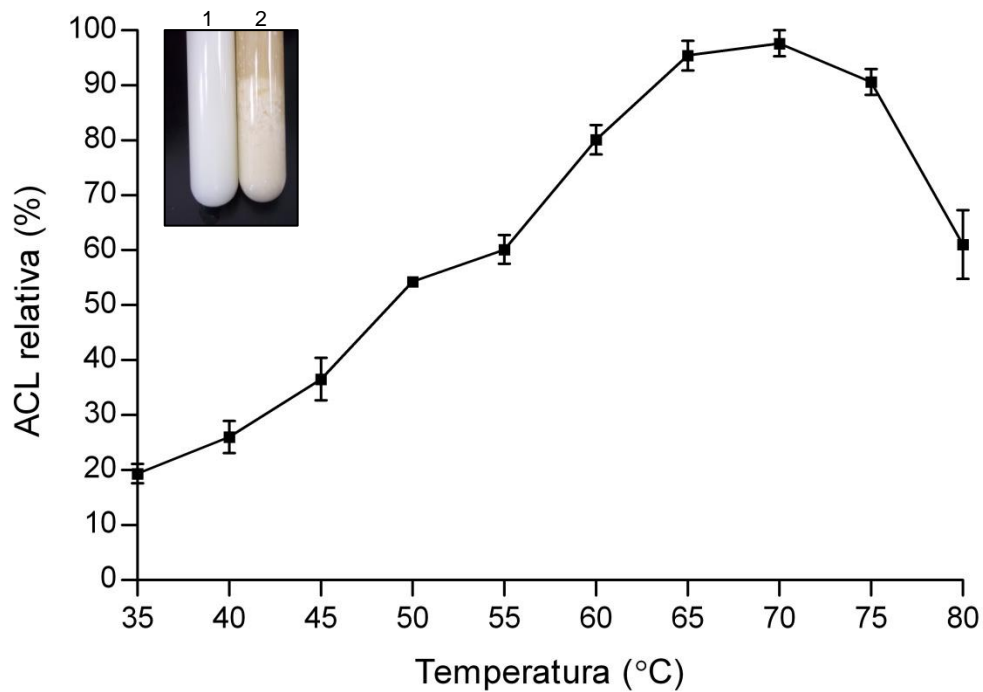


Figura 4. Efecto de la temperatura sobre la actividad coagulante de ECFN.

La actividad coagulante de la leche para cada temperatura se reporta como el porcentaje de actividad relativa respecto al máximo observado. Los resultados se muestran como el promedio de tres replicas y las barras representan el error estándar de la media. La foto insertada en el gráfico corresponde a la leche control (tubo 1) y la leche después de coagular con ECFN (tubo 2).

Bruno *et al.* (2010), reportan una alta actividad coagulante en extractos de *Bromelia hieronymi* a condiciones de ensayo superiores a los 45°C. Por su parte Chazarra *et al.* (2007), reportan para extractos de *Cynara scolymus* una disminución progresiva del tiempo de coagulación al incrementar la temperatura sobre los 50°C.

El pH juega un papel importante en la actividad mostrada por las enzimas proteolíticas presente en los extractos. Quimosina y sus variantes recombinantes exhiben una mayor actividad coagulante en un rango de pH ácido (Kappeler *et al.*, 2006). No obstante, como práctica común y por las características de la lecha, la coagulación de la se realiza a condiciones de pH ligeramente ácidas entre 6.5 y 6.8 durante la elaboración de quesos (Emmons, 1990; Harboe *et al.*, 2010). Las proteasas aspártica cinarasas, ciprocinas y cardosinas (*Cynara cardunculus*), además de onopordosina (*Onopordum acanthium*), poseen actividad tipo quimosina, mostrando una máxima actividad coagulante en un rango de pH entre 5.5 y 6.5 (Esteves *et al.*, 2003; Silva y Malcata, 2005b; Brutti *et al.*, 2012). Por otra parte las proteasa del tipo serina presentes en *Solanum dubium*, *Cucumis melo* y *Streblus asper*, muestran su máxima actividad a pH alcalino (8.0-12.0); aunque son capaces de coagular la leche a pH ligeramente por debajo de la neutralidad (Uchikoba y Kaneda, 1996; Mohamed *et al.*, 2010; Tripathi *et al.*, 2011). Las CPs como zingibaina (*Zingiber officinale*), papaína (*Carica papaya*), actinidina (*Actinidia deliciosa*) y religiosina (*Ficus religiosa*) coagulan la leche en la región ácido-neutro (Hashim *et al.*, 2011; Lo Piero *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2012). Se acepta como regla general que la mayoría de las proteasas son capaces de coagular la leche; sin embargo, esta propiedad dependerá de las características de la enzima y condiciones del proceso de coagulación (pH y temperatura de la leche) que se requieran para elaborar cada tipo de queso.

6.3. Efecto del pH sobre la Actividad Proteolítica

El pH, al igual que la temperatura, es un factor que influye en la actividad de las proteasas dependiendo del tipo de aminoácidos involucrados en su estabilidad, tipo de residuos involucrados en la catálisis y la disponibilidad del sustrato a las condiciones de reacción. Generalmente, las proteasas aspárticas muestran mayor actividad a condiciones ácidas debido a los residuos Asp encontrados en sus sitio activo (Dunn y Hung, 2000). En cambio las proteasas tipo serina y cisteína muestran su máxima actividad en la región neutra alcalina.

En esta investigación se encontró que la actividad de los ECFN fue influenciada por el pH del ensayo (Figura 5), indicando que la actividad podría atribuirse a más de un tipo de proteasa. De esta figura se puede observar una zona de actividad en la región ácida (3.5-5.5), lo que sugiere la presencia de proteasas del tipo aspárticas (PAs). Estas enzimas han sido detectadas en diferentes tejidos vegetales incluyendo semillas, hojas y flores de diferentes plantas, resultando ser el tipo de proteasas más adecuadas para la producción de quesos (Verissimo *et al.*, 1995; Simoes y Faro, 2004; Claverie y Vega, 2007). Devaraj *et al.* (2008), identificaron una proteasa aspártica en látex de *Ficus racemosa*, con un rango óptimo de actividad entre 4.5-6.5. Un rango similar de actividad fue reportado al evaluar la actividad de proteasas ácidas en *Centaurea calcitrapa* durante la germinación (Salvador *et al.*, 2006). Se ha reportado mediante estudios de autodigestión, que los extractos de hoja de naranjo presentan una máxima actividad proteolítica en el rango de pH entre 3.5 a 5.0 (García y Moreno, 1986; Peñarrubia *et al.*, 1988), al igual que en el presente estudio para flores de naranjo, sólo que utilizando BSA como sustrato. Se pueden observar en la Figura 5, que el ECFN presenta otras dos regiones de pH con alta actividad proteolítica una en la región neutra-alcalina (pH 7.0-10.0) y la otra por encima de pH 10.0, las cuales posiblemente se deben a la presencia de serin y cistein proteasas, las cuales muestran actividad en un rango amplio de pH en la región neutra-alcalina.

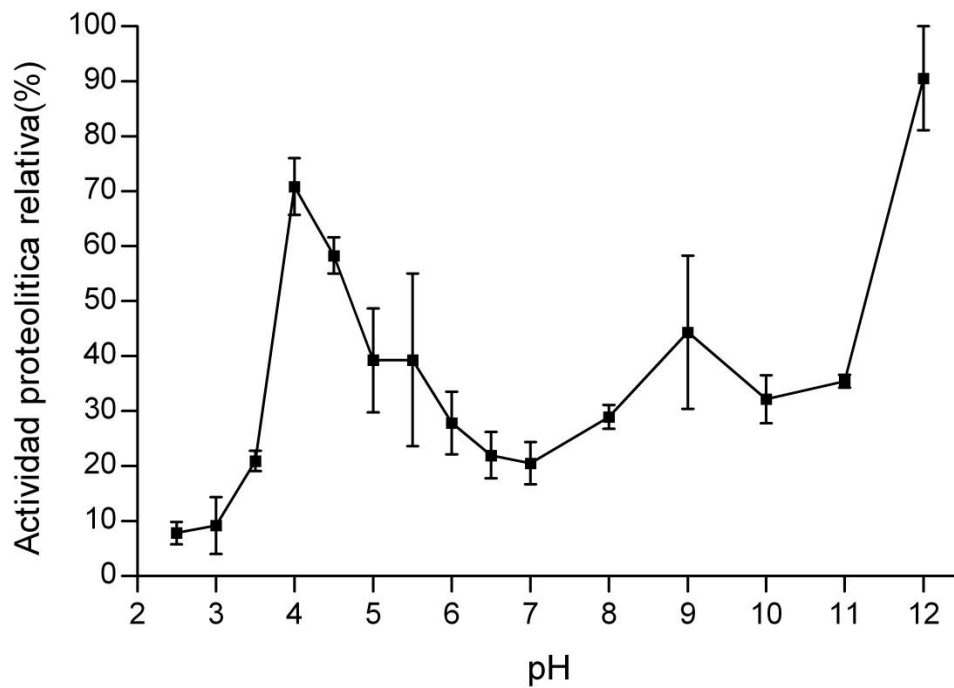


Figura 5. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica de flor de naranjo.

La actividad proteolítica para cada pH se reporta como el porcentaje de actividad relativa respecto al máximo observado. Los resultados se muestran como el promedio de tres replicas y las barras representan el error estándar de la media.

Siti y Rosma (2011) reportaron en extractos de hojas de *Artocarpus integer* un incremento similar en la actividad proteolítica para la región neutra-alcalina, asumiendo que dicha actividad fue debido a la presencia de una cistein proteasa. Otros estudios también han evidenciado la presencia de este tipo de proteasas en extractos de *Euphorbia mili* (Fonseca *et al.*, 2010), *Calotropis procera* (A.N. Singh *et al.*, 2010), *Hordeum vulgare* (Watanabe *et al.*, 2009), las cuales mostraron actividad en un rango de pH óptimo entre 7.5 y 11. La actividad a pH alcalino se ha relacionado con proteasa del tipo serina (SPs) (pH óptimo 6.5-9.0). Diferentes proteasas de tipo SP se han aislado e identificado en extractos a partir de semillas de *S. asper*, *S. dubium* así como de exudados (látex) de *C. asiaticum* e *I. carnea* (Kumar *et al.*, 2007; Mohamed *et al.*, 2009; K.A. Singh *et al.*, 2010; Tripathi *et al.*, 2011).

6.4. Efecto del Tipo de Sustrato Sobre la Actividad Proteolítica

Uno de los problemas al evaluar la actividad proteolítica de los extractos vegetales radica en la correcta selección del sustrato utilizado en los ensayos de actividad. En este estudio se exploró el uso de diferentes sustratos naturales para evaluar la actividad en el ECFN. En este caso la mayor actividad proteolítica observada fue bajo condiciones de ensayo ácidas utilizando hemoglobina como sustrato (pH 5.0, 50°C), con actividad proteolítica específica de 0.37 U/mg. Por otro lado, cuando se utilizó albúmina bovina y azoalbúmina, bajo las mismas condiciones, se obtuvieron valores de actividad proteolítica específica de 0.10 y de 0.31 U/mg, respectivamente.

El análisis por SDS-PAGE de diferentes proteínas hidrolizadas por el ECFN reveló que utilizando BSA y caseína, como sustrato, la acción de las proteasas fue más selectiva (Figura 6, línea 3 y línea 7) ya que se pueden visualizar las proteínas casi intactas, sólo algunos productos de hidrólisis. Lo anterior corresponde con la baja actividad caseinolítica (0.08 U/mg) determinada bajo las mismas condiciones de ensayo. Por otra parte, se puede observar que las proteasas del ECFN fueron más eficientes en la hidrólisis de hemoglobina en condiciones ácidas (Figura 6, línea 5) visualizando una mayor heterogeneidad (barrido) en los productos de hidrólisis.

La mayoría de las proteasas utilizar, en mayor o menor grado diferentes proteínas, la selección del sustrato más adecuado dependerá del tipo de proteasas bajo estudio y las condiciones que demanda el ensayo de actividad. La hemoglobina y caseína se han utilizado para determinar la actividad de diferentes endopeptidasas; sin embargo, algunas de ellas, específicamente las proteasas aspárticas demandan condiciones ácidas para llevar a cabo eficientemente la catálisis (pHs 2.5-5.0), limitando el uso de caseínas debido a su baja solubilidad (pI~4.8) en estas condiciones (Guevara *et al.*, 2001). Para el caso de las proteasas neutras-alcálinas el uso de caseína y su derivado cromogénico azocaseína ha sido adecuado para evaluar proteasas presentes en *Euphorbia hirta* (Kumar *et al.*, 2012), *Cucumis trigonus* (Asif-Ullah *et al.*, 2006), *Ficus religiosa* (Kumari *et al.*, 2012) y *Crinum asiaticum* (K.A. Singh *et al.*, 2010)

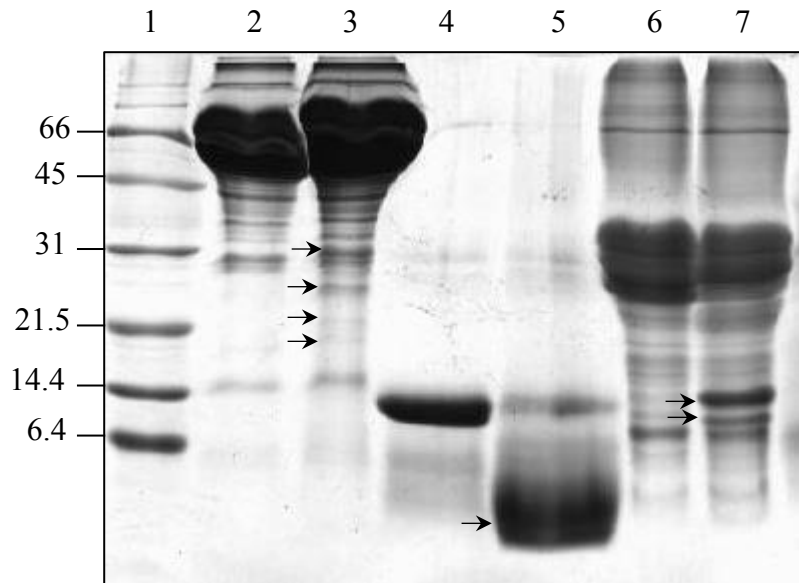


Figura 6. Hidrólisis de seroalbúmina bovina, hemoglobina y caseínas por proteasas de flor de naranjo.

Línea 1) marcadores de peso molecular; 2) ECFN + BSA, sin incubar; 3) ECFN + BSA, incubado 60 min/50°C; 4) ECFN + Hb, sin incubar; 5) ECFN + Hb, incubado 60 min/50°C; 6) ECFN + Cas, sin incubar; 7) ECFN + Cas, incubado 60 min/50°C. BSA (1%) y caseínas (2%) fueron disueltos en Tris-HCl 20 mM pH 7. La hemoglobina (0.5%) fue disuelta en acetato de sodio 0.1M, pH 5. Las flechas indican los productos de hidrólisis. Geles de poliacrilamida al 18% y teñidos con azul de Coomasie. Se cargaron 70 µg (2-3), 50 µg (4-5) y 60 µg (6-7) para visualizar los productos de hidrólisis.

6.5. Hidrólisis de Proteínas Miofibrilares por Extractos Crudos de Flor de Naranja

La correcta selección de las condiciones de hidrólisis es el paso más importante para la producción de hidrolizados proteicos. Los parámetros como el tipo de proteasas, la relación enzima/sustrato (E/S), pH, temperatura y grado de hidrólisis determinan las propiedades de los hidrolizados (Neklyudov *et al.*, 2000). De acuerdo al comportamiento observado de la actividad proteolítica del ECFN respecto al pH (Figura 5), se estableció llevar a cabo el proceso de hidrólisis de proteínas musculares bajo condiciones de pH 4.0 y 7.0. Los resultados obtenidos mostraron que las proteasas del ECFN fueron efectivas para la hidrólisis de las proteínas miofibrilares en ambas condiciones de pH.

En los hidrolizados producidos bajo condiciones ácidas (pH 4.0) se observó una mayor degradación de las principales proteínas miofibrilares miosina y actina dentro de los primeros 60 min de hidrólisis (Figura 7A). Así mismo, al prolongar el tiempo de incubación se aprecia la desaparición de las bandas correspondientes a la cadena pesada de miosina (~220 kDa) y actina (~42 kDa) dando lugar a la formación de productos heterogéneos de un peso molecular menor a 20 kDa visualizados como un barrido en el gel. Por otro lado bajo condiciones de neutralidad (pH 7.0) las proteasas de naranja mostraron menor actividad sobre las diferentes proteínas miofibrilares (Figura 7B) en comparación con el hidrolizado obtenido bajo condiciones ácidas; sin embargo, se observó una preferencia para hidrolizar las proteínas que aparecen en pesos molecular alrededor de 28 y 15 kDa (marcadas con * en el gel), aparentemente relacionadas alguna de las cadenas ligeras de miosina.

El uso de papaína en diversos estudios, ha mostrado una mayor degradación de las proteínas miofibrilares (Ashie *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2013). Recientemente, Rawdkuen *et al.* (2013), encontró un patrón de hidrólisis similar en músculos tratados con extractos proteolíticos de *Calotropis procera*, observando que las proteasas presentes en el extracto mostraron una mayor preferencia sobre miosina; sin embargo obtuvieron una hidrólisis completa tanto de miosina como actina al incrementar la relación E/S.

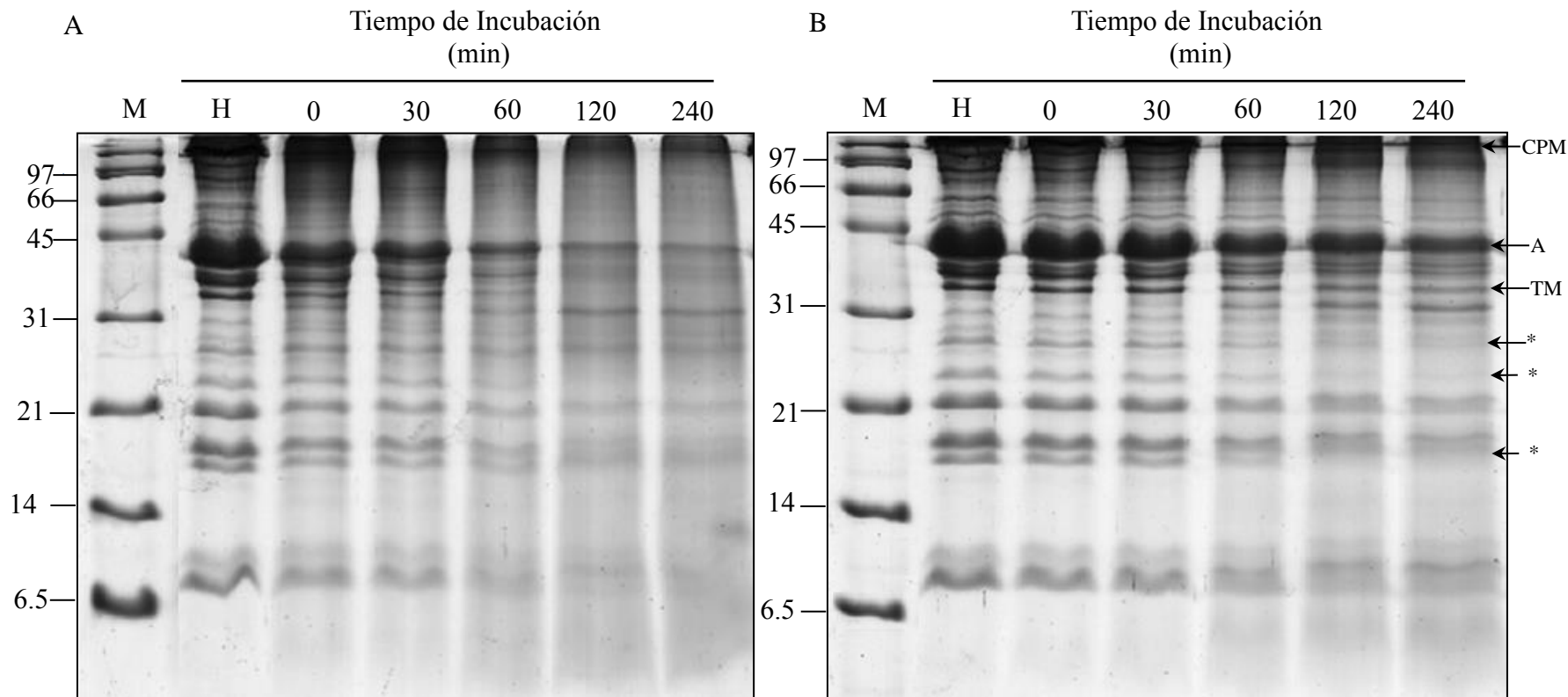


Figura 7. Hidrólisis de proteínas del músculo de tilapia por proteasas de ECFN.

(A) Hidrolizado de músculo de tilapia producido a pH 4.0. (B) Hidrolizado de músculo de tilapia producido a pH 7. Se cargaron 150 µg de proteína por carril. Marcador de peso molecular (M), homogenado de músculo de tilapia (H). CPM: cadena pesada de miosina 210 kDa (CPM); A: actina 42 kDa; TM: tropomiosina 35 kDa y otras proteínas (*) susceptibles a la hidrólisis por proteasas en ECFN.

Por su parte Liu *et al.* (2011), encontraron que el tratamiento con extractos de kiwi (*Actinidia deliciosa*) también mostró efectividad para hidrolizar tanto actina como miosina independientemente de la fuente muscular (pollo, cerdo y bovino). Ha *et al.* (2012) evaluó extractos comerciales de bromelaina (*A. comosus*), actinidina (*A. deliciosa*) y zingibaina (*Z. officinalis*) como agentes ablandadores alternativos a papaína, encontrando que el tratamiento con actinidina fue más efectivo para la hidrólisis de proteínas miofibrilares; además observó el efecto de estos tratamientos sobre proteínas del tejido conectivo (colágeno), visualizando una mayor hidrólisis de este tipo de proteínas en las muestras tratadas con zingibaina.

La capacidad que muestran las proteasas vegetales para hidrolizar diferentes proteínas miofibrilares y de tejido conectivo demuestran su potencial como agentes ablandadores. Los perfiles obtenidos en este estudio demuestran que los ECFN contienen proteasas con características atractivas para implementarse en la producción de hidrolizados proteicos funcionales y/o péptidos bioactivos.

6.6. Comparación del Perfil Peptídico de Caseínas Hidrolizadas por ECFN y Quimosina

La capacidad para hidrolizar las caseínas es una característica importante en la evaluación del potencial biotecnológico de las proteasas vegetales para ser utilizadas como coagulantes de la leche. Aunque la mayoría de las proteasas son capaces de coagular la leche, pocas de ellas han sido exitosas para su aplicación en la elaboración de quesos, debido a la excesiva actividad caseinolítica que presentan.

Con el fin de evaluar el potencial de la flor naranjo como nueva fuente de proteasas coagulantes, se realizó un análisis comparativo por SDS-PAGE sobre el perfil peptídico generado por la acción de las proteasas del ECFN sobre las caseínas. Se encontró que los tres componentes caseicos α s-caseínas (α s-CN), β -caseínas (β -CN) y κ -caseínas (κ -CN) son susceptibles a ser parcialmente hidrolizadas por las proteasas presentes en el ECFN (Figura 8). Sin embargo, se encontró que las proteasas de naranjo hidrolizan preferentemente la fracción κ -CN durante los primeros minutos del proceso de coagulación, el cual se puede apreciar mediante la aparición de un fragmento peptídico de 14 kDa (Figura 8A) correspondiente a la para- κ -caseína (para- κ -CN, f₁₋₁₀₅) generado por la hidrólisis específica del enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la κ -CN (Reid *et al.*, 1997; Horne y Banks, 2004).

Al prolongar el tiempo de incubación se logra observar una mayor acción de las proteasas del ECFN sobre las otras fracciones caseicas. Contrario a esto, la quimosina, proteasa utilizada como coagulante por excelencia, muestra una mayor especificidad sobre el enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la κ -CN y en menor grado sobre las otras caseínas (Figura 8B). Otras proteasas vegetales que se han utilizado como sustitutos del cuajo, aisladas de flores de cardón (*C. cardunculus* y *C. scolymus*), moringa (*M. oleífera*), cardo mariano (*S. marianum*), así como semillas de *S. dubium*, han mostrado patrones de degradación caseica donde se observa una alta preferencia sobre la κ -caseína y en menor grado sobre otras caseínas al igual que quimosina (Chazarra *et al.*, 2007; Mohamed *et al.*, 2010; Pontual *et al.*, 2012).

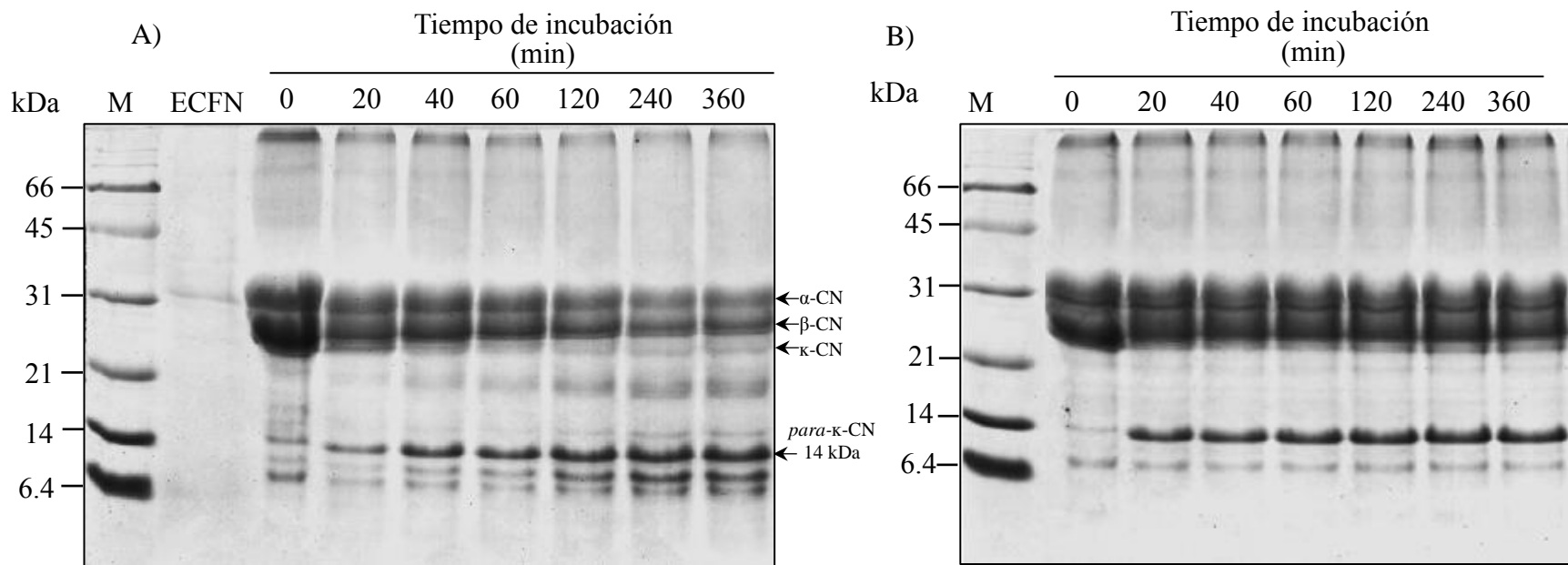


Figura 8. Hidrólisis de caseínas por proteasas de flor de naranjo y su comparación con quimosina.

(A) Perfil de hidrólisis de caseínas por proteasas del ECFN. (B). Perfil de hidrólisis de caseínas por quimosina comercial.

Las hidrólisis se llevó a cabo en Tris-HCl 20 mM, pH 7.0, a una relación E/S de 1:7 a 50°C para el ECFN y 35°C para quimosina. Se cargaron 60 µg de proteína por carril. α -caseínas (α -CN), β -caseínas (β -CN), κ -caseínas (κ -CN) y *para*- κ -caseína (*para*- κ -CN).

La hidrólisis específica de k-caseína es una característica atractiva para la tecnología quesera, incrementando los rendimientos al minimizar la pérdida de proteína en el suero debido a la hidrólisis excesiva de otras caseínas de la leche. Además, una proteólisis limitada reduce el desarrollo de sabores indeseables en el producto final y mejora las características de textura (Silva y Malcata, 2005; Pino *et al.*, 2009)

La heterogeneidad en la preferencia a los distintos sustratos y productos de hidrólisis generados por el ECFN se debe a la diversidad de proteasas activas que podría contener el extracto, no obstante, la preferencia sobre κ -CN de algunas de estas, es una característica importante que mediante su aislamiento podría definir su potencial como coagulante alternativo a quimosina para la producción de quesos.

6.7. Efecto de Inhibidores Sobre la Actividad Proteolítica en ECFN

La presencia de proteasas en distintas plantas, concentración y diferentes tipos, sugieren una gran diversidad de funciones. Las proteasas vegetales tienen la capacidad de actuar en mayor o menor grado sobre diferentes proteínas como sustratos y actuar en rangos específicos de pH, lo que brinda valiosa información sobre la naturaleza de su actividad; sin embargo, las pruebas con inhibidores específicos de proteasas han sido utilizadas para corroborar la identidad de las enzimas proteolíticas presentes en los distintos extractos vegetales (Llorente *et al.*, 2004; Bruno *et al.*, 2008; Tripathi *et al.*, 2011).

En este estudio se encontró que la actividad proteolítica de los ECFN a pH ácido utilizando hemoglobina fue sensible a la presencia de pepstatina A, indicando que la actividad a dichas condiciones se podría deber a la presencia de proteasas aspárticas en el extracto (Figura 9). Otras PAs vegetales aisladas de *C. scolyumus*, *A. thaliana* y *S. tuberosum* muestran sensibilidad a pepstatina A (Guevara *et al.*, 2001; Sidrach *et al.*, 2005; Mazorra-Manzano y Yada, 2008). Bajo las mismas condiciones también se observó una inhibición parcial mediante la incubación de extracto con leupeptina, inhibidor que tiene la capacidad de actuar en diferente grado sobre proteasas tipo serina y cisteína. En contraste con lo anterior, al evaluar el efecto de distintos inhibidores, utilizando caseína como sustrato a pH neutro, se observó que la presencia de DTT inhibió parcialmente la actividad en el ECFN (Figura 10). Esto pudiera deberse a que algunas de las proteasas presentes en ECFN, pudiesen presentar enlaces disulfuros relacionados con la estabilidad de su estructura. Un efecto similar fue observado para nerifolina S una SP dimérica de *E. nerifolia* que bajo condiciones reductoras pierde completamente su actividad (Prakash *et al.*, 2012). Estos resultados indican que los ECFN presentan una gran diversidad de enzimas proteolíticas, principalmente proteasas aspárticas, serinas y cisteínas, representando una fuente potencial para estudios de purificación y caracterización con el fin de determinar futuras aplicaciones biotecnológicas.

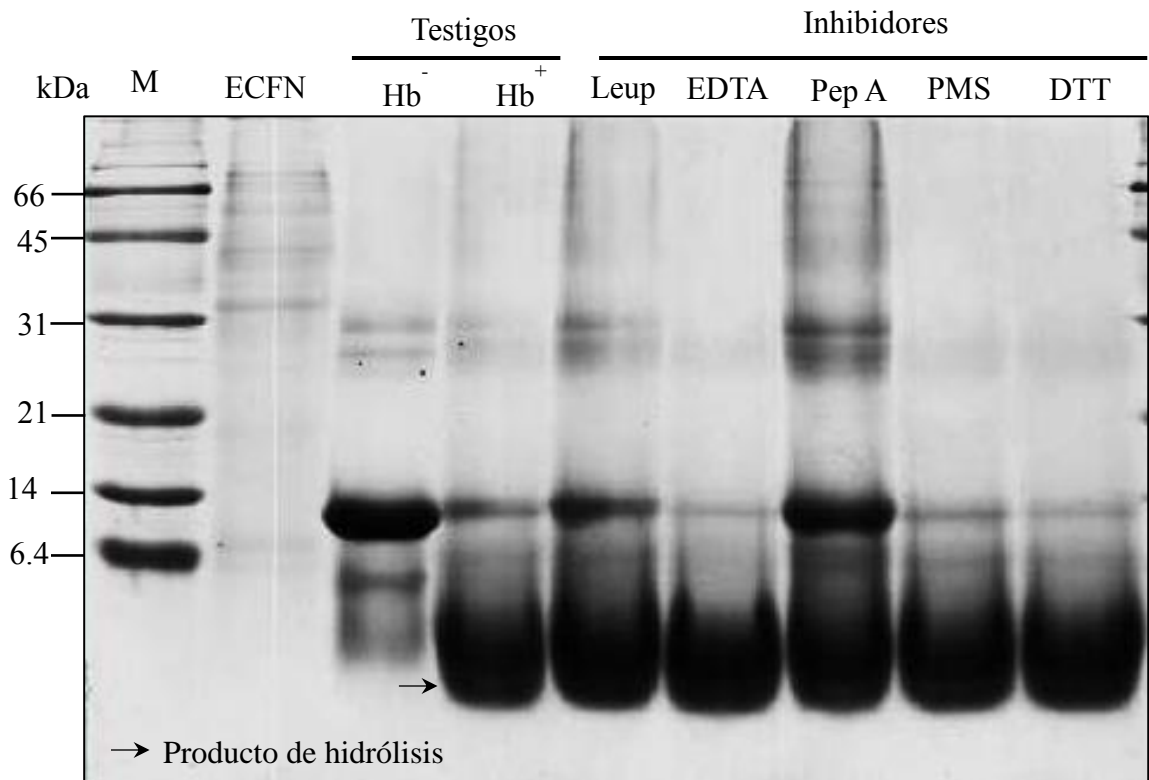


Figura 9. Efecto de inhibidores sobre la actividad de proteasas del ECFN utilizando hemoglobina como sustrato.

Marcadores de peso molecular (M), extracto crudo de flor de naranjo (ECFN), testigos: Hb⁻ (sustrato+ECFN sin incubar), Hb⁺ (sustrato+ECFN incubados 50°C/60 min), inhibidores: leupeptina (proteasas cisteína y serina), EDTA (metaloproteasas), pepstatina A (proteasas aspárticas), PMSF (proteasas serina), DTT (agente reductor). Se inyectaron 50 µg de proteína por carril. Las abreviaciones Pep A y Leup se refieren a los inhibidores pepstatina A y leupeptina respectivamente.

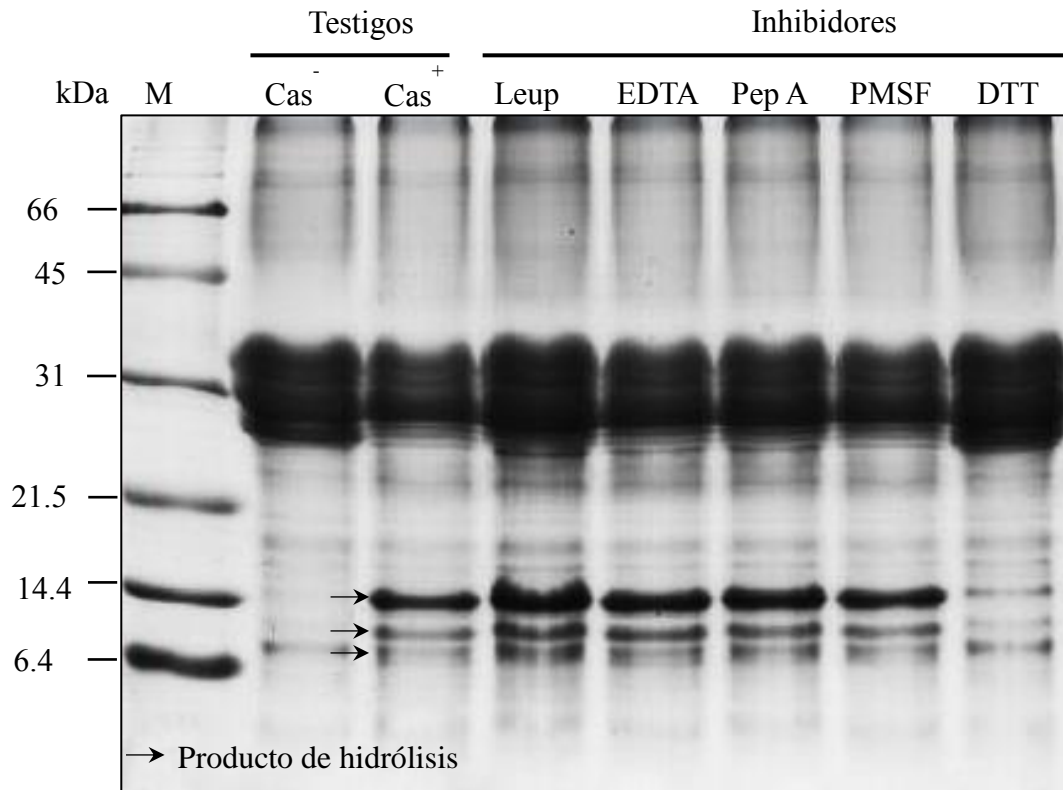


Figura 10. Efecto de inhibidores sobre la actividad caseinolítica de proteasas del ECFN. Marcadores de peso molecular (M), testigos: Hb^- (sustrato+ECFN sin incubar), Hb^+ (sustrato+ECFN incubados 50°C/60 min), inhibidores: leupeptina (proteasas cisteína y serina), EDTA (metaloproteasas), pepstatina A (proteasas aspárticas), PMSF (proteasas serina), DTT (agente reductor). Se inyectaron 60 μg de proteína por carril. Las abreviaciones Pep A y Leup se refieren a los inhibidores pepstatina A y leupeptina respectivamente.

6.8. Purificación Parcial de una Proteasa de *Citrus aurantium* (CitrusP)

El protocolo utilizado para la purificación parcial de una de las proteasas del ECFN consistió en el uso de cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Sepharose), seguido de una precipitación con sulfato de amonio al 50% y una segunda cromatografía de intercambio aniónico utilizando Q-Sepharose.

La primer etapa de purificación consistió en hacer pasar 200 mL de ECFN previamente diluido con Tris-HCl 20 mM, pH 7.0 en una proporción 1:1, a través de una resina DEAE-Sepharose CL-6B previamente equilibrada con Tris-HCl 20 mM, pH 7.0. El cromatograma muestra que la mayor proporción de proteínas más activas fueron eluidas en un rango de fuerza iónica entre 0.2-0.4 M de NaCl (Figura 11). Por lo que para el establecimiento del protocolo se decidió realizar un prelavado con 0.05 M de NaCl para remover la mayor cantidad de proteínas contaminantes y pigmentos de baja interacción con la resina y posteriormente recuperar la fracciones más activas mediante el uso de 0.4 M de NaCl en Tris-HCl 20 mM, pH 7.

El siguiente paso consistió en determinar la concentración mínima de sulfato de amonio requerida para recuperar una mayor actividad proteolítica mediante protocolos de precipitación, la muestra concentrada y dializada obtenida de la cromatografía por DEAE (DEAE_{>0.05-0.4M}) se sometió a una precipitación secuencial con sulfato de amonio con porcentajes de saturación desde 20% hasta un 80%, encontrando que la mayor actividad puede ser recuperada al utilizar 50% de saturación con sulfato de amonio (datos no mostrados), por lo que dicha condición fue establecida como segundo paso de purificación. A la fracción obtenida de este proceso se le denominó SA_{50%}.

El tercer paso de purificación consistió en una cromatografía de intercambio aniónico utilizando una resina de Q-Sepharose. La elusión de la proteína ligada se realizó por pasos utilizando incrementos de 0.1 M de NaCl en Tris-HCl 20 mM, pH 7.0. Las fracciones más activas fueron las eluidas con 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 M de NaCl.

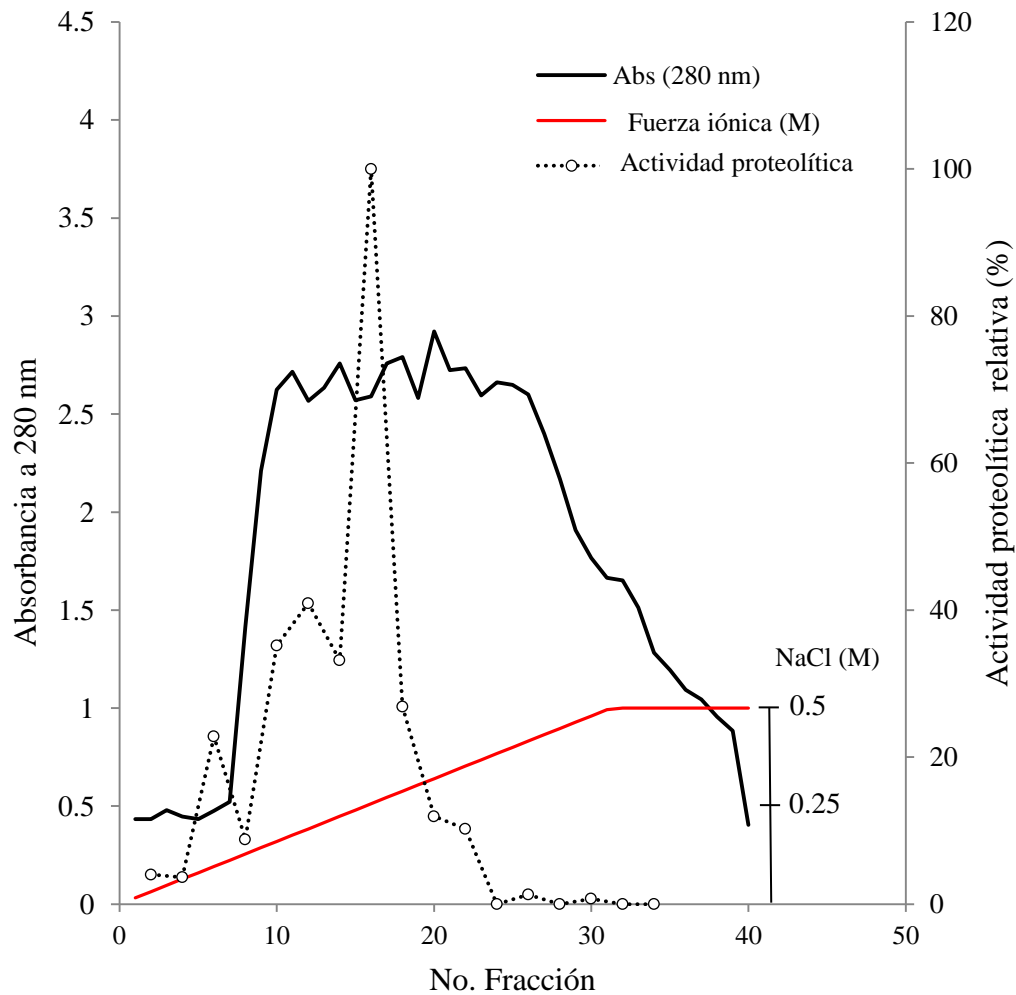


Figura 11. Cromatografía de intercambio aniónico utilizando DEAE-Sepharose.

La pre-purificación del ECFN se llevó a cabo inyectando aproximadamente 1000 mg de proteína (aprox. 500 mL de ECFN diluido) a una columna DEAE-Sepharose CL 6-B previamente equilibrada con Tris-HCl 20mM pH 7.0. Lavado con 200 mL de 0.05 M NaCl en Tris-HCl 20 mM pH 7.0. La elución de la proteína retenida en la columna se llevó mediante la aplicación de un gradiente de NaCl 0.05 a 0.5M en el mismo buffer a un flujo de 1 mL/min. La línea punteada representa la actividad proteolítica relativa respecto a la fracción más activa.

Dichas fracciones fueron denominadas como Qseph_{>0.02-0.1}, Qseph_{>0.1-0.2}, Qseph_{>0.2-0.3} y Qseph_{>0.3-0.5}. A esta última fracción (eluida con 0.4 y 0.5 M NaCl) se le dio el nombre de CitrusP como la proteasas parcialmente purificada *C. aurantium*, por poseer una mayor actividad específica utilizando el sustrato sintético BAPNA (N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilina), el cual es específico para la actividad de serin proteasas. Es importante mencionar que este sustrato también se ha utilizado para evaluar la actividad de proteasas tipo cisteína (Oliver Salvador *et al.*, 2011), por lo que no se descarta que la actividad observada se deba a la acción de ambos tipos de proteasas sobre dicho sustrato.

Los rendimientos y factores de concentración durante cada etapa del protocolo de purificación se muestran en la Tabla 2. El primer paso de purificación DEAE_{0.05-0.4M} logró incrementar en 1.8 veces la actividad proteolítica específica (APE), además de permitir visualizar un mayor número de bandas de proteínas por SDS-PAGE (Figura 12A) y bandas de actividad proteolítica mejor definidas durante el análisis de zimografía (Figura 12B, línea 3). El procedimiento de precipitación con sulfato de amonio (SA_{50%}) incrementó la actividad coagulante de leche específica de 0.038 a 0.15 UCL/mg el cual corresponde a un incremento de 11 veces respecto a la etapa anterior. En el último paso de purificación, utilizando Q-Sepharose, se observa que la fracción Qseph_{>0.3-0.5} logró incrementar a 8 U/mg la ACL con un factor de purificación de 500 veces (Tabla 2). Aunque la actividad proteolítica específica observada en esta fracción fue menor que las otras fracciones (Qseph_{>0.02-0.1}, Qseph_{>0.1-0.2}, y Qseph_{>0.2-0.3}) al utilizar hemoglobina como sustrato, los datos obtenidos mediante el uso de sustratos específicos (BAPNA) demuestran que la actividad específica es mayor en la fracción Qseph_{>0.3-0.5}, así como, lo demuestra la homogeneidad de la fracción observada por zimografía (Figura 12B, línea 5). El incremento en la actividad proteolítica específica fue de 7.8 veces con hemoglobina lo cual tiene un impacto positivo en la relación actividad coagulante/actividad proteolítica y por tanto en la especificidad para el proceso de coagulación de la leche.

Los estudios de inhibición con la muestra CitrusP parcialmente purificada (fracción $Q_{\text{seph}_{>0.3-0.5}}$), utilizando hemoglobina (pH 5.0) y caseína (pH 7.0) como sustratos, mostraron que CitrusP contiene proteasas del tipo serina y cisteína, esto

Tabla 2. Purificación parcial de una proteasas de *C. aurantium* (CitrusP).

Etapa	Proteína total (mg)	Actividad Total (Unidades)		Actividad Específica (Unidades/mg)		Rendimiento (%)		Factor de purificación		Relación ACL/AP ³
		ACL ¹	AP ²	ACL	AP	ACL	AP	ACL	AP	
ECFN*	9934	140	2781	0.014	0.28	100	100.00	-	-	0.053
DEAE _{0.05-0.4M}	1577 (65.5)	59	772 (370)	0.038	0.49 (5.6)	42.5	27.7 (100)	2.7	1.75	0.076
SA _{50%}	63.52	9.8	104	0.15	1.64	6.98	3.73	11	5.85	0.09
QSepharosa										
QSeph _{>0.02-0.1M}	1.42	-	7.72 (15.8)	-	3.86 (11.1)	-	0.27 (4.2)	-	13.7	-
QSeph _{>0.1-0.2M}	0.69	-	8.25 (16.5)	-	5.51 (23.9)	-	0.29 (4.4)	-	19.67	-
QSeph _{>0.2-0.3M}	0.64	-	7.17 (17.1)	-	4.79 (26.7)	-	0.25 (4.6)	-	17.1	-
QSeph _{>0.3-0.5M}	0.90	7.3	1.98 (64.2)	8.07	2.20 (71.3)	5.2	0.07 (17)	572	7.85	3.68

ACL: Actividad coagulante de la leche; AP: actividad proteolítica; ECFN: Extracto crudo de flor de naranjo; DEAE: Dietil aminoetil sefarosa; SA: Sulfato de amonio.

Valores en paréntesis corresponden a las actividades determinadas con el sustrato específico para serin proteasas N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilina a concentración 5 mM en Tris-HCl 0.1 M (pH 7.0, 0.1 M NaCl) a 37°C como estudio comparativo en una muestra independiente. Una unidad corresponde a la cantidad de proteína requerida para incrementar en 1 Unidad de absorbancia por minuto a 385 nm.

*La actividad proteolítica en los distintos pasos de purificación fue determinada utilizando hemoglobina como sustrato como se describió en materiales y métodos, con excepción de la muestra ECFN para la cual se utilizó azocaseína al 1% (acetato de sodio 0.1 M, pH 5) a 440 nm.

¹ Una unidad coagulante de la leche corresponde a la cantidad de extracto requerido para coagular 100 mL de leche en 40 min bajo condiciones de ensayo.

² Una unidad de actividad proteolítica 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.

³ La relación ACL/AP es el cociente de la ACL Total sobre la AP Total.

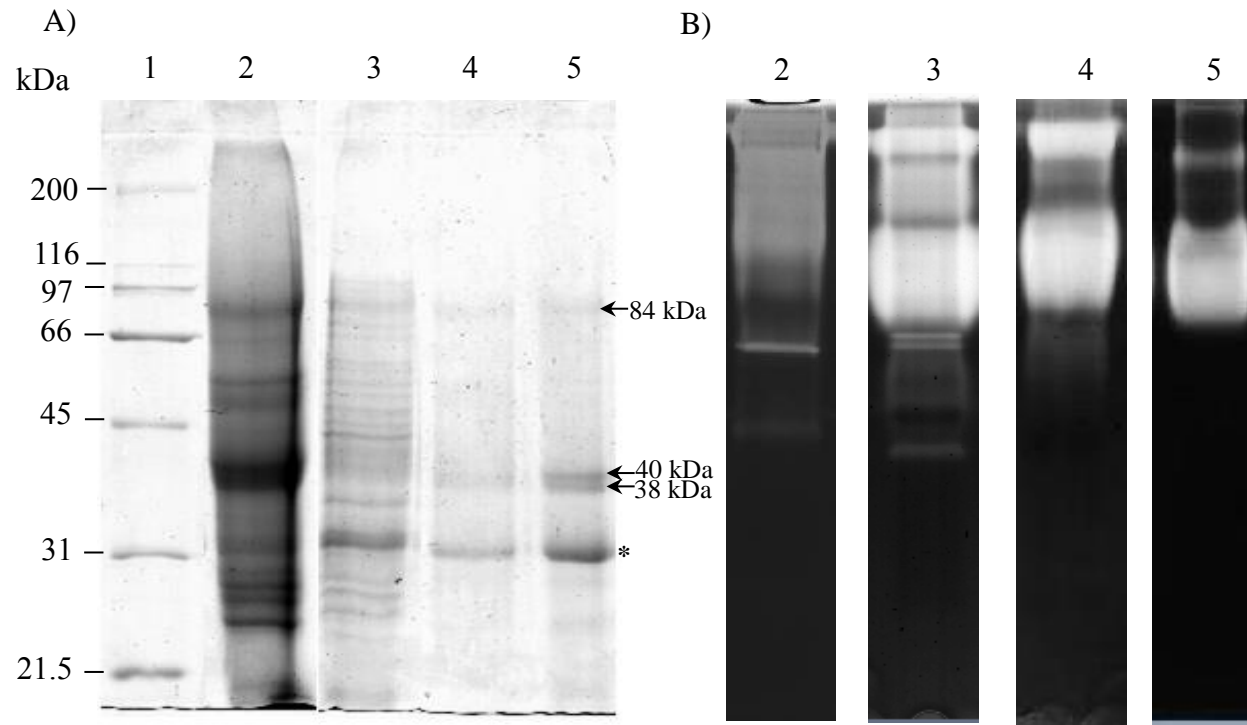


Figura 12. Monitoreo de la purificación por SDS-PAGE y zimografía.

Análisis por SDS-PAGE (A) y zimografía (B) durante el proceso de purificación parcial de CitrusP. Línea 1) marcadores de peso molecular; línea 2) ECFN; 3) Fracción DEAE_{>0.05-0.4M}, línea 4) Fracción SA_{50%}, línea 5) Fracción Q-seph_{>0.3-0.5M} (CitrusP). Se cargaron 30 y 60 µg de proteína para SDS-PAGE y zimograma respectivamente. La banda marcada con * indica la presencia de una proteína que aparentemente no se relaciona con la actividad.

debido a la sensibilidad observada a los compuesto PMSF, E-64 y leupeptina (Figura 13, Figura 14, Figura 15). Se ha reportado que PMSF es un inhibidor específico paraproteasas tipo serina, mientras que E-64 inhibe cisteínas (Kumar *et al.*, 2007; Nadaroglu y Demir, 2012; Prakash *et al.*, 2012). La inhibición parcial por el compuesto leupeptina se debe a que este compuesto posee la capacidad de inhibir la actividad de ambos tipos de proteasas. Lo anterior nos permite concluir que la actividad proteolítica presente en la muestra semi-purificada de flor de naranjo CitrusP, contiene proteasas del tipo serina y cisteína. Mediante el análisis de CitrusP por SDS-PAGE, se observan dos bandas de proteína con un peso molecular aproximado de 40 y 38 kDa (Figura 12A, línea 5), las cuales pudieran estar relacionadas con la banda de mayor intensidad de actividad proteolítica observada por zimografía (Figura 12B, línea 5), mientras que la banda zona de actividad de mayor peso molecular pudiera relacionarse con la proteína de aproximadamente 84 kDa. No obstante, se requieren de estudios más detallados para hacer una asignación concluyente.

La expresión a nivel genético de una proteasa tipo cisteína involucrada en la maduración y senescencia del fruto de naranjo (*C. sinensis*) ha sido reportada (Alonso y Granell, 1995; Fan *et al.*, 2009). La detección de este tipo de proteasas a nivel de proteína, como lo demuestra el presente estudio, soporta la hipótesis de que proteasas del tipo cisteína pudieran estar relacionadas con los procesos de senescencia que ocurren en las flores de cítricos.

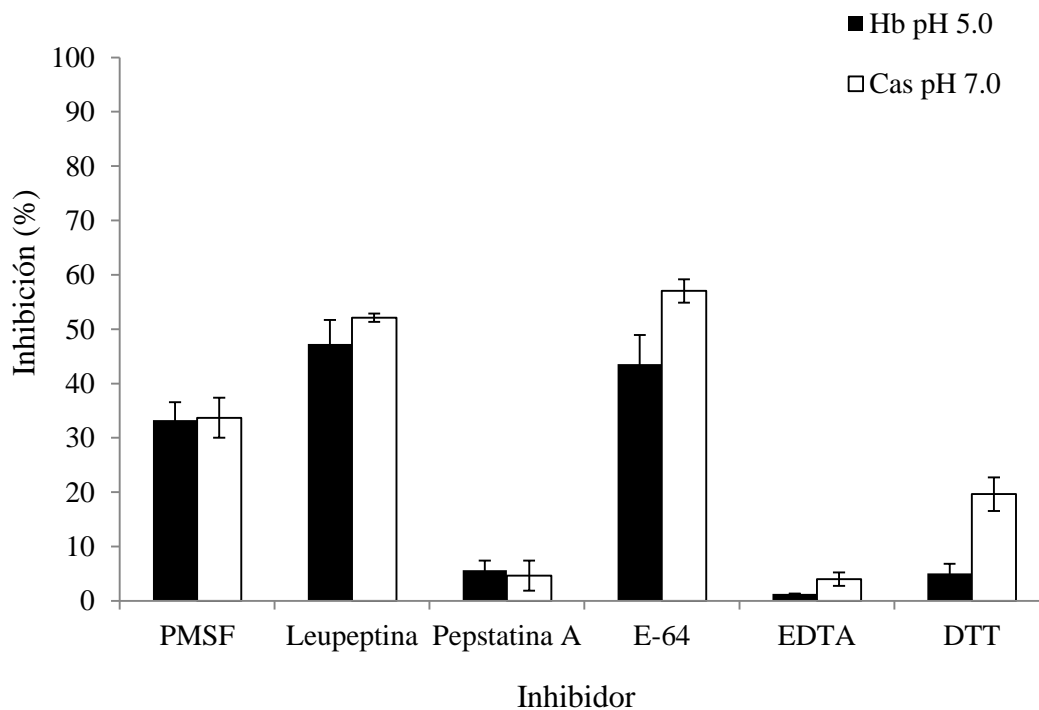


Figura 13. Efecto de inhibidores de proteasas sobre la actividad de CitrusP.

En cada ensayo 26 μg de enzima fue incubada con cada inhibidor. El ensayo se realizó por triplicado utilizando como sustrato hemoglobina (acetato Na 0.1 M, pH 5.0) y caseína (Tris-HCl 20 mM, pH 7.0). El porcentaje de inhibición fue calculado a partir de la actividad residual respecto al testigo (sin inhibidor).

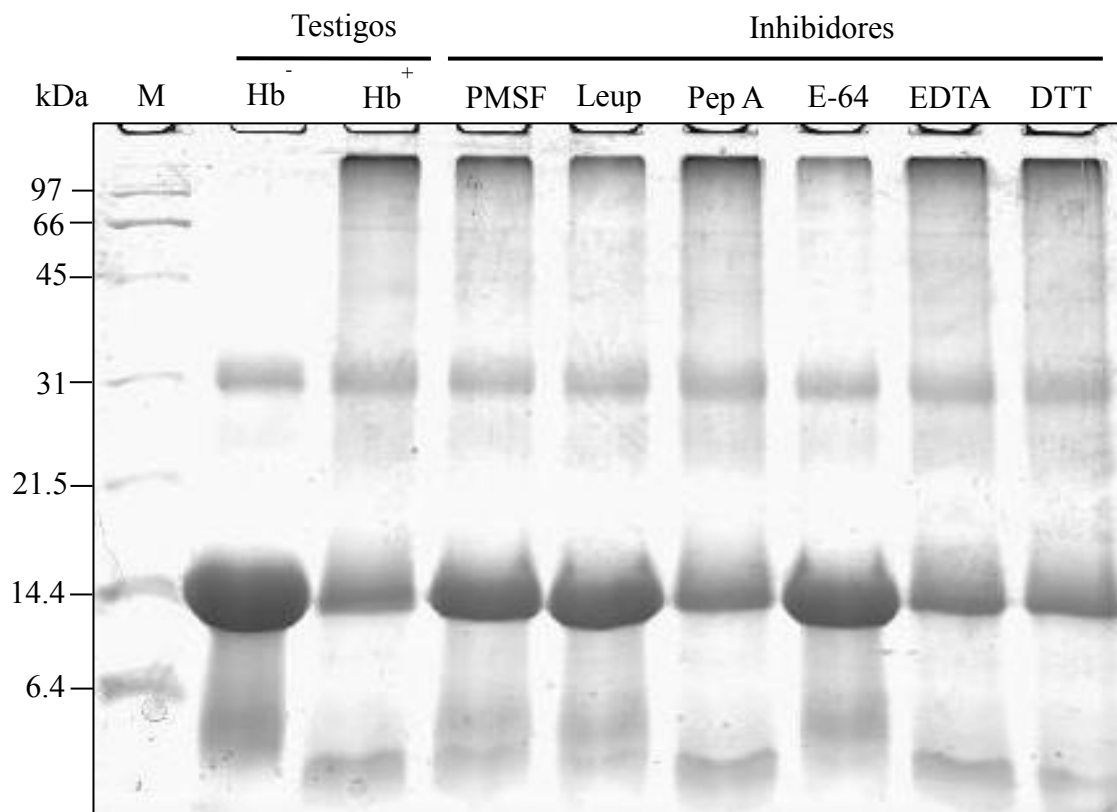


Figura 14. Degradación de hemoglobina por CitrusP parcialmente purificada y su inhibición.

Marcadores de peso molecular (M), testigos: Hb⁻ (sustrato+CitrusP sin incubar), Hb⁺ (sustrato+ CitrusP, incubados 50°C/60 min), inhibidores: PMSF (1mM), leupeptina (Leup, 0.1 mM), pepstatina A (Pep A, 0.01 mM), E-64 (1 mM), EDTA (5 mM), DTT (5 mM). Geles de poliacrilamida al 18% y teñidos con azul de Coomasie. Se inyectaron 50 µg de proteína por carril.

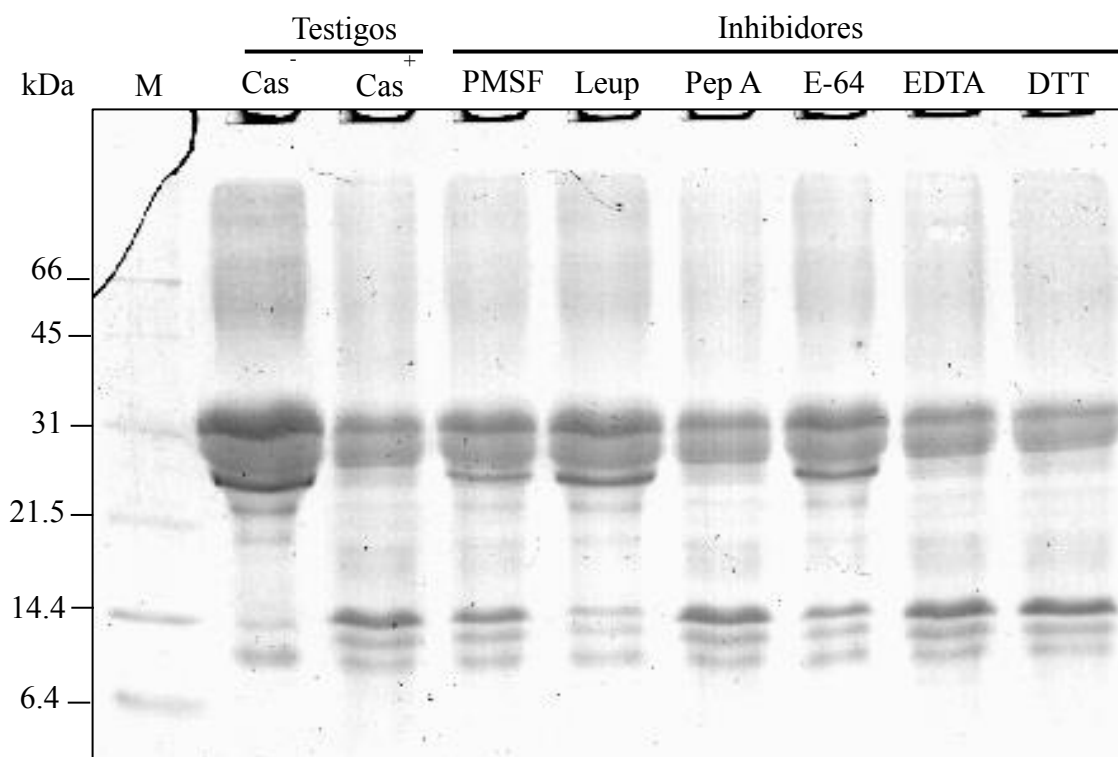


Figura 15. Hidrólisis de caseínas por CitrusP parcialmente purificada y su inhibición.

Marcadores de peso molecular (M), testigos: Cas⁻ (sustrato+CitrusP sin incubar), Cas⁺ (sustrato+ CitrusP, incubados 50°C/60 min), inhibidores: PMSF (1 mM), leupeptina (Leup, 0.1 mM), pepstatina A (Pep A, 0.01 mM), E-64 (1 mM), EDTA (5 mM), DTT (5 mM). Geles de poliacrilamida al 18% y teñidos con azul de Coomasie. Se inyectaron 60 µg de proteína por carril.

VII. CONCLUSIONES

La actividad proteolítica determinada en el ECFN fue influenciada por el pH, temperatura y tipo de sustrato utilizado para el ensayo de actividad, lo que indica que la flor de naranjo agrio es una fuente importante de diferentes tipos de proteasas.

La actividad de proteasas en un amplio rango de pH (2.5-12) y su inhibición parcial con pepstatina A, leupeptina y DTT sugirió la presencia de proteasas tipo aspárticas, serinas y cisteínas, por otro lado la inhibición con DTT sugiere la presencia de enlaces disulfuros que podrían estar relacionados con la estabilidad estructura de una de las proteasas presentes en el ECFN.

Las proteasas presentes en el ECFN mostraron la capacidad para coagular la leche en tiempos comparables a los obtenidos con cuajo comercial (quimosina), mostrando preferencia hacia k-caseína y en menor grado sobre otras fracciones caseicas. La actividad coagulante de la leche de los ECFN fue dependiente de la temperatura obteniendo una mayor actividad coagulante (0.33 U/mL), en el rango de temperaturas entre 60 y 70°C.

La acción de las proteasas del ECFN sobre distintas proteínas alimentarias (BSA, hemoglobina, proteínas lácteas y musculares) sugiere su potencial aplicación en modificación de proteínas alimentarias.

El protocolo de purificación parcial y los estudios de inhibición propuestos en el presente estudio, permitieron demostrar y confirmar que la actividad coagulante de la leche que presenta el ECFN está relacionada con la presencia de proteasas tipo serina y cisteína.

Este es el primer estudio que demuestra la presencia de proteasas de tipo serina y cisteína en flor de naranjo, por lo que se recomienda profundizar en estudios posteriores sobre la purificación y caracterización de estas y otras proteasas que permitan elucidar

las funciones putativas en esta fuente y en futuras aplicaciones biotecnológicas como son la producción de hidrolizados proteicos y la elaboración de quesos.

VIII. REFERENCIAS

- Adam Z. (2004). Chloroplast proteases and their role in photosynthesis regulation. Springer Netherlands. Aro E.-M. y Andersson B.(Eds.), vol. 11. pp. 265-276.
- Adamczyk B, Godlewski M, Smolander A y Kitunen V. (2009). Degradation of proteins by enzymes exuded by *Allium porrum* roots–A potentially important strategy for acquiring organic nitrogen by plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 47: 919-925.
- Adamczyk B, Smolander A, Kitunen V y Godlewski M. (2012). Proteoid roots and exudation of proteases by plant roots. In: *Secretions and Exudates in Biological Systems*. Springer Berlin Heidelberg. Vivanco J.M. y Baluška F.(Eds.), vol. 12. pp. 75-89.
- Akhlaghi M, Shabaniyan G, Rafieian-Kopaei M, Parvin N, Saadat M y Akhlaghi M. (2011). *Citrus aurantium* blossom and preoperative anxiety. *Brazilian Journal of Anesthesiology*. 61: 702-712.
- Alonso JM y Granell A. (1995). A putative vacuolar processing protease is regulated by ethylene and also during fruit ripening in citrus fruit. *Plant Physiology*. 109: 541-547.
- Andreeva NS y Rumsh LD. (2001). Analysis of crystal structures of aspartic proteinases: on the role of amino acid residues adjacent to the catalytic site of pepsin-like enzymes. *Protein Science*. 10: 2439-2450.
- Antao CM y Malcata FX. (2005). Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiology and Biochemistry*. 43: 637-650.
- 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.
- Ashie IN, Sorensen TL y Nielsen PM. (2002). Effects of papain and a microbial enzyme on meat proteins and beef tenderness. *Journal of Food Science*. 67: 2138-2142.

- Asif-Ullah M, Kim K-S y Yu YG. (2006). Purification and characterization of a serine protease from *Cucumis trigonus* Roxburghi. *Phytochemistry*. 67: 870-875.
- Barrett AJ, Rawlings ND y O'brien EA. (2001). The MEROPS Database as a Protease Information System. *Journal of Structural Biology*. 134: 95-102.
- Barrett AJ, Rawlings ND y Woessner JF, (1998). *Handbook of proteolytic enzymes*. Academic Press San Diego, CA:.
- Battelli R, Lombardi L, Rogers HJ, Picciarelli P, Lorenzi R y Ceccarelli N. (2011). Changes in ultrastructure, protease and caspase-like activities during flower senescence in *Lilium longiflorum*. *Plant Science*. 180: 716-725.
- Beers EP, Woffenden BJ y Zhao C. (2000). Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Molecular Biology*. 44: 399-415.
- Benchabane M, Schlüter U, Vorster J, Goulet M-C y Michaud D. (2010). Plant cystatins. *Biochimie*. 92: 1657-1666.
- Benucci I, Liburdi K, Garzillo AMV y Esti M. (2011). Bromelain from pineapple stem in alcoholic-acidic buffers for wine application. *Food Chemistry*. 124: 1349-1353.
- Brandelli A, Daroit D y Riffel A. (2010). Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85: 1735-1750.
- Bruno M, Trejo S, Caffini N y López L. (2008). Purification and characterization of hieronymain III. Comparison with other proteases previously isolated from *Bromelia hieronymi* Mez. *The Protein Journal*. 27: 426-433.
- Bruno MA, Lazza CM, Errasti ME, López LMI, Caffini NO y Pardo MF. (2010). Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. *LWT - Food Science and Technology*. 43: 695-701.
- Brutti CB, Pardo MF, Caffini NO y Natalucci CL. (2012). *Onopordum acanthium* L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. *LWT - Food Science and Technology*. 45: 172-179.
- Capocchi A, Muccilli V, Casani S, Foti S, Galleschi L y Fontanini D. (2011). Proteolytic enzymes in storage protein mobilization and cell death of the megagametophyte of *Araucaria bidwillii* Hook. post-germinated seeds. *Planta*. 233: 817-830.

- Castanheira P, Samyn B, Sergeant K, Clemente JC, Dunn BM, Pires E, Van Beeumen J y Faro C. (2005). Activation, proteolytic processing, and peptide specificity of recombinant cardosin A. *The Journal of biological chemistry*. 280: 13047-13054. Epub: 12005 Jan 13027.
- Clarke AK. (2005). Plant proteases – an appetite for destruction. *Physiologia Plantarum*. 123: 359-361.
- Claverie MF y Vega MC. (2007). Aspartic proteases used in cheese making. In: *Industrial enzymes*. Springer Netherlands. Polaina J. y MacCabe A.(Eds.). 10.1007/1-4020-5377-0_13. pp. 207-219.
- Cooper JB. (2002). Aspartic proteinases in disease: a structural perspective. *Current Drug Targets*. 3: 155-173.
- Chalamaiah M, Dinesh Kumar B, Hemalatha R y Jyothirmayi T. (2012). Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*. 135: 3020-3038.
- Chazarra S, Sidrach L, Lopez MD y Rodriguez JN. (2007). Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*. 17: 1393-1400.
- Chen J, Wang Y, Zhong Q, Wu Y y Xia W. (2012). Purification and characterization of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysate of grass carp protein. *Peptides*. 33: 52-58.
- Chi W, Sun X y Zhang L. (2012). The roles of chloroplast proteases in the biogenesis and maintenance of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1817: 239-246.
- Dash C, Kulkarni A, Dunn B y Rao M. (2003). Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 38: 89-119.
- Devaraj KB, Gowda LR y Prakash V. (2008). An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.). *Phytochemistry*. 69: 647-655.
- DíAz-López M, Moyano-López FJ, Alarcón-López FJ, García-Carreño FL y Navarrete Del Toro MA. (1998). Characterization of fish acid proteases by substrate–gel electrophoresis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 121: 369-377.

- Dunn BM. (2002). Structure and mechanism of the pepsin like family of aspartic peptidases. *ChemInform*. 34: 4431-4458.
- Dunn BM. (2010). Introduction to the Aspartic Proteinase Family. In: *Aspartic Acid Proteases as Therapeutic Targets*. pp. 1-21.
- Dunn BM y Hung S-H. (2000). The two sides of enzyme–substrate specificity: lessons from the aspartic proteinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1477: 231-240.
- Emmons DB. (1990). Milk-Clotting Enzymes. 2. Estimating Cheese Yield Losses from Proteolysis During Cheese Making. *Journal of Dairy Science*. 73: 2016-2021.
- Esteves CLC, Lucey JA, Wang T y Pires EMV. (2003). Effect of pH on the Gelation Properties of Skim Milk Gels Made From Plant Coagulants and Chymosin. *Journal of Dairy Science*. 86: 2558-2567.
- Fan J, Yang Y, Gao X, Deng W, Falara V, Kanellis A y Li Z-G. (2009). Expression of a senescence-associated cysteine protease gene related to peel pitting of navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 98: 281-289.
- Fao. (2012). Perspectivas agrícolas, OCDE-FAO, 2005-2014. <http://www.fao.org.htm>. Access: July, 23. México. 2012.
- Feijoo L y Villa T. (2011). Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food and Bioprocess Technology*. 4: 1066-1088.
- Fernández-Salguero J, Tejada L y Gómez R. (2002). Use of powdered vegetable coagulant in the manufacture of ewe's milk cheeses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82: 464-468.
- Fonseca KC, Morais NCG, Queiroz MR, Silva MC, Gomes MS, Costa JO, Mamede CCN, Torres FS, Penha-Silva N, Beletti ME, Canabrava HaN y Oliveira F. (2010). Purification and biochemical characterization of Eumiliin from *Euphorbia milii* var. *hislopii* latex. *Phytochemistry*. 71: 708-715.
- Fox PF. (1993). Cheese: An Overview. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Springer US. Fox P.F. 10.1007/978-1-4615-2650-6_1. pp. 1-36.
- Fugh A y Myers A. (2004). Citrus aurantium, an ingredient of dietary supplements marketed for weight loss: current status of clinical and basic research. *Experimental biology and medicine*. 229: 698-704.

- García J y Moreno J. (1986). Proteolysis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in *Citrus* leaf extracts. *Physiologia Plantarum*. 66: 377-383.
- García M, Sjödin A, Jansson S y Funk C. (2006). Protease gene families in *Populus* and *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*. 6: 1-24.
- Godlewski M y Adamczyk B. (2007). The ability of plants to secrete proteases by roots. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45: 657-664.
- Gomis RF. (2008). Structure and mechanism of metalloproteases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 43: 319-345.
- Gregersen PL, Holm PB y Krupinska K. (2008). Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biology*. 10: 37-49.
- Grzonka Z, Jankowska E, Kasprzykowski F, Kasprzykowska R, Lankiewicz L, Wiczek W, Wiczerzak E, Ciarkowski J, Drabik P y Janowski R. (2001). Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochimica Polonica*. 48: 1.
- Guevara MG, Daleo GR y Oliva CR. (2001). Purification and characterization of an aspartic protease from potato leaves. *Physiologia Plantarum*. 112: 321-326.
- Guiama V, Libouga D, Ngah E y Mbofung C. (2010). Milk-clotting activity of berries extracts from nine *Solanum* plants. *Afr. J. Biotechnol.* 9: 3911-3918.
- Ha M, Bekhit A, Carne A y Hopkins D. (2012). Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. *Food Chemistry*. 134: 95-105.
- Han J, Morton JD, Bekhit AED y Sedcole JR. (2009). Pre-rigor infusion with kiwifruit juice improves lamb tenderness. *Meat Science*. 82: 324-330.
- Harboe M, Broe ML y Qvist KB. (2010). The production, action and application of rennet and coagulants. In: *Technology of Cheesemaking*. Blackwell Publishing. Law B. y Tamine A.(Eds.). United Kingdom. pp. 98-129.
- Hashim MM, Mingsheng D, Iqbal MF y Xiaohong C. (2011). Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease. *Phytochemistry*. 72: 458-464.
- Hatano N y Hamada T. (2012). Proteomic analysis of secreted protein induced by a component of prey in pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Journal of Proteomics*. 75: 4844-4852.

- He S, Franco C y Zhang W. (2013). Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International*. 50: 289-297.
- Hedstrom L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chemical reviews*. 102: 4501-4524.
- Hope M, Strydom PE, Frylinck L y Webb EC. (2010). The efficiency of electrical stimulation to counteract the negative effects of β -agonists on meat tenderness of feedlot cattle. *Meat Science*. 86: 699-705.
- Horne DS y Banks JM. (2004). Rennet-induced Coagulation of Milk. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Academic Press. Patrick F. Fox P.L.H.M.T.M.C. y Timothy P.G.(Eds.), vol. I. pp. 47-70.
- Huang XW, Chen LJ, Luo YB, Guo HY y Ren FZ. (2011). Purification, characterization, and milk coagulating properties of ginger proteases. *Journal of Dairy Science*. 94: 2259-2269.
- Jacob M, Jaros D y Rohm H. (2011). Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*. 64: 14-33.
- Jones BL. (2005). Endoproteases of barley and malt. *Journal of Cereal Science*. 42: 139-156.
- Kappeler SR, Van Den Brink HM, Rahbek-Nielsen H, Farah Z, Puhan Z, Hansen EB y Johansen E. (2006). Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 342: 647-654.
- Karmous I, Khadija J, Chaoui A y El Ferjani E. (2012). Proteolytic activities in *Phaseolus vulgaris* cotyledons under copper stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 10.1007/s12298-012-0128-4: 1-7.
- Kervinen J, Sarkkinen P, Kalkkinen N, Mikola L y Saarma M. (1993). Hydrolytic specificity of the barley grain aspartic proteinase. *Phytochemistry*. 32: 799-803.
- Kervinen J, Törmäkangas K, Runeberg-Roos P, Guruprasad K, Blundell T y Teeri T. (1995). Structure and Possible Function of Aspartic Proteinases in Barley and other Plants. In: *Aspartic Proteinases*. Springer US. Takahashi K., vol. 362. pp. 241-254.

- Kim M, Hamilton SE, Guddat LW y Overall CM. (2007). Plant collagenase: Unique collagenolytic activity of cysteine proteases from ginger. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1770: 1627-1635.
- Kirk O, Borchert TV y Fuglsang CC. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 345-351.
- Kong X, Zhou H y Qian H. (2007). Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*. 102: 759-763.
- Konno K. (2011). Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry*. 72: 1510-1530.
- Kulkarni A y Rao M. (2007). Biochemical characterization of an aspartic protease from *Vigna radiata*: Kinetic interactions with the classical inhibitor pepstatin implicating a tight binding mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*. 1774: 619-627.
- Kulkarni A y Rao M. (2009). Differential elicitation of an aspartic protease inhibitor: Regulation of endogenous protease and initial events in germination in seeds of *Vigna radiata*. *Peptides*. 30: 2118-2126.
- Kumar A, Singh VK y Jagannadham MV. (2007). Carnein, a serine protease from noxious plant weed *Ipomoea carnea* (morning glory). *Journal of agricultural and food chemistry*. 55: 5809-5818.
- Kumar D y Jagannadham MV. (2003). Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. *Phytochemistry*. 62: 1057-1071.
- Kumar G, Kawale AA y Kumar A. (2012). Purification and physicochemical characterization of a serine protease with fibrinolytic activity from latex of a medicinal herb *Euphorbia hirta*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 52: 104-111.
- Kumari M, Sharma A y Jagannadham MV. (2012). Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. *Food Chemistry*. 131: 1295-1303.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lerslerwong L, Ketsa S y Van Doorn WG. (2009). Protein degradation and peptidase activity during petal senescence in *Dendrobium* cv. Khao Sanan. *Postharvest Biology and Technology*. 52: 84-90.

- Liggieri C, Obregón W, Trejo S y Priolo N. (2009). Biochemical analysis of a papain-like protease isolated from the latex of *Asclepias curassavica* L. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 41: 154-162.
- Liu C, Xiong YL y Rentfrow GK. (2011). Kiwifruit protease extract injection reduces toughness of pork loin muscle induced by freeze-thaw abuse. *LWT - Food Science and Technology*. 44: 2026-2031.
- Lo Piero A, Puglisi I y Petrone G. (2011). Characterization of the purified actinidin as a plant coagulant of bovine milk. *European Food Research and Technology*. 233: 517-524.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
- Luo H-Y, Wang B, Li Z-R, Chi C-F, Zhang Q-H y He G-Y. (2013). Preparation and evaluation of antioxidant peptide from papain hydrolysate of *Sphyrna lewini* muscle protein. *LWT - Food Science and Technology*. 51: 281-288.
- Llorente BE, Brutti CB y Caffini NO. (2004). Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*. 52: 8182-8189.
- Mabberley D. (1997). A classification for edible *Citrus* (Rutaceae). *Telopea*. 7: 167-172.
- Mabberley DJ. (2004). *Citrus* (Rutaceae): A review of recent advances in etymology, systematics and medical applications. *Blumea - Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*. 49: 481-498.
- Macnish AJ, Jiang C-Z, Negre-Zakharov F y Reid MS. (2010). Physiological and molecular changes during opening and senescence of *Nicotiana mutabilis* flowers. *Plant Science*. 179: 267-272.
- Mahajan RT y Badgujar SB. (2010). Biological aspects of proteolytic enzymes: a review. *Journal of Pharmacy Research*. 3: 2048-2068.
- Mäkinen S, Johannson T, Vegarud Gerd E, Pihlava JM y Pihlanto A. (2012). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antioxidant properties of rapeseed hydrolysates. *Journal of Functional Foods*. 4: 575-583.
- Mamma D y Christakopoulos P. (2013). Biotransformation of Citrus By-Products into Value Added Products. *Waste Biomass Valor*. 10.1007/s12649-013-9250-y: 1-21.

- Martínez DE, Costa ML y Guiamet JJ. (2008). Senescence-associated degradation of chloroplast proteins inside and outside the organelle. *Plant Biology*. 10: 15-22.
- Martínez M, Cambra I, González-Melendi P, Santamaría ME y Díaz I. (2012). C1A cysteine-proteases and their inhibitors in plants. *Physiologia Plantarum*. 145: 85-94.
- Mazorra-Manzano MA, Perea-Gutiérrez TC, Lugo-Sánchez ME, Ramirez-Suarez JC, Torres-Llanez MJ, González-Córdova AF y Vallejo-Cordoba B. (2013). Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. *Food Chemistry*. 141: 1902-1907.
- Mazorra-Manzano MA y Yada RY. (2008). Expression and characterization of the recombinant aspartic proteinase A1 from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*. 69: 2439-2448.
- Mcauliffe J. (2012). Industrial Enzymes and Biocatalysis. In: *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*. Springer US. Kent J.A. 10.1007/978-1-4614-4259-2_31. pp. 1183-1227.
- Memarpoor-Yazdi M, Asoodeh A y Chamani J. (2012). A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *Journal of Functional Foods*. 4: 278-286.
- Mithofer A. (2011). Carnivorous pitcher plants: Insights in an old topic. *Phytochemistry*. 72: 1678-1682.
- Mohamed, Morishima I, Babiker EE y Mori N. (2009). Dubiumin, a chymotrypsin-like serine protease from the seeds of *Solanum dubium* Fresen. *Phytochemistry*. 70: 483-491.
- Mohamed IA, Babiker EE 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: 759-764.
- Moraes TM, Kushima H, Moleiro FC, Santos RC, Machado Rocha LR, Marques MO, Vilegas W y Hiruma-Lima CA. (2009). Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: Role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chemico-Biological Interactions*. 180: 499-505.
- Muccilli V, Licciardello C, Fontanini D, Russo MP, Cunsolo V, Saletti R, Reforgiato Recupero G y Foti S. (2009). Proteome analysis of *Citrus sinensis* L. (Osbeck) flesh at ripening time. *Journal of Proteomics*. 73: 134-152.

- Murayama K, Kato-Murayama M, Hosaka T, Sotokawauchi A, Yokoyama S, Arima K y Shirouzu M. (2012). Crystal structure of cucumisin, a subtilisin-like endoprotease from *Cucumis melo* L. *Journal of Molecular Biology*. 423: 386-396.
- Nadaroglu H y Demir N. (2012). Purification and characterization of a novel serine protease compositain from compositae (*Scorzonera hispanica* L.). *European Food Research and Technology*. 234: 945-953.
- Neklyudov AD, Ivankin AN y Berdutina AV. (2000). Properties and uses of protein hydrolysates (Review). *Appl Biochem Microbiol*. 36: 452-459.
- Oliver Salvador MDC, Lian Z, Laursen RA, Bolaños García VM y Soriano García M. (2011). Biochemical characterisation of MX-4, a plant cysteine protease of broad specificity and high stability. *Food Chemistry*. 126: 543-552.
- Otegui MS, Herder R, Schulze J, Jung R y Staehelin LA. (2006). The proteolytic processing of seed storage proteins in *Arabidopsis* embryo cells starts in the multivesicular bodies. *The Plant Cell Online*. 18: 2567-2581.
- Otto HH y Schirmeister T. (1997). Cysteine proteases and their inhibitors. *Chem. Rev*. 97: 133-171.
- Pacheco-Aguilar R, Mazorra-Manzano MA y Ramírez-Suarez JC. (2008). Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. *Food Chemistry*. 109: 782-789.
- Park H, Yamanaka N, Mikkonen A, Kusakabe I y Kobayashi H. (2000). Purification and characterization of aspartic proteinase from sunflower seeds. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 64: 931-939.
- Parrott D, Yang L, Shama L y Fischer A. (2005). Senescence is accelerated, and several proteases are induced by carbon “feast” conditions in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Planta*. 222: 989-1000.
- Peñarrubia L, Moreno J y García-Martínez JL. (1988). Proteolysis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in leaves of *Citrus* explants throughout the annual cycle and its regulation by ethylene. *Physiologia Plantarum*. 73: 1-6.
- Pino A, Prados F, Galán E, Mcsweeney PLH y Fernández-Salguero J. (2009). Proteolysis during the ripening of goats’ milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food Research International*. 42: 324-330.

- Pontual EV, Carvalho BEA, Bezerra RS, Coelho LCBB, Napoleão TH y Paiva PMG. (2012). Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. Food Chemistry. 135: 1848-1854.
- Powers JC, Asgian JL, Ekici OD y James KE. (2002). Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. Chemical reviews. 102: 4639-4750.
- Prakash R, Kumar A y Jagannadham MV. (2012). Neriifolin S, a dimeric serine protease from *Euphorbia neriifolia* Linn.: Purification and biochemical characterisation. Food Chemistry. 132: 1296-1304.
- Priolo N, Del Valle SM, Arribére MC, López L y Caffini N. (2000). Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits. Journal of Protein Chemistry. 19: 39-49.
- Raghavan S, Kristinsson HG y Leeuwenburgh C. (2008). Radical scavenging and reducing ability of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates. Journal of agricultural and food chemistry. 56: 10359-10367.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS y Deshpande VV. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62: 597-635.
- Raposo S y Domingos A. (2008). Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures. Process Biochemistry. 43: 139-144.
- Rawdkuen S, Jaimakreu M y Benjakul S. (2013). Physicochemical properties and tenderness of meat samples using proteolytic extract from *Calotropis procera* latex. Food Chemistry. 136: 909-916.
- Reid JR, Coolbear T, Ayers JS y Coolbear KP. (1997). The action of chymosin on κ -casein and its macropeptide: Effect of pH and analysis of products of secondary hydrolysis. International Dairy Journal. 7: 559-569.
- Roberts IN, Caputo C, Criado MV y Funk C. (2012). Senescence-associated proteases in plants. Physiologia Plantarum. 145: 130-139.
- Rotari VI, He R y Gallois P. (2005). Death by proteases in plants: whodunit. Physiologia Plantarum. 123: 376-385.

- Sagarpa. (2013). Plan Rector de Cítricos. http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Publicaciones/SistemaProducto/Lists/Ctricos/Attachments/11/pr_slp.pdf. Access: Jul, 20. México. 2013.
- Sagee O y Lovatt CJ. (1991). Putrescine content parallels ammonia and arginine metabolism in developing flowers of the washington navel orange. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 116: 280-285.
- Sakanaka S, Tachibana Y, Ishihara N y Raj Juneja L. (2004). Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. *Food Chemistry*. 86: 99-103.
- Salvador SM, Novo C y Domingos A. (2006). Evaluation of the presence of aspartic proteases from *Centaurea calcitrapa* during seed germination. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 893-898.
- Schaller A. (2004). A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta*. 220: 183-197.
- Shackelford S, Wheeler T, Meade M, Reagan J, Byrnes B y Koohmaraie M. (2001). Consumer impressions of tender select beef. *Journal of animal science*. 79: 2605-2614.
- Shamloo M, Bakar J, Mat Hashim D y Khatib A. (2012). Biochemical properties of red tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates. *International Food Research Journal*. 19: 183-188.
- Sharma A, Kumari M y Jagannadham MV. (2012). Religiosin C, a cucumisin-like serine protease from *Ficus religiosa*. *Process Biochemistry*. 47: 914-921.
- Shivaprasad HV, Rajesh R, Yariswamy M y Vishwanath BS. (2011). Procoagulant properties of plant latex proteases. In: *Toxins and Hemostasis*. Springer Netherlands. Kini R.M., Clemetson K.J., Markland F.S., McLane M.A. y Morita T.(Eds.). 10.1007/978-90-481-9295-3_33. pp. 591-603.
- Siap. (2010). Reporte especial naranja. www.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/100602-reporte-naranja.pdf. Access: Jul, 25. México. 2010. Infogramas
- Sidrach L, García-Cánovas F, Tudela J y Neptuno Rodríguez-López J. (2005). Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus* L.): enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*. 66: 41-49.

- Silva SV y Malcata FX. (2005). Partial identification of water-soluble peptides released at early stages of proteolysis in sterilized ovine cheese-like systems: Influence of type of coagulant and starter. *Journal of Dairy Science*. 88: 1947-1954.
- Silva SV y Malcata FX. (2005b). Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry*. 89: 19-26.
- Simoes I y Faro C. (2004). Structure and function of plant aspartic proteinases. *European Journal of Biochemistry*. 271: 2067-2075.
- Singh AN, Shukla AK, Jagannadham MV y Dubey VK. (2010). Purification of a novel cysteine protease, procerain B, from *Calotropis procera* with distinct characteristics compared to procerain. *Process Biochemistry*. 45: 399-406.
- Singh KA, Kumar R, Rao GRK y Jagannadham MV. (2010). Crinumin, a chymotrypsin-like but glycosylated serine protease from *Crinum asiaticum*: purification and physicochemical characterisation. *Food Chemistry*. 119: 1352-1358.
- Siti Z y Rosma A. (2011). *Artocarpus integer* leaf protease: purification and characterisation. *Food Chemistry*. 129: 1523-1529.
- Sjogren LE y Clarke A. (2011). Studying proteases and protein turnover in *Arabidopsis* chloroplasts. In: *Chloroplast Research in Arabidopsis*. Humana Press. Jarvis R.P., vol. 774. pp. 225-240.
- Stauffer CE. (1990). Measuring trypsin inhibitor in soy meal: Suggested improvements in the standard method. *Cereal chem*. 67: 296-302.
- Sullivan GA y Calkins CR. (2010). Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat Science*. 85: 730-734.
- Takeda N, Kistner C, Kosuta S, Winzer T, Pitzschke A, Groth M, Sato S, Kaneko T, Tabata S y Parniske M. (2007). Proteases in plant root symbiosis. *Phytochemistry*. 68: 111-121.
- Tan-Wilson AL y Wilson KA. (2012). Mobilization of seed protein reserves. *Physiologia Plantarum*. 145: 140-153.
- Teixeira PF y Glaser E. (2013). Processing peptidases in mitochondria and chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1833: 360-370.

- Thoenen M, Herrmann B y Feller U. (2007). Senescence in wheat leaves: is a cysteine endopeptidase involved in the degradation of the large subunit of Rubisco? *Acta Physiologiae Plantarum*. 29: 339-350.
- Thomás G-E, Rodolfo H-G, Juan M-D, Georgina S-F, Luis C-G, Ingrid R-B y Santiago G-T. (2009). Proteolytic activity in enzymatic extracts from *Carica papaya* L. cv. Maradol harvest by-products. *Process Biochemistry*. 44: 77-82.
- Torres M, Trejo S, Obregón W, Avilés F, López L y Natalucci C. (2012). Characterization of the proteolytic system present in *Vasconcellea quercifolia* latex. *Planta*. 10.1007/s00425-012-1701-3: 1-14.
- Trejo SA, López LMI, Cimino CV, Caffini NO y Natalucci CL. (2001). Purification and characterization of a new plant endopeptidase isolated from latex of *Asclepias fruticosa* L. (Asclepiadaceae). *Journal of Protein Chemistry*. 20: 469-477.
- Tripathi P, Tomar R y Jagannadham MV. (2011). Purification and biochemical characterisation of a novel protease streblin. *Food Chemistry*. 125: 1005-1012.
- Uchikoba T y Kaneda M. (1996). Milk-clotting activity of cucumisin, a plant serine protease from melon fruit. *Appl Biochem Biotechnol*. 56: 325-330.
- Van Der Hoorn RaL y Jones JDG. (2004). The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Current Opinion in Plant Biology*. 7: 400-407.
- Verissimo P, Esteves C, Faro C y Pires E. (1995). The vegetable rennet of *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. *Biotechnol Lett*. 17: 621-626.
- Veríssimo P, Faro C, Moir AJG, Lin Y, Tang J y Pires E. (1996). Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L. *European Journal of Biochemistry*. 235: 762-768.
- Veríssimo P, Ramalho-Santos M, Faro C y Pires E. (1998). A comparative study on the aspartic proteinases from different species of *Cynara*. In: *Aspartic Proteinases*. Springer US. James M.G., vol. 436. pp. 459-463.
- Wagstaff C, Leverentz MK, Griffiths G, Thomas B, Chanasut U, Stead AD y Rogers HJ. (2002). Cysteine protease gene expression and proteolytic activity during senescence of *Alstroemeria* petals. *Journal of experimental botany*. 53: 233-240.

- Wang J-S, Zhao M-M, Zhao Q-Z y Jiang Y-M. (2007). Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. *Food Chemistry*. 101: 1658-1663.
- Wang L, Wang M, Li Q, Cai T y Jiang W. (2008). Partial properties of an aspartic protease in bitter melon (*Momordica charantia* L.) fruit and its activation by heating. *Food Chemistry*. 108: 496-502.
- Watanabe Y, Matsushima S, Yamaguchi A y Shioi Y. (2009). Characterization and cloning of cysteine protease that is induced in green leaves of barley. *Plant Science*. 176: 264-271.
- Yadav S y Jagannadham M. (2009). Complete conformational stability of kinetically stable dimeric serine protease milin against pH, temperature, urea, and proteolysis. *European Biophysics Journal*. 38: 981-991.
- Yamagata H, Masuzawa T, Nagaoka Y, Ohnishi T y Iwasaki T. (1994). Cucumisin, a serine protease from melon fruits, shares structural homology with subtilisin and is generated from a large precursor. *Journal of Biological Chemistry*. 269: 32725-32731.