



Universidad Nacional del Nordeste



Facultad de Ciencias Agrarias

Doctorado En Recursos Naturales

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad Nacional del Nordeste

- ▶ **Tema:** Aislados de proteasas cisteínicas en distintas condiciones de crecimiento de *Ananas comosus* y *Bromelia serra* en Corrientes y su potencial uso agronómico

- ▶ **Doctorando:** Ing. Agr. Melanie Desirée Gómez Herrera
- ▶ **Director:** Dra. Paula Alayón Luaces
- ▶ **Codirector:** Dra. María Victoria Avanza

2024



Dedicatoria

A mi Abu, por enseñarme a no bajar los brazos,
A mi Papá, que me contagió su pasión por la investigación y la ciencia.

Agradecimientos

A mis directoras Paula Alayón Luaces y María Victoria (Pinty) Avanza por dirigir esta tesis, por compartir sus conocimientos y por el permanente apoyo recibido durante estos años.

Al CONICET por haberme otorgado la beca que hizo posible la realización de este trabajo y mi formación doctoral.

A la comunidad de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE por la sólida formación académica recibida durante mi carrera de grado y durante la realización de esta tesis de posgrado.

A todo el equipo del Campo Didáctico Experimental de la FCA-UNNE por ayudarme en los ensayos en invernadero. A la Catedra de Fruti, Pau, Emilio, Maira y Ayudantes que me brindaron su asistencia y ayuda con las plantas de ananá.

A los integrantes del instituto IQUIBA (UNNE-CONICET), cuyo cada pequeño aporte de conocimiento me permitió realizar este trabajo.

Al equipo de investigación de todos los días y compañeros de trabajo Eli, Cin, Andre, Feli, Vic, Ro, Fer, Bety, Pinty, Guada, Belén, Marga, Adri, Victoria, Gonzalo, Karina, Enzo y Sonia que me brindaron su apoyo y me incorporaron con calidez al grupo del Laboratorio de Tecnología Química.

Al grupo del LabinPro, Caro, Anto, Gabi, Andrea, Luciano y Laura Leiva por guiarme en los primeros pasos del complejo mundo de las enzimas. Gracias infinitas por su apoyo.

Al CIPROVE-UNLP, especialmente a Mariela, que me abrió las puertas del laboratorio, donde durante décadas estudiaron este tipo de enzimas, permitiéndome realizar múltiples pasantías y brindándome un amplio conocimiento de proteasas en especies de Bromeliáceas. Tambien agradecer a la Coty por su ayuda durante la pasantía y a Lu, que al estudiar ambas la misma especie me brindó su apoyo y conocimientos que me permitieron seguir caminando en el submundo enzimático de *Bromelia serra*.

A la Dra. Marina Cardozo, perteneciente al Laboratorio de Fisiología Vegetal e Interacción Planta-Microorganismo (IBONE UNNE-CONICET) por aceptar y guiarme durante la pasantía en los temas correspondientes a microorganismos.

Un especial agradecimiento a Ceci Prieto por todos sus consejos y apoyo mientras realizaba cada una de las tareas de micro.

A mis amigas incondicionales de la facu, Lore y Aldana, que a pesar que cada una siguieron sus propios caminos después de recibirnos de la facu, estuvieron siempre apoyando desde lejos.

A mi familia, por los que están y ya no están, siempre dándome la fortaleza y el apoyo para seguir adelante.

A Gabi, mi compañero de vida. Gracias por siempre confiar que podía lograrlo.

Índice

Abreviaturas	14
Publicaciones.....	15
Presentaciones en Congresos y Reuniones Científicas	15
Resumen	16
Abstract	19
Capítulo I	22
Introducción y objetivos.....	22
Introducción general	23
1. Enzimas.....	23
1.1 Clasificación de las enzimas	24
1.2 Enzima proteolíticas	25
1.3 El sistema MEROPS de clasificación de peptidasas.....	27
1.4 Mecanismos catalíticos de las endopeptidasas	29
1.5 Funciones de las proteasas dentro de los vegetales.....	30
1.6 Usos actuales de las proteasas.....	31
1.7 Proteasas obtenidas de Bromeliaceae.....	33
Objetivos	35
General.....	35
Específicos	35
Hipótesis.....	36
Capítulo II	37
Caracterización de proteasas en hojas de <i>Bromelia serra</i> Griseb.....	37
Introducción	38
1. Enzimas Proteolíticas de Bromeliaceae	38
Materiales y métodos	40
1. Material vegetal.....	40
2. Preservación de la actividad enzimática de hojas de BS, AEB y ECB	41
3. Caracterización del extracto crudo	41
4. Caracterización del Aislado Enzimático (AEB)	47
5. Determinación de las condiciones óptimas para medir la actividad proteolítica de los extractos de <i>Bromelia serra</i>	51
6. Separación cromatográficas por exclusión molecular (CEM).....	54

7. Separación cromatográficas rápida de proteínas en medio líquido (FPLC) por intercambio aniónico	54
8. Análisis estadístico	55
Resultados	55
1. Concentración proteica y actividad proteolítica.....	55
2. Estabilidad de la actividad enzimática durante la preservación de hojas de BS, AEB y ECB.	56
3. Caracterización del ECB y AEB.....	57
4. Determinación de las condiciones óptimas para medir la actividad proteolítica de los extractos de Bromelia serra	62
6. Cromatografía de exclusión molecular	70
7. Cromatografía de intercambio aniónico	71
Discusión	72
1. Actividad proteolítica según sustrato utilizado.....	72
2. Electroforesis SDS-PAGE y Zimografía.....	73
3. Isoelectroenfoque	73
4. Identificación del tipo de sitio catalítico: actividad proteolítica en presencia de inhibidores de grupo.	74
5. Determinación de K_M del AEB	74
6. Determinación de las condiciones óptimas para medir la actividad proteolítica de los extractos de Bromelia serra	75
6.1 Efecto de la cisteína sobre el AEB	75
6.2 Perfil de pH de la actividad proteolítica del AEB.....	76
6.3 Efecto de la temperatura sobre el aislado enzimático.....	76
6.3.1. Estabilidad térmica de los aislados enzimáticos	77
6.4 Efecto de NaCl en la actividad enzimática	77
7. Actividad enzimática sobre sustratos sintéticos	78
8. Cromatografía de exclusión molecular	78
9. Cromatografía de intercambio aniónico	79
Conclusiones parciales	79
Capítulo III	81
Efecto del estrés hídrico sobre los órganos de <i>Ananas comosus</i> L. Merr y su relación con los contenidos de proteasas cisteínicas.....	81
Introducción	82
Materiales y métodos	84

1. Material vegetal y tratamientos de estrés hídrico	84
2. Registro climático-temperatura promedio, máxima y mínima.....	85
3. Determinación de contenido relativo de agua (CRA) de las hojas.....	85
4. Índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI)	85
5. Obtención del extracto crudo de tallo (ECAt) y hoja (ECAh).....	86
6. Obtención del aislado enzimático de tallo (AEAt) y hoja (AEAh)	86
7. Caracterización de los extractos crudos (ECAt y ECAh).....	86
8. Caracterización de los aislados enzimáticos de tallo (AEAt) y hoja (AEAh)	88
9. Análisis estadístico	89
Resultados	89
1. Registro de las temperaturas promedio, máximas y mínimas.....	89
2. El Índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI)	90
3. Contenido relativo de agua (CRA)	91
5. Efecto del estrés hídrico de los aislados enzimáticos de hoja y tallo.....	105
Discusión	116
1. Indicadores CRA y NDVI.....	117
2. Caracterización del extracto crudo de tallo y hoja ante diferentes condiciones de estrés hídrico.....	118
3. Caracterización del Aislado enzimático.....	123
Conclusiones parciales	124
Capítulo IV	126
Evaluación del uso de las proteasas cisteínicas de <i>Ananas comosus</i> L. Merr y <i>Bromelia serra</i> Griseb. como producto orgánico para el control de microorganismos fitopatógenos	126
Introducción	127
Materiales y métodos	131
1. Material vegetal y microorganismos fitopatógenos	131
2.1 Activación de bacterias	132
2.2. Actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en disco en placa.	132
2.3. Determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM) de crecimiento bacteriano por técnica de microdilución en microplacas con resazurina utilizando la técnica de Prieto et al. (2020).	132
3. Actividad antifúngica con el método MTT	134
Resultados	134
1. Activación de bacterias fitopatógenas	135

2. Actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en disco en placa	135
3. Determinación de la concentración inicial de células	137
4. Actividad antifúngica con el método MTT	141
Discusión	143
1. Actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en disco en placa	143
2. Utilización de técnicas colorimétricas: resazurina y MTT	144
Conclusiones parciales	145
Capítulo V	147
Hidrolizados de caseína y coagulación de leche bovina	147
Introducción	148
Materiales y Métodos	150
1. Hidrólisis de la caseína bovina	151
2. Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) de los hidrolizados	153
3. Actividad antioxidante de los hidrolizados	153
4. Actividad coagulante de proteínas de la leche bovina.....	154
5. Análisis estadístico	155
Resultados	155
1. Perfil de hidrolizados de caseína.....	155
2. Grado de hidrólisis y actividad antioxidante	157
3. Actividad coagulante de la caseína bovina	159
Discusión	161
1. Perfil de los hidrolizados de caseína y grado de hidrólisis	162
2. Actividad antioxidante de los hidrolizados	162
3. Actividad coagulante de leche bovina.....	163
Conclusiones parciales	164
Capítulo VI	166
Conclusiones	167
Perspectivas	170
Bibliografía	171

Figuras

Figura 1. Clasificación de las peptidasas según la reacción catalizada. Cada círculo representa un aminoácido y la línea negra que los une representa la unión peptídica. Las flechas negras indican el primer corte y las blancas los subsecuentes. En el primer corte, el aminoácido hacia el cual se dirige la escisión está coloreado de negro y, para los siguientes clivajes, los aminoácidos se muestran en gris. Imagen obtenida de Rawlings et al. (2007).....	27
Figura 2. Imagen de <i>B. serra</i> Griseb. en floración, fotografiada por el Ing. Agr. (Mgter.) Gabriel Pinto Ruiz en Santa Ana, Corrientes, Argentina.....	39
Figura 3. Preservación en el almacenamiento a -20 °C de hojas (líneas punteadas) de <i>Bromelia serra</i> (ECB) cada 30 días (a). Estabilidad en el almacenamiento de AEB y ECB (4° y -20°C) durante 3 meses. La actividad proteolítica se determinó con azocaseína a pH 7 a 37 °C por 30 minutos. Las barras representan la desviación estándar (n=4). * indican diferencias significativas con respecto a los AEB -20°C con AEB 4° y ECB a -20°C con ECB 4°C (p < 0,05) (b).	57
Figura 4. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE-SDS). Calle 1: patrones de peso molecular; calle 2: ECB; calle 3: AEB; calle 4: AEB con 2-mercaptoetanol (a). Zimografía. Calle 1: AE; calle 2: marcadores de proteínas estándar (b). IEF. Calle 1, aislado enzimático de BS; calle 2, marcadores pl: amiloglucosidasa (pl 3,50), inhibidor de tripsina (pl 4,55), b-lactoglobulina A (pl 5,20), anhidrasa carbónica II (pl 5,85), anhidrasa carbónica I (pl 6,55), mioglobina (pl 6,85 y 7,35), lectinas de <i>Lens culinaris</i> (pl 8,15, 8,45 y 8,65) y tripsinógeno (pl 9,30) (c).	59
Figura 5. Velocidad de la reacción enzimática en función de la concentración del sustrato. Azocaseína (a), Hemoglobina (b).	60
Figura 6. Linealización de la velocidad de la reacción enzimática en función de la concentración del sustrato de azocaseína (a) y hemoglobina (b).	61
Figura 7. Efecto de los inhibidores pepstatina A y PMSF sobre AEB. Las barras representan la desviación estándar (n=4). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).	62
Figura 8. Efecto de los inhibidores EDTA y E-64 sobre AEB. Las barras representan la desviación estándar (n=4). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).....	62
Figura 9. Actividad proteolítica con azocaseína del AE de hojas de <i>Bromelia serra</i> en función al tiempo de reacción. Cada punto del grafico representa el promedio de absorbancias a 440 nm (n=3) repeticiones.	63
Figura 10. Efecto de la cisteína sobre la actividad enzimática del AE. Las barras representan la desviación estándar (n=4). Letras distintas indican diferencias significativas entre temperaturas (p<0,05).	64
Figura 11. Actividad proteolítica utilizando como sustrato hemoglobina expresado en U/mL del AE de <i>Bromelia serra</i> en función del pH. Las barras representan la desviación estándar (n=4).	65
Figura 12. Actividad caseinolítica expresado en Ucas del AE de <i>Bromelia serra</i> en función del pH. Las barras representan la desviación estándar (n=4).	66
Figura 13. Efecto de la temperatura sobre el AE de <i>Bromelia serra</i> . Las barras representan la desviación estándar (n=4). Letras distintas indican diferencias significativas entre temperaturas (p<0,05)	67
Figura 14. Estabilidad enzimática del AE de <i>Bromelia serra</i> , preincubada a temperaturas de 37°C a 98°C desde 0 a 60 minutos. Las barras representan la desviación estándar (n=4).....	68

Figura 15. Efecto del NaCl sobre la actividad proteolítica del AE de <i>Bromelia serra</i> utilizando como sustrato a la azocaseína. Las barras representan la desviación estándar (n=4).....	69
Figura 16. Actividad del AE de <i>Bromelia serra</i> frente a sustratos N- α -CBZ-p-nitrofenil ésteres de L-aminoácidos. Las barras representan la desviación estándar (n=4).....	70
Figura 17. Cromatografía de exclusión molecular con Sephadex G-75 del AEB. Se recogieron fracciones de 0,5 ml a un caudal de 0,250 ml/min y se cuantificaron a 280 nm. Las flechas indican actividad proteolítica en la fracción I (F1), II (FII), III (FIII) y IV (FIV). Inserto en la Fig. 17 (SDS-PAGE) Fracciones con actividad proteolítica F1 (calle 2), FII (calle 3), FIII (calle 4), FIV (calle 5) y el estándar de peso molecular (calle 1).....	71
Figura 18. Cromatografía de intercambio aniónico (Q-Sepharose High Performance) del AE de <i>Bromelia serra</i> . Diámetro de la columna: 1,6 cm; buffer inicial: Tris-HCl 50 mM, pH 8,5; gradiente de elución salina: 165 ml de 0,0 a 0,1 M de cloruro de sodio en el buffer inicial. Caudal, 1,0 ml $^{-1}$ min. Las flechas indican actividad proteolítica en la fracción no retenida (F1) y en las fracciones retenidas (FII y FIII). Inserto en la Fig. 18 (SDS-PAGE). Fracciones con actividad proteolítica F1 (calle 2), FII (calle 3), FIII (calle 4), FIV y el estándar de peso molecular (calle 1).....	72
Figura 19. Distribución de bromelina en varias porciones de tallos plantas de ananá maduras al año, 2 años y 3 años y medio. Obtenida de Heinicke y W. A. Gortner (1957).....	84
Figura 20. Temperaturas máxima, media y mínima dentro del invernáculo registradas con termohigrómetro digital durante agosto, septiembre y octubre de 2019 y 2022. Las líneas indican las temperaturas máximas, las líneas punteadas verde las temperaturas promedios y las líneas azules las temperaturas mínimas de cada día.....	89
Figura 21. Valores NDVI tomadas a las 12 pm de hojas de ananá sometidos a tratamientos 100 % (línea azul), 50% (línea naranja) y 25% (línea gris) a capacidad de campo (CC) durante 3 meses. Las barras representan la desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05). Sd: sin diferencias estadísticas.....	91
Figura 22. Contenido relativo de agua de hojas "D" ananá sometidas a tratamientos 100, 50 y 25% a capacidad de campo (CC) durante 3 meses. Las barras representan la desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).....	92
Figura 23. Concentración de proteínas en mg/mL (CP) en ECAh en tres meses a diferentes porcentajes de capacidad de campo. Cada columna representa un año diferente de muestreo y cada fila un mes (1, 2 y 3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias según el test de Tukey al 5%. Las barras representan la desviación estándar (n=3).....	94
Figura 24. Concentración de proteínas en mg/mL (CP) en ECAt en tres meses a diferentes porcentajes de capacidad de campo. Cada columna representa un año diferente de muestreo y cada fila un mes (1, 2 y 3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias según el test de Tukey al 5%. Las barras representan la desviación estándar (n=3).....	95
Figura 25. Actividad proteolítica (U abs/mL) en ECAh en tres meses a diferentes porcentajes de capacidad de campo. Cada columna representa un año diferente de muestreo y cada fila un mes (1, 2 y 3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias según el test de Tukey al 5%. Las barras representan la desviación estándar (n=3).....	98
Figura 26. Actividad proteolítica (U abs/mL) en ECAt en tres meses a diferentes porcentajes de capacidad de campo. Cada columna representa un año diferente de muestreo y cada fila un mes (1, 2 y 3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias según el test de Tukey al 5%. Las barras representan la desviación estándar (n=3).....	99

- Figura 27.** Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) del mes 1. Calle 1: marcadores de proteínas estándar; calle 2: ECAh 100%; calle 3 ECAh 50%; calle 4 ECAh 25% CC; calle 5; Zimografía del ECAh 100%; calle 6: Zimografía de ECAh 50%; calle 7: Zimografía de ECAh 25% (a).
 Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE). Calle 1: marcadores de proteínas estándar; calle 2: ECAt 100%; calle 3 ECAt 50%; calle 4; ECAt 25% CC; calle 5; Zimografía de ECAt 100%; calle 6: Zimografía de ECAt 50%; calle 7: Zimografía de ECAt 25% (b)..... 101
- Figura 28.** Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) del mes 2. Calle 1: marcadores de proteínas estándar; calle 2: ECAh 100%; calle 3 ECAh 50%; calle 4; ECAh 25% CC; calle 5; Zimografía del ECAh 100%; calle 6: Zimografía del ECAh 50%; calle 7: Zimografía del ECAh 25% (a).
 Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE). Calle 1: marcadores de proteínas estándar; calle 2: ECAt 100%; calle 3 ECAt 50%; calle 4; ECAt 25% CC; calle 5; Zimografía de ECAt 100%; calle 6: Zimografía de ECAt 50%; calle 7: Zimografía de ECAt 25% (b)..... 103
- Figura 29.** Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) del Mes 3. Calle 1: marcadores de proteínas estándar; calle 2: ECAh 100%; calle 3: ECAh; calle 4: ECAh 25% CC; calle 5; Zimografía del ECAh 100%; calle 6: Zimografía de ECAh 50%; calle 7: Zimografía del ECAh 25% (a). Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE). Calle 1: marcadores de proteínas estándar; calle 2: ECAt 100%; calle 3 ECAt 50%; calle 4: ECAt 25% CC; calle 5; Zimografía del ECAt 100%; calle 6: Zimografía del ECAt 50%; calle 7: Zimografía del ECAt 25% (b)..... 105
- Figura 30.** Cromatografía de intercambio catiónico (SP- High Performance) de bromelina comercial. Diámetro de la columna: 1,6 cm; buffer inicial: acetato-acético 0.1M, pH 5,6; gradiente de elución salina: 165 mL de 0,0 a 1 M de cloruro de sodio en el buffer inicial. Caudal, 1,0 mL/minuto. La línea punteada el tiempo de elución (23 min) en el cual se detectó la máxima absorción a 280 nm durante el gradiente de elución salina (a). SDS-PAGE de las fracciones y picos obtenidos de la cromatografía de intercambio catiónico (SP- High Performance) de bromelina comercial, patrones de PM (calle 1), fracción no retenida (calle 2), fracción 2 (calle 3), fracción 3 (calle 4), fracción 4 (calle 5), bromelina comercial (calle 6) (b). 108
- Figura 31.** Cromatografía de intercambio catiónico (SP- High Performance) de Aislado Enzimático de tallo 100% CC. Diámetro de la columna: 1,6 cm; buffer inicial: acetato-acético 0.1M, pH 5,6; gradiente de elución salina: 165 mL de 0,0 a 1 M de cloruro de sodio en el buffer inicial. Caudal, 1,0 mL/min. La línea punteada el tiempo de elución (23 min) en el cual se detectó la máxima absorción a 280 nm durante el gradiente de elución salina..... 109
- Figura 32.** Cromatografía de intercambio catiónico (SP- High Performance) de Aislado Enzimático de tallo 25% CC. Diámetro de la columna: 1,6 cm; buffer inicial: acetato-acético 0.1M, pH 5,6; gradiente de elución salina: 165 mL de 0,0 a 1 M de cloruro de sodio en el buffer inicial. Caudal, 1,0 mL/min. La línea punteada el tiempo de elución (23 min) en el cual se detectó la máxima absorción a 280 nm durante el gradiente de elución salina..... 110
- Figura 33.** Cromatografía de intercambio catiónico (SP- High Performance) de AEAh de hoja 100% CC. Diámetro de la columna: 1,6 cm; buffer inicial: acetato-acético 0.1M, pH 5,6; gradiente de elución salina: 165 mL de 0,0 a 1 M de cloruro de sodio en el buffer inicial. Caudal, 1,0 mL/min. La línea punteada el tiempo de elución (23 min) en el cual se detectó la máxima absorción a 280 nm durante el gradiente de elución salina..... 111
- Figura 34.** Cromatografía de intercambio catiónico (SP- High Performance) de Aislado Enzimático de hoja 25% CC. Diámetro de la columna: 1,6 cm; buffer inicial: acetato-acético 0.1M, pH 5,6; gradiente de elución salina: 165 mL de 0,0 a 1 M de cloruro de sodio en el buffer inicial. Caudal, 1,0

mL/min. La línea punteada el tiempo de elución (23 min) en el cual se detectó la máxima absorción a 280 nm durante el gradiente de elución salina.....	112
Figura 35. SDS-PAGE de las fracciones y picos obtenidos de la cromatografía de intercambio catiónico (SP- High Performance) de AE de hoja de ananá al 100 % y 25 % CC. Patrones de PM (calle 1), AEAh 100% CC (calle 2); fracción no retenida de AEAh 100% CC (calle 3); pico 1 del AEAh 100% CC (calle 4), AEAh 25% CC (calle 5), fracción no retenida del AEAh 25 % CC (calle 6) y pico 1 AEAh 25% CC (calle 7).	113
Figura 36. SDS-PAGE de las fracciones y picos obtenidos de la cromatografía de intercambio catiónico (SP- High Performance) de AEAt 100 % y 25 % CC. Patrones de PM (calle 1), AEAt 100% CC (calle 2), fracción no retenida de AEAt 100% CC (calle 3), pico 1 del AEAt 100% CC (calle 4), AEAt 25% CC (calle 5), fracción no retenida del AEAt 25 % CC (calle 6) y pico 1 AE de AEAt 25% CC (calle 7)	114
Figura 37. Activación de cepas de bacterias en medio TSA. <i>Ralstonia solanacearum</i> (a), <i>Pseudomonas syringae</i> (b), <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Manihotis</i> (c), <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>Citri</i> (d).	135
Figura 38. Césped de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Manihotis</i> con discos de AC de tallo (a). Césped de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Manihotis</i> con el antibiótico estreptomicina (indicado con la letra S) (b).....	137
Figura 39. Determinación de la concentración inicial de células utilizando resazurina para <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Manihotis</i> (Xm), <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>Citri</i> (Xc), <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i> (C), <i>Ralstonia solanacearum</i> (R) y <i>Pseudomonas syringae</i> (Pse). Los números del 1 al 5 indican diferentes concentraciones de células de cada bacteria.	138
Figura 40. Técnica de microdilución en caldo. El rectángulo negro muestra el control negativo. 141	
Figura 41. Crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> luego de 10 días a 28°C. Vista del hongo desde el envés de la placa de Petri (a) y vista superior desde la tapa de placa (b).	142
Figura 42. <i>Fusarium oxysporum</i> en microscopio óptico binocular (40X). Presencia de microconidios en forma ovoide.....	142
Figura 43. Degradación de caseína por enzimas de coagulación y desarrollo de péptidos amargos. MCA = Actividad coagulante de la leche, PA = Actividad proteolítica. Imagen obtenida de Nicossia et al. (2022)	149
Figura 44. Reacción del TNBS con grupos aminos. Imagen obtenida de Ballerini (2011).	152
Figura 45. Curva de calibración de Trólox.....	154
Figura 46. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE-SDS). Calle 1: patrones de peso molecular; calle 2: caseína sin hidrolizar; calle 3: blanco de enzima AEB; calle 4: 90 minutos; calle 5: 180 minutos; calle 6: 240 minutos.	156
Figura 47. Grado de hidrolisis de la caseína a 55° C a diferentes tiempos de incubación (90, 180 y 240 minutos). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05)	157
Figura 48. Porcentajes de inhibición de ABTS en función de la concentración proteica de los hidrolizados. Caseína 0 minutos (a), caseína 90 minutos (b), caseína 180 minutos (c) y caseína 240 minutos (d).	159
Figura 49. Visualización de los flóculos en las paredes del tubo de ensayo. Tubo de la derecha (control sin enzima), tubo de la izquierda (con enzima AEB).	160
Figura 50. Influencia de la temperatura sobre la fuerza de cuaje con el AEB a diferentes temperaturas (40, 50 y 60 °C). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).....	161

Tablas

Tabla 1. Clasificación de enzimas según las Comisión de Enzimas (Enzyme Comission).....	24
Tabla 2. Sistema de clasificación MEROPS.....	27
Tabla 3. Diferentes aplicaciones de la bromelina.....	33
Tabla 4. Determinación de proteínas por Bradford	42
Tabla 5. Composición del buffer concentrador (4X).....	44
Tabla 6. Composición del buffer separador (4X)	44
Tabla 7. Composición de gel de poliacrilamida SDS-PAGE para 2 geles	44
Tabla 8. Composición de buffer de electrodo para SDS-PAGE.....	45
Tabla 9. Composición buffer de muestra 4X.....	45
Tabla 10. Composición del tratamiento previo para 1 gel.....	46
Tabla 11. Composición de la solución colorante para 1 gel.....	46
Tabla 12. Composición de la solución revelado para 1 gel	46
Tabla 13. Composición de la solución stop para 1 gel.....	47
Tabla 14. Composición de la solución lavado para 1 gel	47
Tabla 15. Composición del gel de IEF para 2 geles	48
Tabla 16. Composición de solución fijadora.....	49
Tabla 17. Composición de solución colorante	49
Tabla 18. Composición de solución decolorante I	50
Tabla 19. Composición de solución decolorante II	50
Tabla 20. Ensayo de actividad sobre N- α -carbobenzoxy-p-nitrofenil ésteres de L-aminoácidos	53
Tabla 21. Contenido de proteínas y actividad específica en AE de <i>Bromelia serra</i> (AEB) en diferentes estaciones del año	55
Tabla 22. Contenido de proteínas y actividad específica en extracto crudo y aislado enzimático (AE) de hojas de <i>Bromelia serra</i> utilizando como sustratos hemoglobina, azocaseína y caseína....	58
Tabla 23. Unidades de sustrato liberados por mL de aislado enzimático (AE). Definición de Unidad del sustrato: Una unidad libera 1,0 μ mol de p-nitrofenol del éster de p-nitrofenilo de Na-CBZ-L-lisina por minuto a pH 4,6 a 25°C.....	106
Tabla 24. Valores de unidades de absorbancia a 280 a tiempo de retención de 23 minutos de los aislados enzimáticos de tallo (AET) al 100, 50, 25% CC y aislado enzimático de hoja (AEH) al 100, 50, 25% CC obtenidos de cromatografías SP	112
Tabla 25. Actividad proteolítica con azocaseína y hemoglobina (Hb) del aislado enzimático de tallo (AEt) y aislado enzimático de hoja (AEh) a 100 % y 25 % CC (Capacidad de campo) de las eluciones no retenidas (NR) y pico uno retenido a los 23 minutos (P1). Letras diferentes indican diferencias significativas (p valor<0,05).....	116
Tabla 26. Actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en disco	136
Tabla 27. Determinación de la concentración inhibitoria mínima utilizando técnica de microdilución en caldo	139
Tabla 28. Porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio de <i>Fusarium oxysporum</i> para diferentes aislados proteicos y bromelina comercial.....	143
Tabla 29. Curva de calibración de leucina para el ensayo del TNBS.	152
Tabla 30. Grado de hidrolisis de caseína expresado en porcentaje para cada tiempo de hidrolisis (0, 90, 180 y 240 minutos) y sus correspondientes valores de IC ₅₀ y TEAC. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05)	158

Abreviaturas

%GH: grado de hidrólisis	ECAt: Extracto crudo de tallo de <i>Ananas comosus</i>
ABTS: ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)	ECB: Extracto crudo <i>Bromelia serra</i>
AC: <i>Ananas comosus</i>	EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
AEAh: Aislado enzimático de hoja de <i>Ananas comosus</i>	IEF: isoelectroenfoque
AEAt: Aislado enzimático de tallo de <i>Ananas comosus</i>	K _M : constante de Michaelis-Menten
AEB: Aislado enzimático de <i>Bromelia serra</i>	MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
ATP: Adenosin trifosfato	pI: punto isoeléctrico
BS: <i>Bromelia serra</i>	PM: peso molecular
CC: Capacidad de campo	PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
E-64: <i>L-trans-3-Carboxyoxiran-2-carbonyl-L-leucylagmatine trans-Epoxysuccinyl-L-leucylamido (4-guanidino) butane N-(trans-Epoxysuccinyl)-L-leucine 4-guanidinobutylamide</i>	TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina
EC: Comisión de enzimas	TNBS: ácido trinitrobenceno sulfónico
ECAh: Extracto crudo de hoja de <i>Ananas comosus</i>	TRIS: tris(hidroximetil)aminometano
	UA: unidades de absorbancia
	UC: unidad coagulante
	V: Voltios
	V _{max} : velocidad máxima

Publicaciones

Gómez Herrera M. D., Alayón Luaces P., Bruno. M., Liggieri C., Avanza M. V. (2022). Proteolytic characterization of a novel enzymatic extract from *Bromelia serra* leaves, *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 94 (4). <https://doi.org/10.1590/0001-3765202220201871>

Gómez Herrera M. D., Cardozo M., Prieto C., Avanza M.V., Alayón Luaces P. (2024). Biological activity of proteolytic enzymes isolates from native and cultivated Bromeliaceae in Corrientes on phytopathogenic microorganisms (En revisión:01/09/2024).

Presentaciones en Congresos y Reuniones Científicas

Gómez Herrera, Melanie D., Avanza M. V., Alayón Luaces P. (2023). Actividad biológica de aislados de fitoproteasas de bromeliáceas nativas y cultivadas en Corrientes sobre microorganismos fitopatógenos. XXVIII Reunión De Comunicaciones Científicas Y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia, Argentina.

Gómez Herrera, M. D., Cardozo M., Avanza V., Alayón Luaces P. (2023). Actividad biológica de aislados de fitoproteasas de bromeliáceas nativas y cultivadas en corrientes sobre microorganismos fitopatógenos. XXVIII Reunión de Comunicaciones Científicas, Técnicas y de Extensión de la Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina.

Gómez Herrera M. D., Cardozo M., Traffano Schiffo M. V., Alayón Luaces P., Avanza M. V. (2023). Efecto de extractos enzimáticos de Bromeliaceae provenientes de Corrientes sobre microorganismos fitopatógenos. XVIII Congreso Argentino De Ciencia Y Tecnología De Alimentos, IX Simposio Internacional De Nuevas Tecnologías, VII Simposio Latinoamericano Sobre Higiene Y Calidad De Alimentos, V Simposio De Innovación En Industrias Alimentarias. Universidad Católica Argentina, Sede Puerto Madero, Buenos Aires, Argentina

Gómez Herrera, M. D.; Alayón Luaces, P.; Bruno, M.; Avanza, M. V. (2021) “Propiedades proteolíticas de extractos enzimáticos de *Bromelia serra*” presentado 10^a edición del Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos, Uruguay.

Gómez Herrera, M. D.; Alayón Luaces, P.; Avanza, M. V. (2019) “Propiedades físico-químicas y cinéticas de extractos enzimáticos de *Bromelia serra*” presentado en XXI Congreso de la Asociación Latinoamericana y del Caribe de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Buenos Aires, Argentina

Resumen

Algunas especies nativas de la familia de las Bromeliaceae se caracterizan por poseer endopeptidasas en cantidades superiores a las fisiológicamente necesarias, lo que constituye una potencialidad muy atractiva debido a los múltiples usos biotecnológicos que poseen dichas enzimas. Se ha comprobado que la bromelina de tallo de *Ananas comosus* (L.) Merr. posee múltiples usos como controlador de ciertos microorganismos fitopatógenos y aplicaciones en la industria de los alimentos. Además, existen antecedentes que demuestran que ante condiciones de estrés hídrico se estimula la expresión de genes que codifican para la transcripción de cisteína proteasas en *Arabidopsis thaliana*, lo cual podría favorecer a un aumento en el contenido de enzimas proteolíticas en la planta. En el caso de la especie *Bromelia serra* Griseb., hasta el momento, existen escasos estudios acerca de la caracterización de enzimas y su aplicación. Considerando la importancia creciente que han adquirido las enzimas proteolíticas en la industria, los objetivos de esta investigación fueron: i) analizar el perfil de proteasas cisteínicas existentes en aislados de hojas de *B. serra* en distintas estaciones del año, ii) estudiar el comportamiento de proteasas cisteínicas de *A. comosus* bajo distintas condiciones de estrés hídrico, iii) evaluar el uso de las proteasas cisteínicas de *Ananas comosus* y *Bromelia serra* como producto orgánico para el control de microorganismos fitopatógenos, y iv) evaluar el efecto de las enzimas de *B. serra* sobre la coagulación de la leche bovina. Los resultados mostraron que las concentraciones de proteínas y actividad enzimática obtenida a partir de hojas de *B. serra* no varió estadísticamente en diferentes estaciones del año. La actividad proteolítica específica (Ucas/mg de proteína) de los extractos de *Bromelia serra* aumentó al emplear la precipitación con acetona y etanol en comparación al extracto crudo. Se detectaron cisteíno y asparto proteasas en el aislado enzimático de *Bromelia serra* (AEB) utilizando técnicas de medición de actividad en presencia de inhibidores. Se observó que el AEB presentó actividad en un rango de pH de 2,7 a 7, mostrando mayor actividad en pH ácidos. Además, se evidenció una alta estabilidad térmica en los AEB obteniendo un 47% de actividad residual luego de preincubar por una hora a 98°C. Asimismo, se alcanzó la máxima actividad proteolítica a una temperatura de 60°C. Se destaca la fácil inactivación del AEB frente al efecto de NaCl, lo

que señala una sensibilidad particular de estas enzimas a las condiciones de alta salinidad. Utilizando la cromatografía de exclusión molecular, se logró detectar en el AEB fracciones proteolíticas con pesos moleculares distintos de 21 y 54 kDa. Respecto al estudio del comportamiento de proteasas cisteínicas de *Ananas comosus* bajo distintas condiciones de estrés hídrico, se utilizaron como indicadores del estrés el NDVI y CRA, demostrando que NDVI detectó el estrés hídrico ($p<0,05$) a los 2 meses de iniciado el ensayo entre tratamientos. La caracterización de los extractos crudos de ananá de tallo (ECAt) y hoja (ECAh), mostraron mayor actividad proteolítica sobre azocaseína y mayor concentración de proteína al aumentar el estrés hídrico. Las técnicas utilizadas para caracterizar el peso molecular de las proteínas y su actividad gelatinolítica permitieron detectar diferencias de acuerdo al tipo de órgano y el nivel de estrés hídrico. En general, en el caso del ECAt se detectaron varias proteínas a medida que aumentó el nivel de estrés hídrico, pero la banda más marcada y con mayor actividad gelatinolítica fue la de 25 kDa. En el caso de del ECAh, también se observaron varias proteínas, predominando la de peso molecular de 22 kDa con mayor actividad gelatinolítica al aumentar el estrés hídrico. Al comparar los perfiles cromatográficos de la bromelina comercial con los perfiles de aislado enzimático tallo (AEAt) y hoja (AEAh) se encontró un pico con el mismo tiempo de retención (23 min). En la bromelina comercial esa fracción contuvo proteínas de 16, 22 y 25 kDa (23 min). En el caso del pico de AEAh se correspondió con una banda de 22 kDa y con el AEAt dos bandas proteicas de 12 y 25 kDa (23 min). Los picos de retención (23 min) de ambos aislados presentaron mayor actividad proteolítica el tratamiento estresado (25%CC) que en el no estresado (100%CC). La actividad con LNPE (α -N-CBZ-L-lisin-p-nitrofenil éster) fue mayor con los tratamientos estresados, tanto en hoja como en tallo, por lo que se podría inferir que a mayor estrés hídrico hay mayor actividad de la bromelina del tallo. Respecto al uso de las proteasas cisteínicas de *A. comosus* y *B. serra* como producto orgánico para el control de microorganismos fitopatógenos en bacterias y en hongo (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, *X. citri* pv. *Citri*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *Tomate* y *Fusarium oxysporum*), no se detectó inhibición con ninguno de los microorganismos estudiados. Por último, al estudiar efecto de las enzimas de *serra* sobre la coagulación de la leche bovina, se prepararon en un ensayo previo hidrolizados de caseína utilizando AEB a diferentes tiempos. El hidrolizado obtenido

tras un tratamiento de 240 minutos exhibió la actividad antioxidante (ABTS) más elevada en comparación con los demás tratamientos obteniendo un hidrolizado con un grado de hidrólisis de 12% con un valor de TEAC de 1,10 μ M/mg e IC₅₀ de 1,68 (mg/mL). Una vez estudiado el efecto del AEB sobre la caseína, se procedió a los estudios de coagulación de la leche, que si bien presentaron valores bajos pueden aumentarse concentrando el AEB. Estos ensayos permiten sentar base para estudios futuros para la manufactura de quesos, reemplazando el cuajo de origen animal, por vegetal. Posteriormente deberán realizarse estudios correspondientes a pruebas de acidez, alcohol, enzima reductasa o también denominada reducción del azul de metíleno la leche y análisis sensorial a la manufactura de quesos. Estos estudios realizados durante la tesis sientan las bases de que el aumento del estrés hídrico en ananá aumenta la actividad de la bromelina de tallo y por otro lado al utilizar AEB como una herramienta capaz de hidrolizar otros sustratos proteicos que puedan derivar en péptidos con bioactividad como es la actividad antioxidante, entre otros usos en la industria agroalimentaria.

Abstract

Some native species of the Bromeliaceae family are characterized by having endopeptidases in higher quantities than those that are physiologically necessary, which constitutes a very attractive potential due to the multiple biotechnological uses of these enzymes. It has been proven that the stem bromelain of *Ananas comosus* (L.) Merr. has multiple uses as a controller of certain phytopathogenic microorganisms and applications in the food industry. Furthermore, there is evidence that under water stress conditions, the expression of genes that encode the transcription of cysteine proteases in *Arabidopsis thaliana* is stimulated, which could favor an increase in the content of proteolytic enzymes in the plant. In the case of the species *Bromelia serra* Griseb., there are few studies on the characterization of enzymes and their application. Considering the growing importance that enzymes have acquired in the industry, the objectives of this research were: i) analyze the profile of cysteine proteases in isolates from organs of *B. serra* in different seasons of the year, ii) study the behavior of cysteine proteases of *Ananas comosus* under different water stress conditions, iii) evaluate the use of cysteine proteases from *A. comosus* and *B. serra* as an organic product for the control of phytopathogenic microorganisms, and iv) evaluate the effect of *B. serra* enzymes on coagulation of bovine milk. Regarding the study of *B. serra* in different seasons of the year, the concentrations of proteins and enzymatic activity obtained from leaves did not vary according to the year's seasons. An important finding was the considerable increase in the proteolytic activity of *B. serra* extracts when precipitation with acetone and ethanol was used. Cysteine and aspartic proteases were detected using inhibitor measurement techniques. AEB presented activity in a pH range of 2.7 to 7, showing higher activity at acidic pH. Furthermore, high thermal stability was evident in the AEB, obtaining 47% residual activity after pre-incubation for one hour at 98°C. In addition, it reached its maximum proteolytic activity at 60°C. The easy deactivation of *B. serra* enzyme isolate (AEB) against the effect of NaCl stands out, which indicates a particular sensitivity of these enzymes to high salinity conditions. Using size exclusion chromatography, it was possible to isolate two proteolytic enzymes with different molecular weights of 21 and 54 kDa.

Regarding the study of the behavior of cysteine proteases of *A. comosus* under different conditions of water stress, NDVI and CRA (RWC) were used as indicators of water stress, demonstrating that NDVI detected water stress among treatments ($p<0.05$) 2 months after the experiment started. The pineapple stem (ECAt) and leaf (ECAh) extracts showed higher proteolytic activity and protein concentration as water stress increased. The techniques used to characterize the molecular weight of the proteins and their gelatinolytic activity were different in terms of the type of organ and level of water stress. In general, in the case of the stem extract, several proteins were found as the stress level increased, but the most marked band and with the highest gelatinolytic activity was that of 25 kDa. In the case of the leaf extract, several proteins were also observed, predominating the one with a molecular weight of 22 kDa with higher gelatinolytic activity when water stress increased. When comparing the profiles of commercial bromelain with the stem and leaf profiles, a peak was found that was retained at the same time during chromatography (23 min). In commercial bromelain, these peaks corresponded to proteins of 16, 22, and 25 kDa (23 min). In the case of the peak of the leaf isolate (AEAh), it corresponded to a band of 22 kDa, and with the stem isolate (AEAt), two protein bands of 12 and 25 kDa (23 min). The retention peaks of both isolates presented higher proteolytic activity in the stressed treatment (25% CC) than in the non-stressed treatment (100% CC). The activity with LNPE (α -N-CBZ-L-lysine-p-nitrophenyl ester) was higher with the stressed treatments, both in the leaf and the stem, so it could be inferred that the greater the water stress, the greater the activity of bromelain in the stem. Regarding the use of cysteine proteases from *Ananas comosus* and *B. serra* as an organic product to control phytopathogenic microorganisms in bacteria and fungi (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, *X. citri* pv. *Citri*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* and *Fusarium oxysporum*), no inhibition was detected with any of the microorganisms studied. Finally, when studying the effect of *Bromelia serra* enzymes on the coagulation of bovine milk, casein hydrolysates were prepared using AEB at different times, as a prior study to the coagulation of milk and the influence that temperature has on the strength of rennet. The hydrolyzate obtained after a 240-minute treatment exhibited the highest antioxidant activity (ABTS) compared to the other treatments, obtaining a hydrolyzate of 12% with a TEAC value of 1.10 μ M/mg and IC₅₀ of 1.68 (mg/

mL). Once the effect of AEB on casein had been studied, milk coagulation studies were done, which, although they presented low values, could be increased by concentrating the AEB. These tests lay the foundation for future studies for the manufacture of cheeses, replacing rennet of animal origin with vegetable ones. Subsequently, studies corresponding to acidity, alcohol, reductase tests on milk, and sensory analysis on cheese manufacturing must be carried out. These studies carried out during the thesis lay the foundations for the verification that the increase in water stress in pineapple increases the activity of stem bromelain and, on the other hand, enzyme isolates from *B. serra* can be used as a tool capable of hydrolyzing other protein substrates that can lead to peptides with bioactivity such as antioxidant activity, among other uses in the agri-food industry.

Capítulo I

Introducción y objetivos

Introducción general

1. Enzimas

Las enzimas son catalizadores que aceleran reacciones químicas en los organismos vivos. Principalmente están compuestas de proteínas, aunque ocasionalmente se encuentran moléculas de ARN con propiedades catalíticas, conocidas como ribozimas (Tapia y Ruiz, 2020).

Numerosas enzimas están formadas por proteínas conjugadas que incluyen componentes no proteicos conocidos como cofactores, los cuales pueden ser iones inorgánicos o moléculas orgánicas llamados coenzimas. Las enzimas presentan tres características esenciales: 1) aumentan la velocidad de una reacción; 2) forman un complejo de transición con los reactivos; 3) no alteran el equilibrio de la reacción (Becker *et al.*, 2007).

El papel de las enzimas es fundamental en el funcionamiento celular, ya que regulan el metabolismo al participar en cada paso de las reacciones que ocurren en las células. Sin estos catalizadores, las reacciones químicas necesarias para la vida no ocurrirían o lo harían a una velocidad tan lenta que serían prácticamente imperceptibles (Tapia y Ruiz, 2020).

Las enzimas son necesarias en cantidades mínimas y no se consumen permanentemente durante las reacciones. Su acción no influye en la termodinámica de las reacciones, por lo que no determinan la proporción de productos y reactivos en equilibrio químico. Más bien, aceleran la velocidad de las reacciones que ya son favorables desde el punto de vista termodinámico. Los catalizadores inorgánicos como el platino y el magnesio pueden aumentar la velocidad de una reacción unas cientos o miles de veces, mientras que las enzimas pueden aumentarla en millones.

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

interacción explica la elevada especificidad de las enzimas a los que se unen y a la reacción que catalizan (Tapia y Ruiz, 2020).

Las enzimas se destacan por su capacidad catalítica excepcional, a menudo superando ampliamente a los catalizadores sintéticos o inorgánicos. Son altamente específicas para sus sustratos, acelerando eficientemente las reacciones químicas sin perturbar las constantes de equilibrio. Además, trabajan en soluciones acuosas bajo condiciones suaves de temperatura y pH, un atributo poco común en los catalizadores no biológicos (Lodeiro y Hozbor, 2014). Al operar en secuencias ordenadas, guían cientos de reacciones paso a paso, desde la descomposición de moléculas nutritivas hasta la síntesis de macromoléculas biológicas a partir de precursores simples. Debido a las enzimas reguladoras, las vías metabólicas están finamente coordinadas, asegurando una interacción armoniosa entre las diversas actividades esenciales para mantener la vida (Berg *et al.*, 2002).

1.1 Clasificación de las enzimas

A cada enzima se le asigna un número compuesto por cuatro dígitos, así como un nombre sistemático, que identifica la reacción que cataliza. Este sistema de nomenclatura y clasificación de las enzimas fue creado por la Comisión de Enzimas (“Enzyme Comission”, E.C.) de la International Union of Biochemistry (IUB) en el año 1961, debido a que el nombre dado por los investigadores a las enzimas que estudiaban, sumado al número creciente de enzimas reportadas, provocaban una situación caótica que requería de un inmediato ordenamiento. En la actualidad, el Comité de Nomenclatura de la IUBMB es el sucesor de la Comisión de Enzimas.

El sistema E.C. agrupa a las enzimas en seis clases: Oxidorreductasas (1), Transferasas (2), Hidrolasas (3), Liasas (4), Isomerasas (5) y Ligasas (6) de acuerdo a la reacción que catalizan. Las peptidasas integran la subclase 3.4, que a su vez contiene catorce diferentes sub-subclases como muestra la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de enzimas según las Comisión de Enzimas (Enzyme Comission).

Grupo	Reacción catalizada	Ejemplo de enzima
-------	---------------------	-------------------

EC 1 Oxidoreductasas	Reacciones de oxidación/reducción y de transferencia de átomos de H, O o electrones desde una substancia a otra.	Deshidrogenasa, oxidasa
EC 2 Transferasas	Transferencia de un grupo funcional desde una substancia a otra. El grupo puede ser metil-, acil-, amino- o fosfato.	Transaminasa, quinasa
EC 3 Hidrolasas	Formación dos productos de un substrato por hidrólisis.	Lipasa, amilasa, peptidasa
EC 4 Liasas	Adición o eliminación no hidrolítica de grupos de los substratos. Pueden romper los enlaces C-C, C-N, C-O o C-S.	Descarboxilasa
EC 5 Isomerasas	Isomerización de una molécula.	Isomerasa, mutasa
EC 6 Ligasas	Unión de dos moléculas por síntesis de nuevos enlaces C-O, C-S, C-N o C-C con la rotura simultánea de ATP.	Sintetasa

1.2 Enzima proteolíticas

Las enzimas proteolíticas se conocen con el nombre de proteasas, es decir, aquellas enzimas que actúan en la degradación de las proteínas. También son denominadas enzimas proteolíticas o péptido- hidrolasas. El Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB, 1984) recomendó el uso del término peptidasa como el más general para designar a las enzimas hidrolíticas que degradan enlaces peptídicos. Las peptidasas comprenden dos grandes grupos de enzimas: las endopeptidasas

y las exopeptidasas, que rompen uniones peptídicas en distintos puntos del interior de la proteína o que remueven secuencialmente uno o más aminoácidos desde los extremos carboxilo o amino, respectivamente. En la actualidad se conocen más de mil peptidasas provenientes de vegetales, animales y microorganismos (Barrett *et al.*, 2004a).

Las enzimas proteolíticas desempeñan un rol crítico en los sistemas biológicos. El clivaje proteolítico de la unión peptídica es una de las más frecuentes e importantes modificaciones enzimáticas de proteínas en los sistemas vivos. El procesamiento proteolítico es la etapa final en la expresión de actividad de una gran variedad de proteínas y ocurre mediada por muchas vías y con la participación de muchas peptidasas diferentes. Sin embargo, la proteólisis es limitada y dirigida hacia la ruptura de uniones peptídicas específicas en proteínas determinadas. Esta especificidad de corte depende de la accesibilidad de la unión peptídica a escindir, de los aminoácidos involucrados en este enlace peptídico y del entorno aportado por otros aminoácidos cercanos a la unión (Neurath, 1989).

La síntesis de las peptidasas depende de la disponibilidad de los aminoácidos precursores, y parte de ellos pueden ser obtenidos mediante hidrólisis enzimática por degradación de proteínas celulares, formando parte del recambio proteico que continuamente ocurre en la célula. Según la clasificación del Comité NC-IUBMB, las peptidasas integran la subclase 3.4 de la clasificación EC, las cuales se agrupan en diferentes sub-subclases según el tipo de enlace químico sobre el cual actúen. Las exopeptidasas pueden atacar el extremo N-terminal, pudiendo liberar un único residuo aminoácido (aminopeptidasas, EC 3.4.11), o un dipéptido o tripéptido (di/tri-peptidilpeptidasas, EC 3.4.14); o también pueden actuar sobre el extremo C-terminal, pudiendo liberar un único aminoácido (carboxipeptidasas, EC 3.4.16-18), o un dipéptido (peptidil-dipeptidasas, EC 3.4.15). En cambio, las endopeptidasas, se agrupan de acuerdo a sus mecanismos catalíticos y la nomenclatura está relacionada con los aminoácidos involucrados en el sitio activo. En las peptidasas serínicas (EC 3.4.23), cisteínicas (EC 3.4.21), serínicas y treonínicas (EC 3.4.25) y aspárticas (EC 3.4.22). Por otra parte, las metalopeptidasas (EC 3.4.24) generalmente contienen Zn en el sitio activo y generalmente contienen los aminoácidos His, Glu, Asp y Cys que actúan como formando complejos con Zn, Co y Mn (NC-IUBMB, 1992; Rawlings *et al.*, 2004; Caffini *et al.*, 2009).

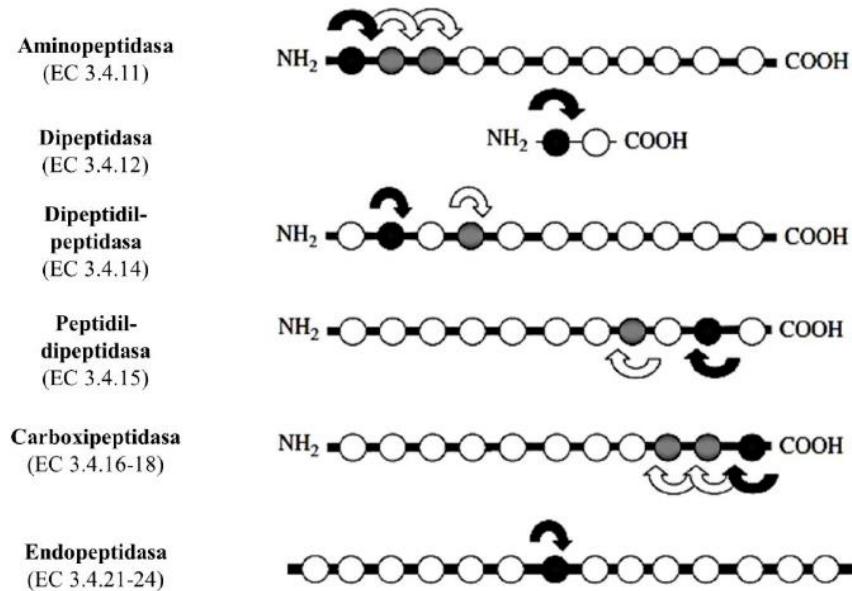


Figura 1. Clasificación de las peptidasas según la reacción catalizada. Cada círculo representa un aminoácido y la línea negra que los une representa la unión peptídica. Las flechas negras indican el primer corte y las blancas los subsecuentes. En el primer corte, el aminoácido hacia el cual se dirige la escisión está coloreado de negro y, para los siguientes clivajes, los aminoácidos se muestran en gris. Imagen obtenida de Rawlings et al. (2007)

1.3 El sistema MEROPS de clasificación de peptidasas

La mayoría de las enzimas proteolíticas son endopeptidasas (238 sobre un total de 314) y están distribuidas en sólo 5 de las 14 sub-subclases existentes. En 1993, N. D. Rawlings y A.J. Barret comenzaron a desarrollar una nueva forma de clasificación de las peptidasas, con el propósito de agruparlas en una forma que representase sus características estructurales básicas y sus relaciones evolutivas, aprovechando el conocimiento de las secuencias aminoacídicas disponibles en ese entonces. El sistema se fue enriqueciendo a través de sucesivas comunicaciones (Rawlings *et al.*, 2018), lo que finalmente dio lugar a la base de datos MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>), un sistema de clasificación de peptidasas en el que las mismas son agrupadas en familias y clanes, como puede verse en la Tabla 2.

Tabla 2. Sistema de clasificación MEROPS

Nivel	Descripción	Identificadores
-------	-------------	-----------------

Clan	Conjunto de familias en las que todas las peptidasas han evolucionado a partir de un único ancestro. Las familias en el mismo clan tienen en común que las peptidasas que las integran exhiben tipos de plegamiento similares	A, C, M, P, S
Familia	Una familia incluye peptidasas que presentan homología en su secuencia aminoacídica	A, C, M, S, T, U
Peptidasas	Una peptidasa se distingue de las demás por diferencias en la actividad, estructura u origen genético	A, C, M, S, T, U

Una familia está constituida por un grupo de peptidasas en el que la secuencia aminoacídica de cada miembro muestra una relación estadísticamente significativa con al menos la de otro miembro de la familia en la zona de la molécula responsable de la actividad peptidásica (Rawlings y Barrett, 2004).

El término clan describe un grupo de familias cuyos miembros han evolucionado a partir de una proteína ancestral común, pero que han divergido tanto que su relación no puede ser establecida simplemente por la comparación de sus estructuras primarias (Rawlings et al., 2018). Un clan puede incluir familias de más de un tipo catalítico, como ocurre en el Clan PA que contiene, a la fecha, diez familias de peptidasas serínicas y cinco de peptidasas cisteínicas.

Los identificadores utilizados para los clanes, familias y peptidasas en la clasificación MEROPS comienzan con una letra que indica el tipo catalítico de la peptidasa en el grupo: A (aspártica), C (cisteíntica), M (metalo), S (seríntica), T (treoníntica), o U (sin clasificar). La letra P es también utilizada para identificar dos clanes que contienen peptidasas de más de un tipo. El identificador de un clan se completa con una segunda letra mayúscula, asignada secuencialmente (por ejemplo, clan CA), y el identificador para una familia es completado con un número (por ejemplo, C14, la familia de las caspasas). El identificador MEROPS para

cada peptidasa individual comienza con el identificador de familia y se completa con un número decimal (por ejemplo, C14.001 para la caspasa 1). Todos los identificadores son estables, siendo cambiados sólo bajo circunstancias especiales, y jamás son reutilizados (Barrett, 2001). Referencias cruzadas al sistema MEROPS pueden hallarse en la base de datos SWISS-PROT (en el sitio ExPASy, <http://www.expasy.ch/>) y en la lista EC (URL: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>).

1.4 Mecanismos catalíticos de las endopeptidasas

1.4.1 Proteasas cisteínicas

Las cisteínas o tiol peptidasas son endopeptidasas y exopeptidasas, cuya acción catalítica depende de un residuo de cisteína en el sitio activo. La diáada catalítica His-Cys está presente en todas las tiol peptidasas. En la cisteína peptidasa similar a la papaína, el aparato catalítico generalmente consta de Hist, Cys y Asp. En general, estas enzimas muestran actividad máxima a un pH de 4,5 a 7 y una masa molecular de aproximadamente 20 a 35 kDa. Debido a su alta tendencia a la oxidación del grupo tiol, muchas cisteínas peptidasas necesitan un agente reductor en su medio de reacción. La cisteína peptidasa muestra inhibición por el ácido yodoacético, N-etilmaleimida y E-64, entre otros (Brocklehurst *et al.*, 2013).

Las peptidasas cisteínicas están presentes en todos los organismos. Muchas de estas peptidasas se encuentran en virus, bacterias, hongos, protistas (cruzipaína—*Trypanosoma cruzi*) y plantas (papaína, bromelina).

1.4.2 Proteasas aspárticas

Las aspárticas o aspartil peptidasas son endopeptidasas ácidas, cuyo aparato catalítico tiene dos residuos de ácido aspártico. Muestra una actividad óptima a un pH de 3 a 6, puntos isoelectrómicos en el rango de 3 a 4,5 e inhibición habitual por la pepstatina A. Este grupo peptidasa se utiliza en diversos sectores industriales como los hidrolizados de caseína, la síntesis de péptidos y la reducción de la turbidez mediante la degradación del complejo proteico del zumo de frutas. Además, en la producción de queso, las peptidasas aspárticas son muy necesarias como sustituto de la quimosina de rumiantes recién nacidos. El proceso de extracción de quimosina de rumiantes choca con problemas éticos, y la búsqueda por

enzimas microbianas constituye una alternativa atractiva con bajo costo y reducido tiempo de producción (Rodrigues da Silva, 2017)

1.4.3 Proteasas serínicas

Las serina peptidasas comprenden el grupo más abundante de peptidasas. Estas enzimas se caracterizan por la presencia de un residuo de serina en el sitio activo, que es crucial para su desempeño catalítico. La tríada catalítica consta de His, Ser y Asp. Estas enzimas pueden ser una endopeptidasa y una exopeptidasa. En general, las serina peptidasas muestran actividad máxima a un pH de 6 a 11 y puntos isoeléctricos en el rango de 4 a 6. Algunas serina peptidasas alcalinas de hongos, es decir, producidas por *Aspergillus sp.* y *Neurospora Conidiobolu*, muestran una actividad óptima alrededor de pH 10 y puntos isoeléctricos altos (8–9). Las serina peptidasas alcalinas tienen diferentes aplicaciones: en el tratamiento del cuero, mejora del sabor del queso e industria de detergentes. Este grupo de peptidasa exhibe inhibición por fluoruro de fenilmetsulfonilo (PMSF), inhibidor de tripsina, antidolor, quimostatina y otros (Ward *et al.*, 2019)

1.4.4 Metalo proteasas

Las metalopeptidasas son endopeptidasas y exopeptidasas que dependen de iones, generalmente zinc, para su desempeño catalítico. También se han descrito otros iones metálicos, incluidos cobalto, manganeso, níquel, cobre y hierro, para la catálisis de estas enzimas. El sitio activo consiste principalmente en His-Glu-Xaa-Xaa-His, donde “Xaa” es el mismo aminoácido (repetición del mismo aminoácido). El residuo de histidina participa en la acomodación de los iones zinc y el residuo de ácido glutámico está directamente relacionado con la función catalítica. Estas peptidasas exhiben una amplia variedad catalítica para la proteólisis, como la colagenasa y elastasa (bacterias y hongos), la toxina hemorrágica de los venenos de serpiente y la termolisina bacteriana. Las metalopeptidasas exhiben inhibición por agentes quelantes, como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), cuya catálisis está influenciada por la eliminación de iones divalentes (Ward *et al.*, 2019).

1.5 Funciones de las proteasas dentro de los vegetales

Las proteasas se encuentran en las plantas cumpliendo diversas funciones. Uno de los principales roles está relacionado con los procesos regulatorios en la modificación y

degradación de proteínas. Buono et al. (2018) detallan cómo las proteasas desempeñan un papel crucial en varios procesos biológicos, incluyendo la apoptosis de diversos tejidos vegetales y el proceso de senescencia.

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

Aunque las proteasas suelen estar presentes en cantidades reducidas y pueden ser difíciles de identificar, ciertas plantas tienen la capacidad de producirlas en cantidades excepcionalmente elevadas. Principalmente, estas especies pertenecen a las familias Caricaceae, Bromeliaceae y Moraceae. Esta peculiaridad podría estar asociada con los mecanismos de protección contra agentes patógenos, parásitos y herbívoros (Dussourd, 1993; Ramos *et al.*, 2019).

Las cisteíno proteasas son actores clave en una variedad de procesos, incluido el crecimiento, el desarrollo, las respuestas al estrés y defensa (Balakireva y Zamyatnin, 2018). Además, existen antecedentes que demuestran que antes condiciones de estrés hídrico se estimula la expresión de genes que codifican para la transcripción de cisteína proteasas en *Arabidopsis thaliana* (Grudkowska *et al.*, 2004), lo cual podría favorecer a un aumento en el contenido de enzimas proteolíticas en la planta.

Las enzimas proteolíticas presentes en vacuolas o en la pared celular de algunas plantas actúan como agentes protectores contra patógenos, parásitos y herbívoros debido a que constituyen la primera línea de defensa contra potenciales patógenos (Van der Hoorn y Jones, 2004).

1.6 Usos actuales de las proteasas

Las enzimas proteolíticas o proteasas son un grupo importante de hidrolasas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos presentes dentro de sustratos proteicos y se emplean en diversos procesos industriales como catalizadores (Husain, 2018; Adrio y Demain, 2014).

Las proteasas constituyen alrededor del 60% del mercado mundial de enzimas; este último representado por productores como Genencor International, Gist-Brocades, Miles Laboratories y Novo Industries. Las proteasas se utilizan ampliamente en aplicaciones industriales como biotecnología de alimentos, procesamiento de textiles y cuero, productos

farmacéuticos, detergentes, investigación proteómica, síntesis de compuestos, entre otras. Hoy en día, el mercado de enzimas proteolíticas está aumentando debido a la creciente conciencia de la población sobre la necesidad de proteger el medio ambiente del impacto causado por la industria química (Arshad *et al.*, 2014, Husain, 2018). A las proteasas vegetales provenientes de fuentes no tóxicas se las considera como GRAS (Generally Recognized As Safe), estatus que corresponde a productos de origen natural que pueden ser aplicados en tecnologías agrícolas, alimentarias y farmacéuticas (U.S. Food and drugs administration, 2022).

El uso de hidrólisis enzimática para producir péptidos bioactivos a partir de sustrato proteico es atractivo para estudios biotecnológicos y actualmente constituye la forma más común de generar estos péptidos (Hidalgo *et al.*, 2012). Ciertas características, como el corto tiempo de hidrólisis y la actividad enzimática en condiciones controladas, hacen de las enzimas proteolíticas una ventaja valiosa en contraposición a otros métodos para la síntesis de péptidos bioactivos, como la hidrólisis química en la que se utilizan ácidos o bases. En general, los péptidos con funciones biológicas están encriptados en una proteína completa y, por lo tanto, se requiere la proteólisis para liberarlos. Utilizando una proteína original, la hidrólisis enzimática se utiliza para liberar varios péptidos, estudios *in vitro* e *in vivo* que han indicado una numerosa colección de funciones fisiológicas, incluidas actividades antitrombóticas, antioxidantes, opioides, efectos citomoduladores e inmunomoduladores, propiedades antimicrobianas y actividad inhibidora de la angiotensina. -enzima convertidora I (ACE), antiobesidad y actividad antigenotóxica (Rodrigues da Silva, 2017).

El reino vegetal ofrece una amplia variedad de especies que poseen enormes cantidades de enzimas proteolíticas que podrían ser útiles en diferentes áreas de aplicación. De hecho, existen peptidasas vegetales que se utilizan actualmente en diferentes industrias. La bromelina es una preparación cruda obtenida de la piña (*Ananas comosus*, Bromeliaceae) que contiene al menos cuatro peptidasas bien estudiadas llamadas bromelina del tallo, bromelina del fruto, comosaína y ananaína (Tochi *et al.*, 2008, Arshad *et al.*, 2014). Esta mezcla de enzimas se está empleando en muchas y variadas aplicaciones, como el ablandamiento de carne, bebidas, industria panadera, productos cosméticos, preparación de hidrolizados de

proteínas, alimentos para animales, blanqueamiento dental e industrias textiles y farmacéuticas, entre otras (Arshad *et al.*, 2014, Manzoor *et al.*, 2016).

1.7 Proteasas obtenidas de Bromeliaceae

Existen preparaciones comerciales ampliamente estudiadas que poseen fitopeptidasas, como la bromelina del ananá (*Ananas comosus* (L.) Merr.), cuyo sistema proteolítico es derivado mayormente del fruto y del tallo y contiene cuatro peptidasas principales de tipo cisteíncico: bromelina de tallo (EC 3.4.22.32), ananaína (EC 3.4.22.31), comosaína y bromelina de fruto (EC 3.4.22.33). Estas proteasas también están presentes en otras partes del ananá, como la piel, el corazón, la corona y las hojas (Arshad *et al.*, 2014; Ramli *et al.*, 2018). Esta preparación posee aplicaciones biomédicas como antiinflamatoria, antitumoral, antiedematoso, antitrombótica y fibrinolítica, así como usos en biotecnología alimentaria en la tiernización de carnes, panificación y en la producción de hidrolizados (Ketnawa *et al.*, 2012; Arshad *et al.*, 2014; Ramli *et al.*, 2017).

En el caso de la bromelina se resumen en la Tabla 3 los diferentes usos de esta enzima proteolítica.

Tabla 3. Diferentes aplicaciones de la bromelina.

Industria de alimentos (a,c,d)	Terapéutico (b,c)	Industria textil (a)	Industria cosmética (a)
--------------------------------	-------------------	----------------------	-------------------------

Industria panadera: Mejora la relajación de la masa, Produce harina hipoalergénica	Efectos cardiovasculares y respiratorios	Minimiza el tiempo de ablandamiento durante la cocción	Eliminas las manchas, placas y restos de comida en la superficie exterior de los dientes
Hidrolizado de proteínas: Agente hidrolizante para carne ostra, pollo, carne y calamares.	Alivia la osteoartritis	Elimina incrustaciones e impurezas de fibras de lana y seda	Tratamiento del acné, arrugas y piel seca
Hidrolizado de pescado. Estimación de la degradación de proteínas en piensos para rumiantes	Uso en tratamiento de enfermedades antinflamatorias crónicas, malignas, y autoinmunes	Mejora la propiedad de tinción de las fibras proteicas	Reduce los hematomas y la hinchazón posterior a inyecciones
Inhibe el pardeamiento de frutas y la oxidación de fenoles	Uso en coagulación sanguínea y fibrinólisis		
Producción de alcohol: Mejora la estabilidad proteica de la cerveza. Previene turbidez	Contrarresta efectos de la diarrea		
Efecto antimicrobiano	Mejora el crecimiento de la piel ante quemaduras		

Datos obtenidos de Arshad et al. (2014)(a); Pavan et al. (2012) (b); Orsini et al. (2006)(c); Ali et al. (2015) (d).

La acumulación de enzimas proteolíticas, como la bromelina, se presenta en diferentes especies de la familia de las Bromeliáceas. La más estudiada por su uso comercial es el *Ananas comosus* en el cual estas enzimas se almacenan en grandes cantidades en el tallo, de allí su importancia ya que en la cosecha del cultivo los mismos son residuos que podrían ser aprovechados para su extracción. Se registra pocos estudios sobre la de la presencia de

enzimas proteolíticas en la bromeliácea nativa *Bromelia serra* provenientes del fruto (Caffini *et al.*, 1988; Salese *et al.*, 2021).

Por otra parte, es importante destacar que hay antecedentes que ante situaciones de estrés abiótico se modifica el contenido de estas proteasas en los diferentes órganos de estas especies, sin embargo, se desconocen con precisión los factores ambientales que influyen en su acumulación en la planta. Además, en estudios previos (Lopez-Garcia *et al.*, 2012; Dutta *et al.*, 2013), se han demostrado que a partir de tallos de ananá se obtienen extractos con propiedades fungicidas y bactericidas, ofreciendo un atractivo modelo para su rápida y conveniente producción como uso terapéutico en las plantas y alternativa al uso de fungicidas y bactericidas químicos. Fundamenta la elección del tema la posibilidad de influenciar la acumulación de enzimas proteolíticas en el cultivo de ananá y dilucidar la existencia de las mismas en especies de importancia regional y el potencial aprovechamiento de sus extractos como producto orgánico para el control de fitopatógenos de interés agronómico. Dentro de los posibles usos de las enzimas proveniente de Bromeliáceas se encuentran antecedentes relacionados al tratamiento para obtener hidrolizados con péptidos que poseen actividad antioxidante (Salese *et al.*, 2022). También, se reportaron estudios sobre *Bromelia hieronymi* como agente coagulante de la leche para su posterior elaboración de quesos (Bruno *et al.*, 2010).

Objetivos

General

Evaluar la incidencia de las condiciones de crecimiento en los contenidos de proteasas cisteínicas en *Ananas comosus* L. Merr. y *Bromelia serra* Griseb. y evaluar su potencial uso agronómico

Específicos

- Analizar el perfil de proteasas cisteínicas existentes en aislados de hojas de *Bromelia serra* Griseb. en distintas estaciones del año.

- Estudiar la dinámica de proteasas cisteínicas de *Ananas comosus* L. Merr bajo distintas condiciones de estrés hídrico.
- Evaluar el uso de las proteasas cisteínicas de *Ananas comosus* L. Merr y *Bromelia serra* Griseb. como producto natural para el control de microorganismos fitopatógenos.
- Evaluar el efecto de las enzimas de *Bromelia serra* sobre la coagulación de la leche bovina

Hipótesis

- Las plantas de *Ananas comosus* sometidas a diferentes niveles de estrés hídrico modifican la concentración y actividad proteolítica de las proteasas cisteínicas.
- Las diferentes condiciones ambientales propias de las cuatro estaciones del año, modifican la concentración y actividad proteolítica de las proteasas cisteínicas extraídas de *Bromelia serra* Griseb.
- La aplicación de proteasas cisteínicas de *Ananas comosus* L. Merr. y *Bromelia serra* Griseb. tienen efectos como producto natural para el control de ciertos microorganismos fitopatógenos.
- Las enzimas de *Bromelia serra* posee propiedades de coagulación sobre la leche bovina

Capítulo II

**Caracterización de proteasas en hojas de
Bromelia serra Griseb**

Introducción

1. Enzimas Proteolíticas de Bromeliaceae

Algunas especies nativas de la familia de las Bromeliaceae se caracterizan por poseer endopeptidasas en cantidades superiores a las fisiológicamente necesarias (Barrett, 2001), lo que constituye una potencialidad muy atractiva debido a los múltiples usos biotecnológicos que poseen dichas enzimas. A pesar del elevado número de integrantes de la familia Bromeliaceae es muy reducido el número de géneros que han sido estudiados hasta la fecha en busca de enzimas proteolíticas (*Ananas*, *Bromelia*, *Hohenbergia* y *Pseudananas*), siendo *Ananas comosus* L. (el “ananá” o “piña”) la especie más estudiada, a partir de cuyos tallos se obtiene la bromelina (Heinicke *et al.*, 1957). Bromelina es el nombre colectivo de enzimas proteolíticas relacionadas que se encuentran en los tejidos de las especies pertenecientes a la familia Bromeliaceae, de los cuales el ananá (*Ananas comosus*) es el más conocido. Se reconocen dos tipos distintos de bromelina del ananá: bromelina del tallo (CE 3.4.22.32) y la bromelina de la fruta (CE 3.4.22.33), siendo ambas cisteíno proteasas (Maurer, 2001). Esta enzima se encuentra dentro de las denominadas proteasas sulfhidrílicas o cisteína endopeptidasas cuya actividad depende del grupo tiol del residuo de cisteína localizado en el sitio activo de la enzima. Por ello, para expresar su máxima actividad la bromelina requiere la presencia de agentes reductores, tales como cisteína.

Además de la bromelina de tallo y fruto, las proteasas más estudiadas en los últimos años pertenecientes a las Bromeliaceae son *Bromelia hieronymi*, *B. antiacantha*, *B. pinguin*, *B. laciniosa*, *B. karatas*, *B. fastuosa*, *Hohenbergia penduliflora*, *Pseudoananas macrodontes*, *B. balansae*, *A. ananassoides*, entre otros (Bruno *et al.*, 2002; Vallés *et al.*, 2007; Moreno-Hernández *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2022; Mesa-Espinoza *et al.*, 2018; Cabral *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2010; Errasti *et al.*, 2018; Pardo *et al.*, 2000; Okayama *et al.*, 2023).

Bromelia serra es una planta nativa del norte de Argentina con hábito de hierba perenne que se distribuye en las provincias de Chaco, Córdoba, Corrientes, Formosa, Jujuy, Salta, Santiago del Estero, Santa Fe y Tucumán. También pueden encontrarse en ciertas zonas de países limítrofes como Brasil y Paraguay. Presenta numerosas hojas estrechas, de bordes espinosos, de 1,5 m de largo y 4 cm de ancho, que forman una roseta de hasta 40 cm de alto.

La infrutescencia tiene forma globosa, conteniendo decenas de bayas tricarpelar amarillas (Caffini *et al.*, 1988; Montero *et al.*, 2017).

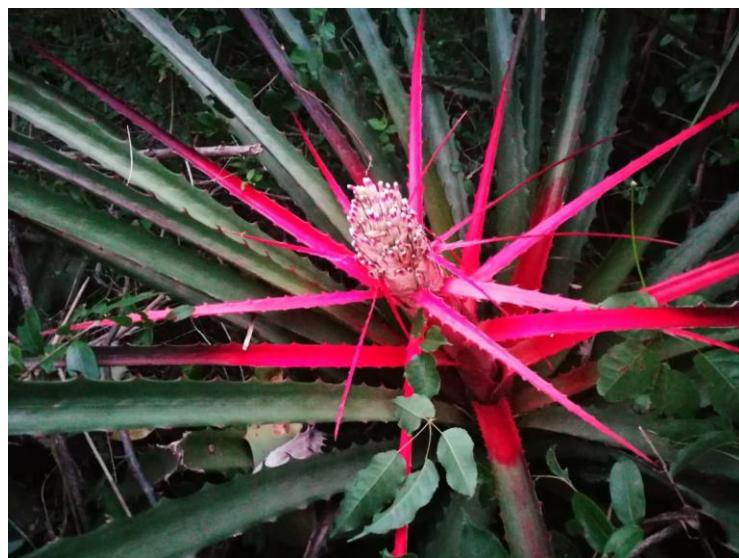


Figura 2. Imagen de *B. serra* Griseb. en floración, fotografiada por el Ing. Agr. (Mgter.) Gabriel Pinto Ruiz en Santa Ana, Corrientes, Argentina.

Existen pocos estudios a la fecha en cuanto a la caracterización de las enzimas proteolíticas proveniente de *B. serra*. Caffini *et al.* (1988) obtuvieron un polvo acetónico de sus frutos el cual mostró presencia de cisteíno peptidasas, las cuales presentaron buena estabilidad térmica y un rango de pH óptimo de 6.0 a 7.8. Por otro lado, surgieron nuevos estudios acerca del fruto de esta especie (Salese *et al.*, 2022) en la cual encontraron cisteíno peptidasas con pesos moleculares (PM) de entre 24,1 y 25,9 kDa, con un rango de pH mayor de actividad hasta pH 9. Además, en este último estudio se pudo comprobar que los extractos de *B. serra* retuvieron más del 80% de la actividad luego de incubaciones térmicas a 23, 37 y 45°C. Salese (2023) pudo comprobar que hubo variación en la actividad proteolítica de *B. serra* según el punto de madurez del fruto (inmaduro, semi-maduro y maduro).

Existen escasos antecedentes sobre la caracterización de enzimas proteolíticas extraídas de las hojas de *B. serra*. Por esta razón, se optó por estudiar este órgano de la planta, dado que las hojas están disponibles durante todo el año. Además, se ha confirmado mediante estudios previos (Gómez Herrera *et al.*, 2022) que las enzimas proteolíticas presentes en las hojas poseen características distintas en comparación con las provenientes de los frutos.

El objetivo de este capítulo fue caracterizar el sistema proteolítico presente en extractos de *Bromelia serra*, recolectado en distintas estaciones del año en la región de Corrientes.

Materiales y métodos

1. Material vegetal

Se recolectaron hojas adultas de *Bromelia serra* (BS) durante las cuatro estaciones del año en 2018 y 2019 en la localidad de Santa Ana, Corrientes, Argentina. Luego de su colecta, se lavaron las muestras con agua corriente, se las enjuagaron con agua destilada, y fueron envasadas herméticamente almacenándolas a -20°C hasta su uso.

1.1 Obtención del extracto crudo

Las hojas fueron cortadas en pequeños trozos, pesadas y trituradas con una procesadora eléctrica Smart-tek en un *buffer* fosfato de sodio (0,1 M) pH 7 conteniendo EDTA (5 mM) y cisteína (5 mM), como agentes protectores enzimáticos (Bruno, 2007). La homogenización con del material vegetal en el *buffer* se realizó en una proporción 1 g hoja por mL de *buffer*. La suspensión obtenida de la procesadora fue filtrada en baño de hielo usando tamiz de malla gruesa, su filtrado fue centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se denominó extracto crudo (ECB). Tanto el proceso de filtrado como la homogenización con la procesadora se realizó en baño de hielo manteniendo la temperatura entre 0 a 4°C (Hernández *et al.*, 1997).

1.2 Obtención de aislado enzimático (AEB)

Se obtuvieron los aislados enzimáticos por precipitación con diferentes solventes orgánicos (etanol y acetona) con el objetivo de eliminar compuestos fenólicos, glúcidos y proteína inactivas de bajo peso molecular (Bruno, 2007). En primer lugar, se trató el ECB (volumen inicial de 60 ml) con cuatro volúmenes del solvente orgánico (1:4) frío (-20 °C) a efectos de minimizar la desnaturalización proteica. Los tratamientos con acetona y etanol fueron realizados de manera independiente para luego comparar entre ambos la concentración de proteínas y la actividad proteolítica. La suspensión se agitó suavemente en un agitador magnético y se dejó reposar durante 20 min a 0 °C, luego se centrifugó a 4000 xg durante 20 minutos. Los pellets se secaron en un desecador al vacío para eliminar residuos de solventes orgánicos y se suspendieron con 4 mL del *buffer* fosfato de sodio (0,1 M) pH 7 conteniendo

EDTA (5 mM) y cisteína (5 mM), a 0°C (Scopes, 1984). Este precipitado resuspendido se denominó aislado enzimático (AEB).

2. Preservación de la actividad enzimática de hojas de BS, AEB y ECB

2.1 Preservación en el tiempo de la preservación de hojas de BS

Se evaluó la preservación de la actividad enzimática en función del tiempo de las hojas de BS preservados a -20°C, de los cuales se obtuvo un ECB según el ítem 1.1 y se ensayó la actividad proteolítica según ítem 3.2.2 cada 30 días durante 6 meses.

2.2 Preservación en el tiempo de la preservación de AEB y ECB

Se ensayó estabilidad en el tiempo de la actividad proteolítica según ítem 3.2.2 para los AEB y ECB a -20°C y 4 °C. Inicialmente 1 vez cada 24 horas durante 10 días y luego a los 15, 30, 60 y 90 días.

3. Caracterización del extracto crudo

3.1 Concentración proteica

Se empleó el método de Bradford (1976), el cual se basa en la capacidad del colorante Coomassie Blue G-250 para generar un cambio en la absorbancia de 465 nm (forma roja del colorante libre) a 595 nm (forma azul del complejo colorante-proteína) al unirse a las proteínas. Este método resulta adecuado para la cuantificación de proteínas en extractos vegetales, ya que estos suelen contener compuestos fenólicos que pueden interferir con el método clásico de Lowry (Peterson, 1979). Se realizaron curvas de calibración utilizando seroalbúmina bovina como patrón, en el rango de 2,5-45 µg/mL para luego calcular la concentración proteica del AEB (Tabla 4).

Tabla 4. Determinación de proteínas por Bradford

Tubo de reacción	Volúmenes
Muestra	5-10 μ L
Reactivos de Bradford	500 μ L

Agitar en vórtex, leer la absorbancia a 595 nm a los 10 minutos.

3.2 Actividad proteolítica del ECB

3.2.1 Sustrato proteico: hemoglobina

La hemoglobina se utilizó como sustrato para la determinación de la actividad proteolítica ácida, según Barrett (1970), con ligeras modificaciones. La mezcla de reacción contenía 0,1 mL de extracto enzimático (0,16 mg de contenido de proteína) y 1,46 mL de hemoglobina (2,5 g en 100 ml de *buffer* formiato de sodio-ácido fórmico 0,1 M a pH 3,3). Después de la incubación a 37 °C durante 30 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % (p/v). La mezcla se centrifugó a 4.000 xg durante 15 minutos y luego se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm. Los blancos de muestra se prepararon combinando el TCA con la enzima y luego agregando el sustrato de hemoglobina. Los ensayos se realizaron por triplicado. Las unidades de enzima por mL (UE/mL) y las unidades de enzima por mg (UE/mg) se calcularon de la siguiente manera:

$$\text{EU/mL} = (\text{AM}_{280} - \text{AB}_{280}) \times 2.66 \times \text{FD}$$

donde AM₂₈₀ y AB₂₈₀ son valores de absorbancia de la muestra y del blanco, respectivamente; 2,66, una constante de proporcionalidad, y FD, factor de dilución de la muestra.

3.2.2 Sustrato proteico: azocaseína

Se preparó azocaseína al 1% (p/v), la generación de péptidos solubles en TCA se siguió en condiciones alcalinas a 440 nm. Un ensayo sin enzima sirvió como control negativo. Una unidad de actividad caseinolítica, sobre azocaseína, se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir un cambio de absorbancia de 1.0 en una cubeta de 1 cm en las

condiciones del ensayo (Sarah *et al.*, 1989). Los blancos de muestra se prepararon combinando el TCA con la enzima y luego agregando el sustrato de azocaseína.

3.2.3 Sustrato proteico: caseína

Los ensayos de actividad caseinolítica se llevaron a cabo según Bruno *et al.* (2006). Para esta determinación, la mezcla de reacción contenía 1,1 mL de caseína (Sigma-Aldrich) al 1 % (p/v) en *buffer* fosfato de sodio 0,1 M (pH 7) con cisteína 5 mM y 0,1 ml de solución enzimática. La mezcla se incubó a 37 °C y luego se detuvo con la adición de 1,8 ml de solución al 5% (p/v). Se prepararon blancos de muestra agregando TCA a la enzima y luego agregando el sustrato. Las muestras se centrifugaron a 7000 xg durante 20 minutos y luego se midió la absorbancia de los sobrenadantes a 280 nm. Se utilizó una unidad enzimática arbitraria, denominada Ucas (Unidad caseinolítica), para expresar la actividad proteolítica (Priolo *et al.*, 1991).

3.4. Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)

Se realizaron las electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) según lo descripto por Laemmli (1970) usando geles separadores (acrilamida-bisacrilamida 12,0% (Tabla 5) en *buffer* de gel separador pH 8,8 (Tabla 6) y geles concentradores (acrilamida-bisacrilamida 4,0% en *buffer* de gel concentrador pH 6,8 (Tabla 5). Las muestras se disolvieron en *buffer* de muestra a pH 6,8 (Tabla 9). Para obtener condiciones reductoras se agregó 5% de 2-mercaptoetanol (2-ME) a dicho *buffer* y se calentó un minuto en baño a ebullición. Las corridas se realizaron con *buffer* de corrida (Tabla 8) a pH 8,3, a una corriente constante de 30 mA por gel durante aproximadamente 45 minutos (BIO-RAD, Miniprotean Tetra Cell). Se utilizaron los siguientes patrones de peso molecular: fosforilasa b (94 kDa); albúmina sérica bovina (67 kDa); ovoalbúmina (45 kDa); anhidrasa carbónica (30 kDa); inhibidor de tripsina (20,1 kDa); α -lactoalbúmina (14,4 kDa), (LWM - Pharmacia). Los geles se fijaron y se tiñeron con una solución de colorante Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0,1% en agua/metanol/ácido acético (5:5:2) (v/v/v) durante 2 horas y decolorados con una solución de agua: etanol: ácido acético (13:5:2) (v/v/v). Luego, los geles fueron fotografiados y las imágenes analizadas con el software ImageJ V1.51j8 (Schneider *et al.*, 2012).

Tabla 5. Composición del buffer concentrador (4X)

Reactivos	Cantidad
TRIS BASE	3 g
SDS	0,2 g
Agua destilada	50 mL (volumen final)

Llevar a pH 6,8 con HCl concentrado

Tabla 6. Composición del buffer separador (4X)

Reactivos	Cantidad
TRIS BASE	27,2 g
SDS	0,6 g
Agua destilada	150 mL (volumen final)

Llevar a pH 8,8 con HCl concentrado

Tabla 7. Composición de gel de poliacrilamida SDS-PAGE para 2 geles

	Gel Concentrador 4 % p/v	Gel Separador 12% p/v
Buffer (4X)	1 mL	3 mL
Agua	2,48 mL	4,33 mL
Acrilamida (30,8%)	0,52 mL	4,67 mL
TEMED	4 μ L	12 μ L
Persulfato de amonio (10%)	50 μ L	60 μ L

TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina

Tabla 8. Composición de buffer de electrodo para SDS-PAGE

Reactivos	Cantidad
Glicina	14,4 g
TRIS-base	3 g
SDS	1 g

Llevar a pH=8.3 con HCl cc.

Volumen final 1000 mL

Tabla 9. Composición buffer de muestra 4X

Reactivos	Cantidad
Buffer de gel concentrador	4 mL
Agua destilada	4 ml

Azul de bromofenol: punta de espátula

3.4.1 Tinción con nitrato de plata

Cuando fuera necesario, se realizó una tinción con nitrato plata para aumentar la sensibilidad (Blum *et al.*, 1987). En una primera etapa, los geles fueron lavados tres veces con etanol al 50% (v/v) durante 20 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo el tratamiento previo (Tabla 10) durante 1 minuto en condiciones de oscuridad.

Tabla 10. Composición del tratamiento previo para 1 gel

Reactivos	Cantidad
Tiosulfato de sodio (50%)	10 uL
Agua destilada	25 mL

Se procedió al enjuague con agua destilada 3 veces durante 20 segundos. Finalizado el enjuague, se sumergieron los geles en la solución colorante (Tabla 11) por 20 minutos con agitación orbital.

Tabla 11. Composición de la solución colorante para 1 gel

Reactivos	Cantidad
Nitrato de plata	0,05 g
Formaldehído (37%)	20 uL
Agua destilada	25 mL

Luego se procedió al enjuague con agua destilada 3 veces durante 20 segundos y finalmente los geles fueron embebidos en la solución de revelado (Tabla 12) según tiempo de aparición de nuevas bandas de proteínas en las calles.

Tabla 12. Composición de la solución revelado para 1 gel

Reactivos	Cantidad
Carbonato de sodio	1,5 g
Formaldehído (37%)	20 uL
Tiosulfato de sodio (10%)	1 uL
Agua destilada	25 mL

Una vez visualizadas las bandas de proteínas se agrega la solución stop (Tabla 13) por 10 minutos.

Tabla 13. Composición de la solución stop para 1 gel

Reactivos	1 gel
Metanol	10 mL
Ácido acético	2,4 mL
Agua destilada	7,6 mL

Por último, los geles se someten a una solución de lavado (Tabla 14) por 20 minutos.

Tabla 14. Composición de la solución lavado para 1 gel

Reactivos	1 gel
Metanol	5 mL
Agua destilada	20 mL

4. Caracterización del Aislado Enzimático (AEB)

4.1. Actividad proteolítica

Se utilizó la misma metodología de los ítems 3.2.1, 3.2.3 y 3.2.3 para los tres sustratos proteicos.

4.2. Electroforesis SDS-PAGE y tinción con plata

Se utilizó la misma metodología de los ítems 3.4 y 3.4.1.

4.3. Determinación de los puntos isoeléctricos(pI) por isoelectroenfoque (IEF)

El perfil proteico de las muestras se determinó basándose en los valores de los puntos isoeléctricos (pI), utilizando la técnica de isoelectroenfoque con una Mini IEF Cell, Mod. 111 (Bio-Rad). Las muestras fueron concentradas y desionizadas mediante precipitación con

cuatro volúmenes de acetona a 0 °C durante 30 minutos. Después de centrifugar a 16000 x g, se descartó el sobrenadante, y el precipitado resultante se redissolvió con la cantidad suficiente de agua bidestilada para obtener una concentración de proteína de 1 mg/mL. En el caso de muestras con baja concentración proteica, se realizaron sucesivas precipitaciones en el mismo tubo para alcanzar la concentración final deseada. El IEF se llevó a cabo bajo condiciones de voltaje constante en un proceso escalonado: 100 V durante 15 minutos, 200 V durante 15 minutos y 450 V durante 60 minutos. Posteriormente, los geles fueron fijados y teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250.

Se prepararon los geles utilizando una película plástica (Polyacrylamide Gel Support Film, Bio-Rad) sobre una superficie de vidrio, asegurando el contacto mediante una gota de agua. Luego, este conjunto se colocó sobre la bandeja con el vidrio orientado hacia arriba y la película hacia abajo.

La composición del gel fue de acrilamida-bisacrilamida (25 %T, 3 %C), glicerol (5,1 mL al 87 % en 24,9 mL de agua bidestilada), anfolitos (Pharmalyte, 3-10) y agua bidestilada (Tabla 15). Se utilizaron los siguientes estándares de anfolitos según pI de las proteínas: amiloglucosidasa (pI: 3,50); inhibidor de la tripsina (pI: 4,55); β -lactoglobulina A (pI: 5,20), anhidrasa carbónica B (bovina) (pI: 5,85); anhidrasa carbónica B (humana) (pI: 6,55); mioglobina (banda ácida) (pI: 6,85); mioglobina (banda básica) (pI: 7,35); lental lecitina (ácida) (pI: 8,15); lental lecitina (media) (pI: 8,45); lental lecitina (básica) (pI: 8,65); tripsógeno (pI: 9,30). Para determinar los valores de pI se confeccionó una curva de calibración, graficando los pIs de las proteínas patrones en función de la distancia recorrida por las mismas en el gel.

Tabla 15. Composición del gel de IEF para 2 geles

Reactivos	Cantidad
Acrilamida-bisacrilamida (25 %T, 3% C)	2 mL
Glicerol (25% p/v)	2 mL
Anfolitos (Pharmalyte 3-10)	0,5 mL
Agua bidestilada	5,5 mL

%T: proporción relativa de acrilamida, %C: proporción relativa de bisacrilamida

Una vez polimerizado el gel, se dejó escurrir el agua remanente y se sembraron las muestras (5 a 10 μ L), permitiendo la difusión de las mismas dentro del gel durante 5 minutos. El IEF se llevó a cabo en tres etapas sucesivas: 15 minutos a 100 V, 15 minutos a 200 V y 60 minutos a 450 V. Una vez finalizada la corrida, el gel unido a su soporte y separado de la placa de vidrio, fue sumergido durante 30 minutos en una solución fijadora (Tabla 16), coloreado (Tabla 17) durante 2 h, y luego decolorado por lavados sucesivos con solución decolorante I (Tabla 18), y solución decolorante II (Tabla 19), hasta la obtención de un fondo incoloro.

Tabla 16. Composición de solución fijadora

Reactivos	Cantidad
Ácido sulfosalicílico	4 g
Metanol	30 mL
Ácido tricloroacético	12,5 g
Agua c.s.p.	1000 mL

c.s.p: cantidad suficiente de agua que se agrega

para llegar al volumen deseado

Tabla 17. Composición de solución colorante

Reactivos	Cantidad
Ácido acético glacial	10 mL
Etanol	27 mL
Coomassie brilliant blue R-250	40 mg
Sulfato cúprico	500 mg
Agua c.s.p.	100 mL

c.s.p: cantidad suficiente de agua que se agrega para llegar al volumen deseado

Tabla 18. Composición de solución decolorante I

Reactivos	Cantidad
Ácido acético glacial	7 mL
Etanol	12 mL
Sulfato cúprico	500 mg
Agua destilada	100 mL

Tabla 19. Composición de solución decolorante II

Reactivos	Cantidad
Ácido acético glacial	7 mL
Etanol	12 mL
Agua destilada	100 mL

4.4 Zimograma: actividad gelatinolítica

Se realizó la zimografía, descrita por Hames (1981) con ligeras modificaciones. Al AEB se le agregó *buffer* muestra SDS sin agentes reductores y se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12 % copolimerizados con 1,5 mg/mL de gelatina. A continuación, los geles se lavaron dos veces durante 30 minutos en Triton X-100 al 2,5% (v/v) para eliminar el SDS y luego se incubaron en *buffer* activador (fósfato de sodio 0,1 M, pH 7,0 con cisteína 15 mM) a 37 °C durante 18 horas. Despues de la incubación, los geles se tiñeron con azul de Coomassie brilliant blue R-250 durante dos horas y luego se destiñeron siguiendo el mismo

procedimiento mencionado para SDS-PAGE. La presencia de actividad gelatinolítica se comprobó mediante bandas claras sobre un fondo azul uniforme.

4.5 Determinación de K_M y V_{Max} del Aislado Enzimático

En enzimas de comportamiento michaeliano se considera a la K_M como una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato y V_{max} es una velocidad inicial que representa la máxima eficiencia catalítica de una enzima frente a un sustrato, a una dada concentración de enzima y determinadas condiciones de reacción (Lehninger, 2004).

Se determinaron parámetros cinéticos obteniendo la constante K_M de Michaelis-Menten, la velocidad máxima de reacción V_{max} y la reacción específica V_{max}/K_M para azocaseína y hemoglobina (Corzo *et al.*, 2012).

Se midió la velocidad de la actividad enzimática del AE a diferentes concentraciones del sustrato azocaseína (0,156-5 g/L) y hemoglobina (0,0412-3,5 g/L). Una vez obtenida cada curva con un comportamiento que se aproxima a la representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten, se linealizó la misma a través del método de la doble recíproca (Lineweaver y Burk, 1934).

4.6 Identificación del tipo de sitio catalítico: actividad proteolítica en presencia de inhibidores de grupo.

Los AEB se incubaron con diferentes inhibidores de proteasa específicos como E-64 (L-trans-epoxisuccinil-leucilamida-(4-guanidin) butano, 1 mM), pepstatina A (1 mM), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, 10 mM) y PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 10 mM). Se mezcló un volumen igual de cada solución inhibidora con el AE y se preincubó durante 30 minutos a 37 °C. Después de la incubación, se midió la actividad proteolítica (ítem 2.3.2). Los inhibidores PMSF y pepstatina A se disolvieron en etanol mientras que EDTA y E-64 se disolvieron en agua destilada. Los blancos contenían el extracto enzimático e inhibidor que se utilizarían como controles. La actividad enzimática residual se informa en porcentaje (%) considerando el 100 % de actividad cuando el AEB se realizó en ausencia de inhibidores.

*5. Determinación de las condiciones óptimas para medir la actividad proteolítica de los extractos de *Bromelia serra**

5.1 Tiempo de reacción

Con el objeto de identificar el tiempo más apropiado para evaluar la actividad proteolítica del AEB, se estudió la acción sobre la azocaseína mediante el método mencionado en el ítem 3.2.2, deteniendo la reacción en diversos momentos (en minutos). Se define el intervalo óptimo como aquel en el cual la generación de productos exhibe una relación directamente proporcional con el tiempo transcurrido.

5.2 Perfil de pH

Se evaluó el pH óptimo sobre la actividad enzimática del AEB en un rango de pH de 2,7 a 10 en diferentes *buffers*: 0,1 M formiato-fórmico (pH 2,7-4,7), acetato (pH 5-6), fosfato (pH 7), Tris (pH 8) y carbonato (pH 9-10) con el sustrato hemoglobina. También se emplearon soluciones 25 mM de los siguientes *buffers*: MES, MOPS, TAPS, AMPSO y CAPS (pH 5,75, 6,15, 7,5 7,9, 8,2, 9, 9,3, 9,8 ,11 y 11,75) con caseína como sustrato (Good y Izawa, 1972).

5.3 Temperatura óptima

Se midió la actividad proteolítica en baños termostáticos de agua (modelo MASSON, Vicking) a temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60 70 y 80°C según ítem 3.3.2. Luego se detuvo la reacción y se midió la actividad residual. Los AEB y la azocaseína como sustrato se preincubaron durante 5 minutos a la temperatura definida antes de la reacción.

5.4. Estabilidad térmica

Con el objetivo de conocer la estabilidad térmica de las proteasas presentes en *BS*, se determinó la actividad enzimática luego de pre-incubar el extracto proteolítico a 5, 10, 15, 20, 40 y 60 minutos a diferentes temperaturas: 37, 45, 60, 75, 85 y 98°C.

5.5 Efecto de la concentración de cisteína

Debido a que las Bromeliaceae suelen tener peptidasas con grupos sulfhidrilos, se determinó la concentración adecuada de cisteína para favorecer la actividad enzimática. Para determinar la concentración óptima de cisteína en la mezcla de reacción, para que las enzimas muestren su máxima actividad, se realizó una prueba de actividad proteolítica (ítem 2.3.2) preparando tubos con diferentes concentraciones de cisteína (0, 5, 15, 25, 35 y 50 mM).

5.6 Efecto del NaCl sobre la actividad enzimática.

La actividad proteolítica de AEB se analizó en presencia de cloruro de sodio en concentraciones finales de 0, 0,4, 0,8, 1,2 y 2,5 M. Los resultados se presentan como porcentaje relativo a la actividad proteolítica, utilizando como sustrato azocaseína, observada en ausencia de NaCl (100% de actividad).

5.7 Actividad enzimática sobre sustratos sintéticos

Se evaluó la actividad enzimática del AEB utilizando sustratos sintéticos derivados de N- α -carbobenzoxy-p-nitrofenil, ésteres de diversos L-aminoácidos, de acuerdo con la metodología de Silverstein (1974) con adaptaciones. Estos sustratos presentan los grupos α -NH₂ y α -COOH bloqueados, siendo este último unido a un cromóforo que facilita la evaluación de la actividad endoesterásica con respecto al aminoácido que contribuye al grupo carboxilo. Se utilizaron derivados de alanina (Ala), arginina (Arg), asparagina (Asn), ácido aspartico (Asp), glutamina (Gln), glicina (Gly), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), fenilalanina (Phe), prolina (Pro), triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y valina (Val). La prueba se llevó a cabo a 37 °C, registrando la progresión de la reacción mediante lecturas de absorbancia a 405 nm cada 6 segundos durante 6 minutos. La actividad del AEB sobre cada sustrato se expresó como una aproximación de la velocidad inicial (pendiente de la curva de absorbancia vs. tiempo) y se comparó con su correspondiente control (Tabla 20).

Tabla 20. Ensayo de actividad sobre N- α -carbobenzoxy-p-nitrofenil ésteres de L-aminoácidos

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

Lectura (Infinite Pro M200-TECAN) de Abs 405 nm cada 6 segundos
durante 6 minutos

6. Separación cromatográficas por exclusión molecular (CEM)

La cromatografía es un método de separación muy utilizado, que permite la separación de los componentes químicos de mezclas complejas. En el caso de la cromatografía de exclusión molecular (CEM) el fraccionamiento se basa en el tamaño molecular. Las columnas de separación están formadas por pequeñas partículas de sílice o polímeros que contienen una red de poros, donde pueden difundirse las moléculas. Mientras están en los poros, las moléculas están atrapadas de manera efectiva y son eliminadas del flujo de la fase móvil. El tiempo de residencia medio de las moléculas del analito depende de su tamaño efectivo. Una de las aplicaciones de este método es la determinación rápida de la distribución de la masa molecular de polímeros grandes.

En este estudio, se emplearon geles comerciales Sephadex G-75 superfino que separa proteínas en el rango de 70- 3 kDa (GE Healthcare). El Sephadex es un polímero fuertemente hidrofílico que se hincha considerablemente en agua: por lo tanto, antes del armado de la columna, el gel debe hidratarse completamente.

Se llenó una columna de vidrio (1 cm x 85 cm) con el gel y se equilibró con 400 ml de *buffer* fosfato 0,1 M a pH 7,0 manteniendo un caudal de 0,250 mL/min. Luego se sembró el AE (0,5 mL) al gel Sephadex G-75 y las proteínas eluyeron con el mismo *buffer*. Las fracciones proteicas cromatográficas se midieron a 280 nm y se ensayó la actividad proteolítica con azocaseína (ítem 3.2.2) y electroforesis (ítem 3.4.1).

7. Separación cromatográficas rápida de proteínas en medio líquido (FPLC) por intercambio aniónico

La cromatografía de intercambio iónico permite la separación de moléculas en base a su carga eléctrica. En este caso, la fase estacionaria es un intercambiador de iones que lleva en su superficie cargas electrostáticas fijas, a las cuales se van a unir de forma reversible moléculas con carga opuesta. La separación mediante intercambiadores se realiza en dos fases: en la primera las moléculas a separar se unen al intercambiador utilizando condiciones que originan una unión fuerte y estable; a continuación, se eluye de la columna con *buffers* de diferentes pH o diferente fuerza iónica, lográndose una competencia entre los componentes del *buffer* con las moléculas por los sitios de unión.

En este capítulo la cromatografía de intercambio se realizó en una columna (Pharmacia XK 16/40, con adaptadores AK16) empaquetada con 5 mL de Q-Sepharose High Performance (Pharmacia) y equilibrada con *buffer* Tris-HCl 50 mM (pH 8,5) a 20 °C. Después de lavar la columna con el mismo *buffer*, se cargó el AE en la columna (0,5 mL) y las proteínas eluyeron con gradiente salino (165 mL de cloruro de sodio entre 0,00 y 0,1 M). Se midió la absorbancia de las fracciones proteicas a 280 nm utilizando el lector del ÄKTA Purifier 10, y se ensayó la actividad proteolítica con azocaseína (ítem 2.3.2) y electroforesis (ítem 2.4.1).

8. Análisis estadístico

Los datos representan la media ± desviación estándar (DE) de al menos cuatro réplicas. La significación estadística se probó mediante ANOVA unidireccional y Tukey y los valores de $p<0,05$ se consideraron significativos. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software InfoStat v. 2020 (Di Rienzo *et al.*, 2020).

Resultados

1. Concentración proteica y actividad proteolítica

Durante un período de dos años (2018 y 2019), se recolectaron hojas de la especie *Bromelia serra* en cuatro estaciones del año. Tras analizar el contenido de proteínas y la actividad proteolítica utilizando azocaseína como sustrato, no se observaron diferencias significativas (Tabla 21).

Tabla 21. Contenido de proteínas y actividad específica en AE de *Bromelia serra* (AEB) en diferentes estaciones del año

Estación del año	Proteína (mg/mL)	Actividad Específica - Azocaseína (U/mg)
Verano	1,48±0,01 a	3,58±0,51 a
Otoño	1,51±0,02 a	3,57±0,52 a
Invierno	1,53±0,03 a	3,60±0,45 a
Primavera	1,52±0,02 a	3,59±0,48 a

Promedio \pm desvío estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

2. Estabilidad de la actividad enzimática durante la preservación de hojas de BS, AEB y ECB

Se evaluó la estabilidad a -20°C tanto de las hojas de BS como ECB, con muestreo cada 1 mes (Fig. 3a) y también la estabilidad de la actividad enzimática los AEB a 4°C y -20°C y ECB, inicialmente 1 vez cada 24 horas durante 10 días y luego a los 15, 30, 60 y 90 días (Fig. 3b). Si bien se realizó un análisis estadístico para determinar si existían diferencias estadísticas entre ECB preparados partiendo de órganos de hojas de BS a diferentes meses, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$). Los promedios de los ECB a partir de hojas obtenidos de preparados en diferentes meses oscilaron en valores de absorbancia a 440nm de 0,10 a 0,12 (Fig. 3a).

En cuanto a la estabilidad de la actividad enzimática, se observa mayor actividad proteolítica de los AEB con respecto a los ECB. Comparando estadísticamente los AEB almacenados a 4° y AEB -20°C solo se detectó diferencia significativa en el día 6 ($p < 0,05$), manteniéndose constante la actividad proteolítica durante los 90 días de ensayo. Los ECB (Fig. 3b) mostraron diferencias significativas en la preservación de los extractos a los 4°C y -20°C , obteniendo mayor actividad el ECB a -20°C en todos los tiempos analizados mediante actividad proteolítica (ítem 3.3.2)

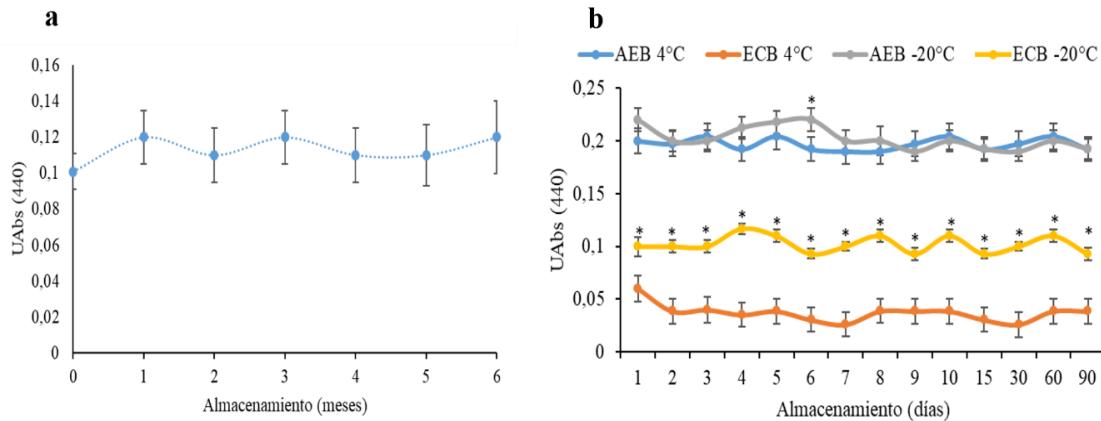


Figura 3. Preservación en el almacenamiento a -20 °C de hojas (líneas punteadas) de *Bromelia serra* (ECB) cada 30 días (a). Estabilidad en el almacenamiento de AEB y ECB (4° y -20°C) durante 3 meses. La actividad proteolítica se determinó con azocaseína a pH 7 a 37 °C por 30 minutos. Las barras representan la desviación estándar (n=4). * indican diferencias significativas con respecto a los AEB -20°C con AEB 4° y ECB a -20°C con ECB 4°C ($p < 0,05$) (b).

3. Caracterización del ECB y AEB

3.1 Concentración de proteínas y actividad enzimática

Las pruebas de actividad proteolítica de los extractos de *B. serra* se llevaron a cabo utilizando varios sustratos: azocaseína, caseína y hemoglobina (Tabla 22). El uso de acetona y etanol como agentes precipitantes aumentó siete veces el contenido de proteína en comparación con el ECB debido a que se redissolvió el pellet en 4 mL. Además, se detectó un aumento en la actividad específica (hemoglobina, azocaseína, caseína) de 2 a 3 veces en los aislados enzimáticos, lo que sugiere la presencia de proteínas sin actividad proteolítica en el EC. Por otra parte, se observó una mayor actividad de los precipitados acetónicos (AEAB) en comparación con los precipitados etanólicos (AEEB). En base a estos resultados, se decidió utilizar el material resuspendido en acetona como aislado enzimático (AEB) para su caracterización.

Tabla 22. Contenido de proteínas y actividad específica en extracto crudo y aislado enzimático (AE) de hojas de *Bromelia serra* utilizando como sustratos hemoglobina, azocaseína y caseína.

Muestra	Proteína (mg/mL)	Actividad Específica - Hemoglobina (U/mg)	Actividad Específica - Azocaseína (U/mg)	Actividad enzimática - Caseína (Ucas/mg)
Extracto crudo (ECB)	0,23±0,02 b	1,1±0,02 c	3,57±0,52 c	0,014±0,001 a
Aislado Enzimático con Acetona (AEAB)	1,6±0,22 a	3,5±0,07 a	10,65±1,42 a	0,032±0,002 b
Aislado Enzimático con Etanol (AEEB)	1,7±0,22 a	3,3±0,05 b	09,70±0,55 b	0,030±0,002 b

Promedio ± desvío estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05)

3.2 Electroforesis SDS-PAGE, Zimograma e Isoelectroenfoque de ECB y AEB

El perfil polipeptídico del EC y AE de *Bromelia serra* se muestra en la Figura 4a. El ECB mostró principalmente 3 bandas proteicas de pesos moleculares de 22, 43 y 62 kDa en condiciones no reductoras (Fig. 4a, calle 2). El AE en condiciones no reductoras (sin 2-mercaptoetanol) mostró polipéptidos de alto peso molecular por encima de 67 kDa, polipéptidos de 50 y 40 kDa y polipéptidos por debajo de 20 kDa (Fig. 4a, calle 3). En condiciones reductoras (con 2-mercaptoetanol) los AEB exhibieron bandas de polipéptidos de 60, 45, 21 y 23 kDa (Fig. 4a, calle 4). La desaparición de las bandas de polipeptidos de alto peso molecular y el aumento de la definición bandas por debajo de 20 kDa con 2-mercaptoetanol (Fig. 4, calle 4) puede deberse a la presencia de uniones disulfuro en los

polipéptidos. La actividad gelatinolítica se observa en la Figura 4b. La zona clara o blanca, entre 94 y 67 kDa, en la zimografía de AE indica que hubo degradación de la gelatina provocada por la actividad hidrolítica (sobre el fondo gris). El isoelectroenfoque (IEF) del AE mostró proteínas con pI entre 4,55 y 8,15 y una banda predominante de 5,85 (Fig. 4c, calle 1).

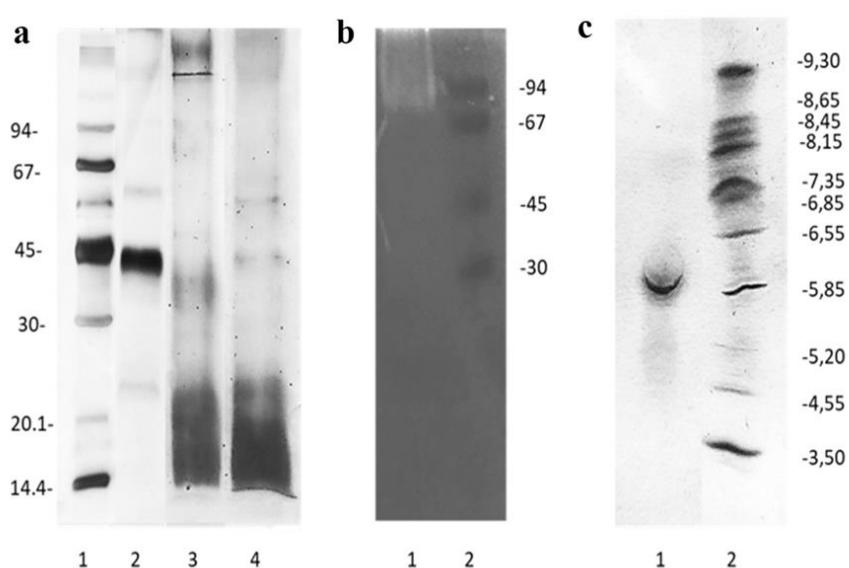


Figura 4. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE-SDS). Calle 1: patrones de peso molecular; calle 2: ECB; calle 3: AEB; calle 4: AEB con 2-mercptoetanol (a). Zimografía. Calle 1: AE; calle 2: marcadores de proteínas estándar (b). IEF. Calle 1, aislado enzimático de BS; calle 2, marcadores pI: amiloglucosidasa (pI 3,50), inhibidor de tripsina (pI 4,55), b-lactoglobulina A (pI 5,20), anhidrasa carbónica II (pI 5,85), anhidrasa carbónica I (pI 6,55), mioglobina (pI 6,85 y 7,35), lectinas de *Lens culinaris* (pI 8,15, 8,45 y 8,65) y tripsinógeno (pI 9,30) (c).

3.3 Determinación de K_M y V_{Max} del AE

Los parámetros cinéticos para la azocaseína y la hemoglobina se determinaron mediante la obtención de la constante de Michaelis-Menten (K_M), la velocidad máxima de reacción (V_{max}) y la relación específica entre V_{max} y K_M .

La velocidad de la actividad enzimática del AEB se midió a diferentes concentraciones de los sustratos azocaseína (0,156-5 g/L) y hemoglobina (0,0412-3,5 g/L). Una vez obtenida la curva que exhibe un comportamiento que se asemeja a la representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten (Fig. 5), se procedió a linealizarla utilizando el método de la doble recíproca, obteniendo la Figura 6. A partir de la ecuación de la recta (Fig. 5), se calculó la concentración de los sustratos de 1/s cuando 1/velocidad es igual a 0. A partir del valor de 1/s, se determinaron los valores cinéticos para azocaseína: K_M (0,81 g/L o 0,034 mM), V_{max} (0,0037) y hemoglobina: K_M (0,13 g/L o 0,0021 mM), V_{max} (0,0159). En la Figura 6 se señalizan con flechas azules cada uno de los valores cinéticos tanto para azocaseína (Fig. 5a) y hemoglobina (Fig. 5b).

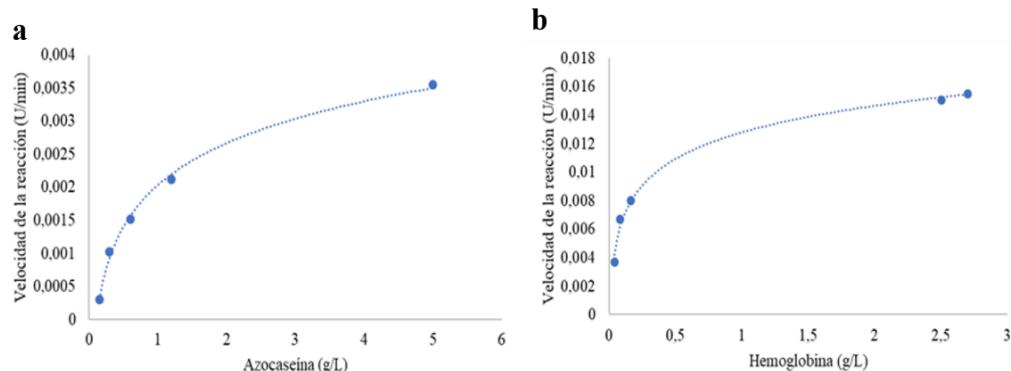


Figura 5. Velocidad de la reacción enzimática en función de la concentración del sustrato. Azocaseína (a), Hemoglobina (b).

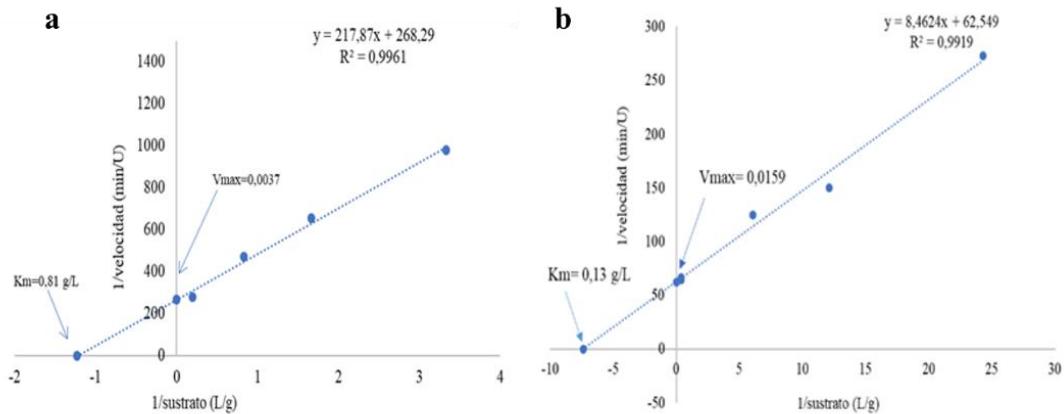


Figura 6. Linealización de la velocidad de la reacción enzimática en función de la concentración del sustrato de azocaseína (a) y hemoglobina (b).

3.4 Identificación del tipo de sitio catalítico: actividad proteolítica en presencia de inhibidores de grupo

Los inhibidores utilizados fueron EDTA, E-64 (Fig. 8), PMSF y pepstatina A (Fig. 7) para metaloproteasas, cisteína proteasa, serina proteasas y aspártico proteasas respectivamente. En comparación con el control (sin inhibidores), el AEB fue inhibido significativamente por la pepstatina A (50%) y E-64 (15%). Sin embargo, EDTA y PMSF no inhibieron la actividad proteasa en comparación con el control ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren la presencia de aspártico y cisteína proteasas.

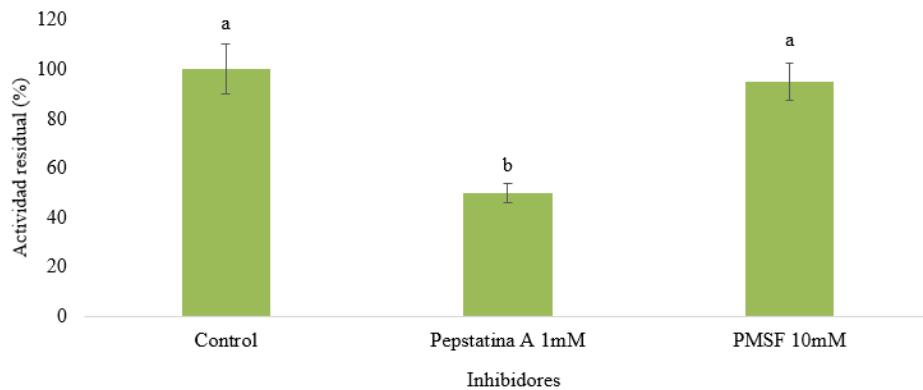


Figura 7. Efecto de los inhibidores pepstatina A y PMSF sobre AEB. Las barras representan la desviación estándar (n=4). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$).

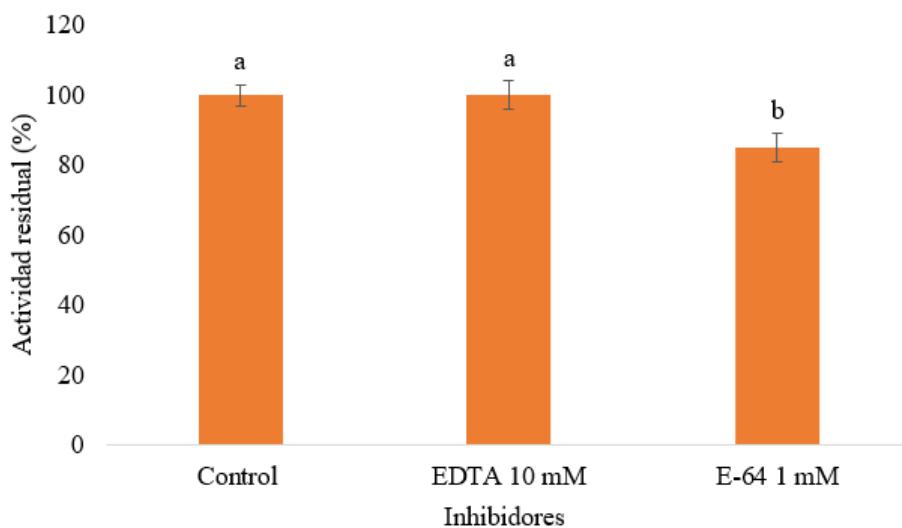


Figura 8. Efecto de los inhibidores EDTA y E-64 sobre AEB. Las barras representan la desviación estándar (n=4). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$).

*4. Determinación de las condiciones óptimas para medir la actividad proteolítica de los extractos de *Bromelia serra**

4.1 Tiempo de reacción

Se estudió el intervalo de tiempo apropiado para la evaluación de la actividad proteolítica con azocaseína. Se midieron las absorbancias a 440 nm en función del tiempo, identificando la región lineal en la cual la liberación de productos tiene una relación directamente proporcional con el tiempo. Al realizar la prueba de dicha actividad en distintos tiempos, se observó una correlación lineal entre la absorbancia a 440 nm y el tiempo en el rango de 0 a 30 minutos, (Fig. 9) ya que al realizar la medición a 45 minutos de incubación a 37°C se perdió la linealidad de la actividad proteolítica. Por lo tanto, un tiempo dentro de este intervalo sería óptimo para medir la actividad proteolítica de AEB sobre azocaseína.

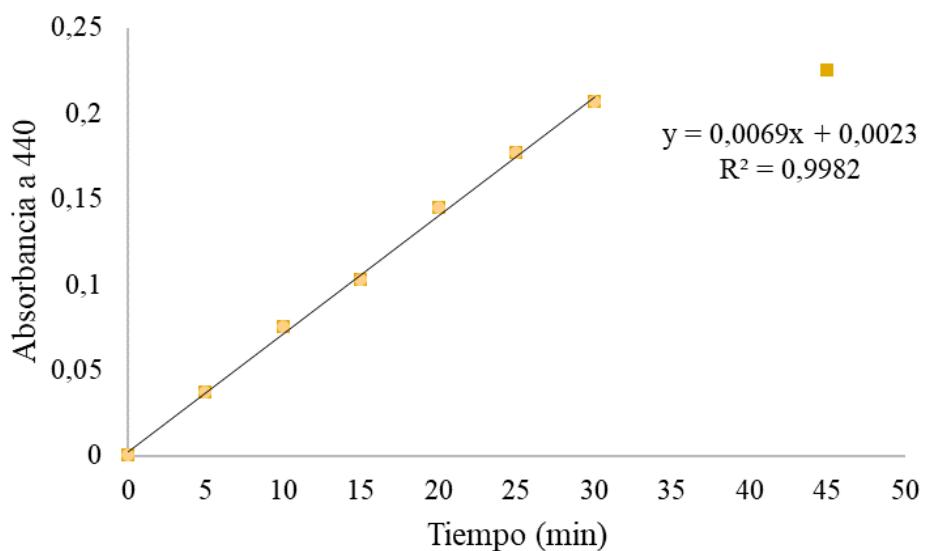


Figura 9. Actividad proteolítica con azocaseína del AE de hojas de *Bromelia serra* en función al tiempo de reacción. Cada punto del grafico representa el promedio de absorbancias a 440 nm (n=3) repeticiones.

4.2 Efecto de la concentración de cisteína

Considerando que las proteasas cisteínicas alcanzan su máxima actividad proteolítica en presencia de un medio reductor, se llevó a cabo una evaluación de la actividad proteolítica (ítem 3.3.2) en función de concentraciones creciente de cisteína. La incorporación de 5 Mm

al AEB de cisteína provocó un notable aumento del 80% en la actividad proteolítica (ítem 3.2.2) respecto al AEB sin cisteína (Fig. 10). No obstante, a medida que incrementó la concentración de cisteína, la actividad mostró variaciones aleatorias, lo que sugiere la posible existencia de múltiples sitios catalíticos en el AEB.

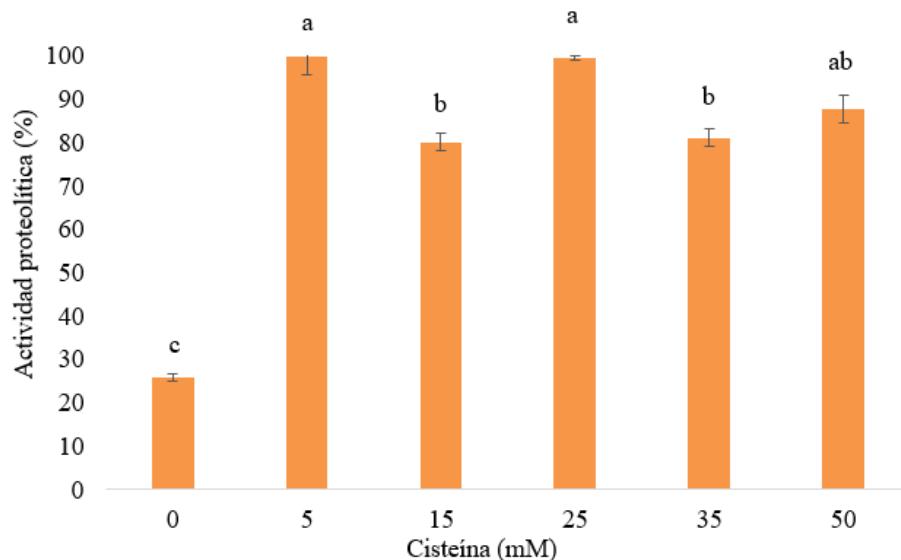


Figura 10. Efecto de la cisteína sobre la actividad enzimática del AE. Las barras representan la desviación estándar (n=4). Letras distintas indican diferencias significativas entre temperaturas ($p<0,05$).

4.3 Perfil de pH

4.3.1 Actividad proteolítica con hemoglobina

En la Figura 11 se muestra el efecto del pH sobre AE en un rango de pH de 2,7 a 10 usando hemoglobina como sustrato. La actividad enzimática más alta se encontró entre pH 3,7 a 4,1 con 5,6 U/mL (3,5 U/mg). A medida que aumentó el pH, la actividad disminuyó significativamente a 1,3 U/ml (0,8 U/mg) a pH 9, y a pH 10, no quedó actividad remanente. Cabe mencionar que con un aumento de 0,6 unidades de pH (4,1 a 4,7) la actividad remanente fue inferior al 50% respecto a las más altas.

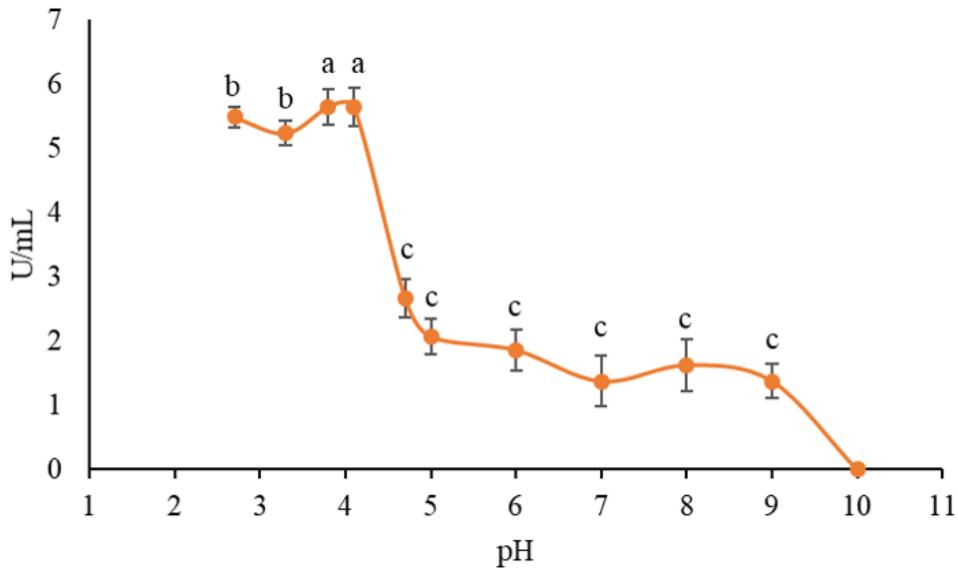


Figura 11. Actividad proteolítica utilizando como sustrato hemoglobina expresado en U/mL del AE de *Bromelia serra* en función del pH. Las barras representan la desviación estándar (n=4).

4.3.2 Actividad proteolítica con caseína

En la Figura 12 se muestra el efecto del pH sobre AE en un rango de 5,75 a 11,7 usando caseína como sustrato. La máxima actividad enzimática estuvo en pH 6 (0.2 Ucas) y a medida que aumentó el pH la actividad disminuyó significativamente ($p<0,05$). A pH 7,5 el AE solo mantuvo el 50% de la actividad máxima y en pH 12 hubo una pérdida total de actividad.

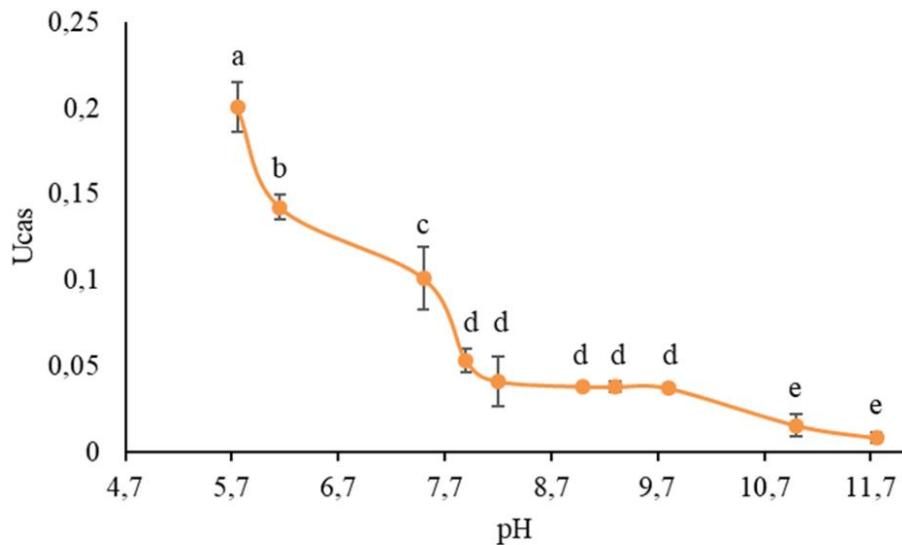


Figura 12. Actividad caseinolítica expresado en Ucas del AE de *Bromelia serra* en función del pH. Las barras representan la desviación estándar (n=4).

4.4 Temperatura

Como se puede observar en la Figura 13, la actividad proteolítica óptima para el AE fue a 60 °C. Se encontró una disminución significativa a temperaturas más altas (80°C), presentando solo el 55% de actividad residual.

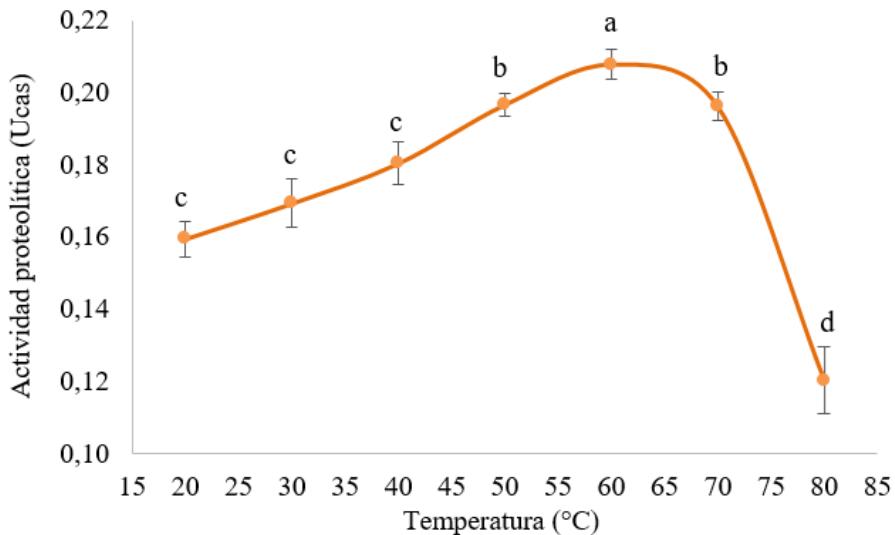


Figura 13. Efecto de la temperatura sobre el AE de *Bromelia serra*. Las barras representan la desviación estándar ($n=4$). Letras distintas indican diferencias significativas entre temperaturas ($p<0,05$)

4.4.1 Estabilidad térmica de AE

La estabilidad térmica del AE se muestra en la Figura 14. El extracto retuvo más del 97% de la actividad proteolítica después de la incubación a una temperatura de 37-60 °C durante 60 min. A medida que aumentó la temperatura, la observo la perdida de actividad proteolítica alcanzando el 47% de actividad proteolítica residual a 98 °C a 60 minutos. Se distingue una tendencia a mantener el 100% de la actividad residual con los tratamientos 37, 45 y 60°C durante los 60 minutos de preincubación. Mientras que la actividad residual mostró una tendencia a disminuir la actividad residual con los tratamientos 75, 85 y 98°C.

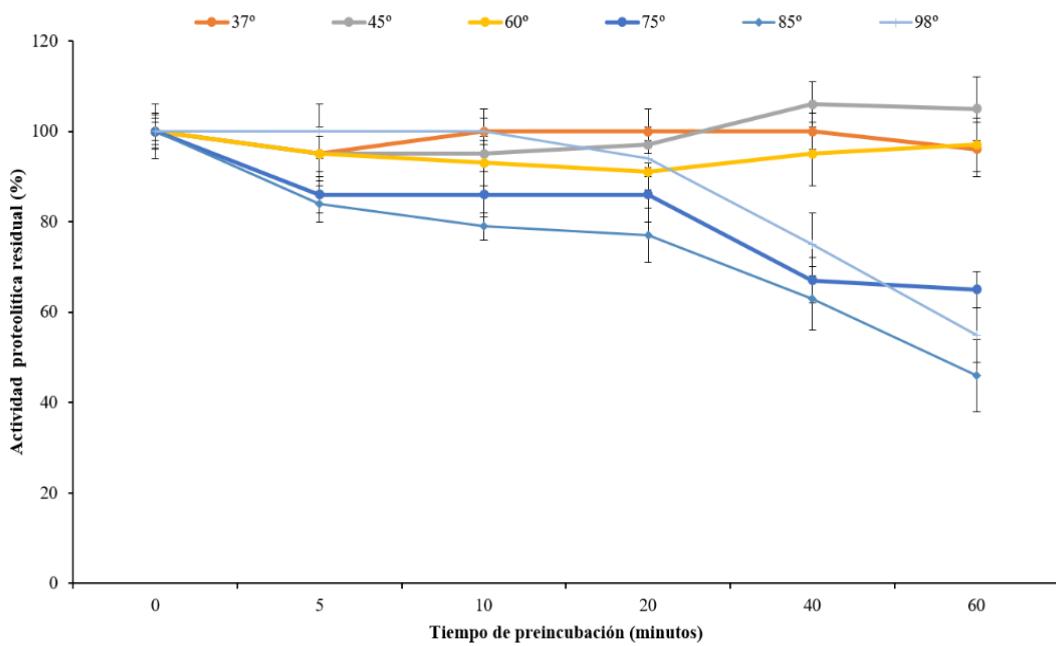


Figura 14. Estabilidad enzimática del AE de *Bromelia serra*, preincubada a temperaturas de 37°C a 98°C desde 0 a 60 minutos. Las barras representan la desviación estándar (n=4).

4.5 Efecto del NaCl

La estabilidad de la actividad proteolítica en un medio salino se muestra en la Figura 15. En presencia de NaCl 0,4 M, el AEB conservó el 65% de la actividad. A medida que aumentó la concentración de sal, la actividad disminuyó por debajo del 40% y se inactivó con una concentración de 2,5 M de NaCl.

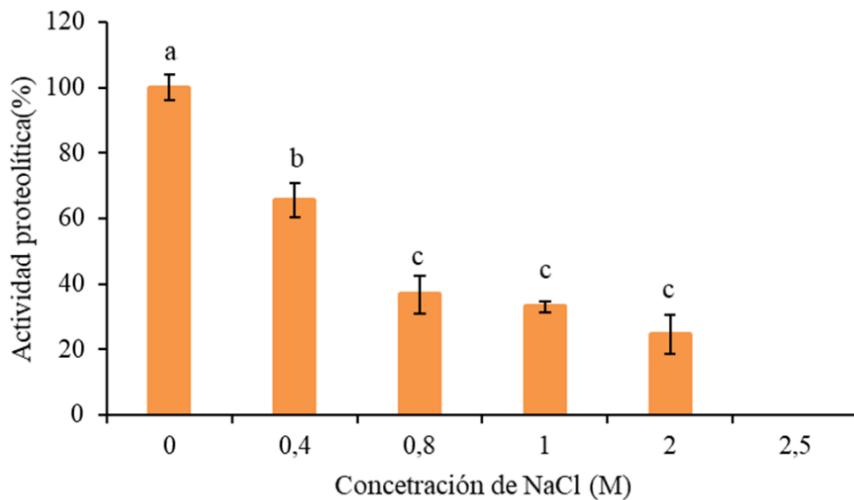


Figura 15. Efecto del NaCl sobre la actividad proteolítica del AE de *Bromelia serra* utilizando como sustrato a la azocaseína. Las barras representan la desviación estándar (n=4).

5. Actividad enzimática sobre sustratos sintéticos

En cuanto a la actividad esterásica sobre ésteres de L-aminoácidos del N- α -carbobenzoxy-p-nitrofenilo se observó que el AE de *Bromelia serra* presentó la actividad más alta (100 %) sobre el derivado de Ala, siguiendo con los derivados de Phe (89%), Gly y Tyr (80%), Leu (24 %) y Val (11,6 %) (Fig. 16).

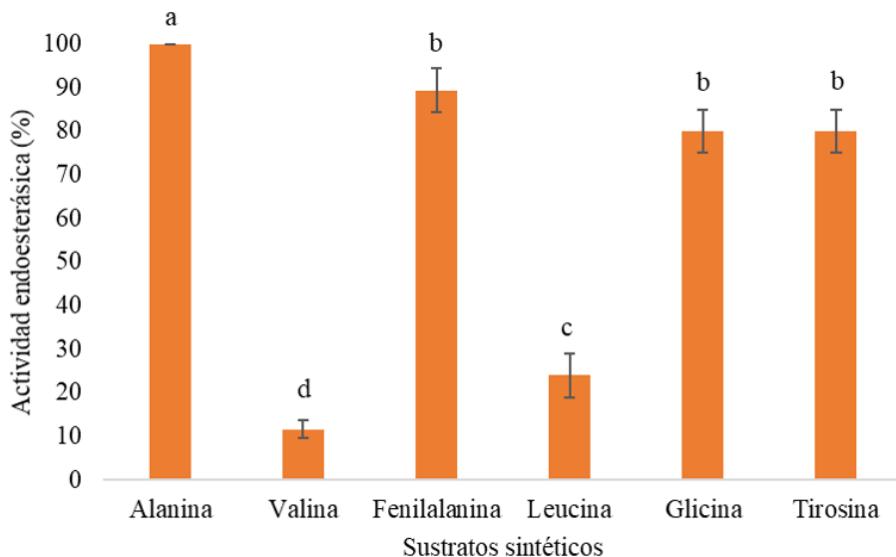


Figura 16. Actividad del AE de *Bromelia serra* frente a sustratos N- α -CBZ-p-nitrofenil ésteres de L-aminoácidos. Las barras representan la desviación estándar (n=4).

6. Cromatografía de exclusión molecular

Como se muestra en el cromatograma Figura 17, el AEB aplicado al gel Sephadex G-75 presentó 1 pico y 4 fracciones con baja actividad proteolítica.

En la electroforesis SDS-PAGE (Inserto de la Fig. 17) en condiciones no reductoras la fracción no retenida (F1), mostró tres bandas de proteína intensas por encima de 94 kDa y una débil a aproximadamente a 94 kDa, y otra a 54 kDa (Inserto de la Fig. 17, calle 2). La fracción II (FII) presentó una banda a 54 kDa (Fig. 17 calle 3). La fracción III (FIII) reveló al menos dos bandas intensas de polipéptidos de 29 y 32 kDa (Inserto de la Fig. 17, calle 4) y la fracción IV (FIV) mostró una banda de polipeptidos a 21 kDa.

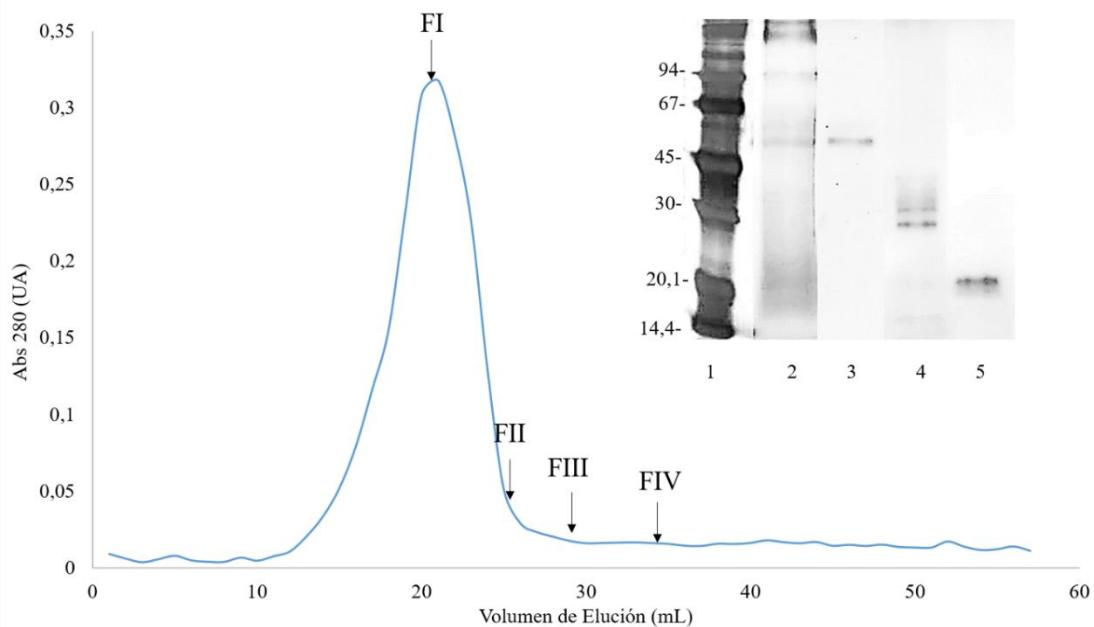


Figura 17. Cromatografía de exclusión molecular con Sephadex G-75 del AEB. Se recogieron fracciones de 0,5 ml a un caudal de 0,250 ml/min y se cuantificaron a 280 nm. Las flechas indican actividad proteolítica en la fracción I (FI), II (FII), III (FIII) y IV (FIV). Inserto en la Fig. 17 (SDS-PAGE) Fracciones con actividad proteolítica FI (calle 2), FII (calle 3), FIII (calle 4), FIV (calle 5) y el estándar de peso molecular (calle 1).

7. Cromatografía de intercambio aniónico

El perfil de elución de AE en la cromatografía de intercambio aniónico (Q-Sepharose High Performance) (Fig. 18) muestra tres picos con actividad proteolítica, usando caseína como sustrato: FI (0,016 Ucas/mL), FII (0,0029 Ucas/mL) y FIII (0,0029 Ucas/mL). La electroforesis SDS-PAGE en condiciones no reductoras de los tres picos cromatográficos mostró varias bandas proteicas; indicando que no hay una purificación clara (Fig. 18). En la fracción no retenida (FI), se pudo observar con bandas de polipeptidos con pesos moleculares de 14, 20, 30, 33, 40, 49, 63 y 89 kDa (Inserto de la Fig. 18). En la primera fracción retenida (FII) eluyeron polipeptidos con bandas intensas de 34 y 40 kDa y otras de menor intensidad en 21, 31 y 37 kDa (Inserto de la Fig. 18, calle 3). En la última fracción retenida (FIII), si bien no se pudieron observar bandas bien definidas, como en la FII, se lograron distinguir bandas con pesos moleculares de 16, 23, 27, 36, 41, 54 y 71 kDa (Inserto de la Fig. 18, calle 4).

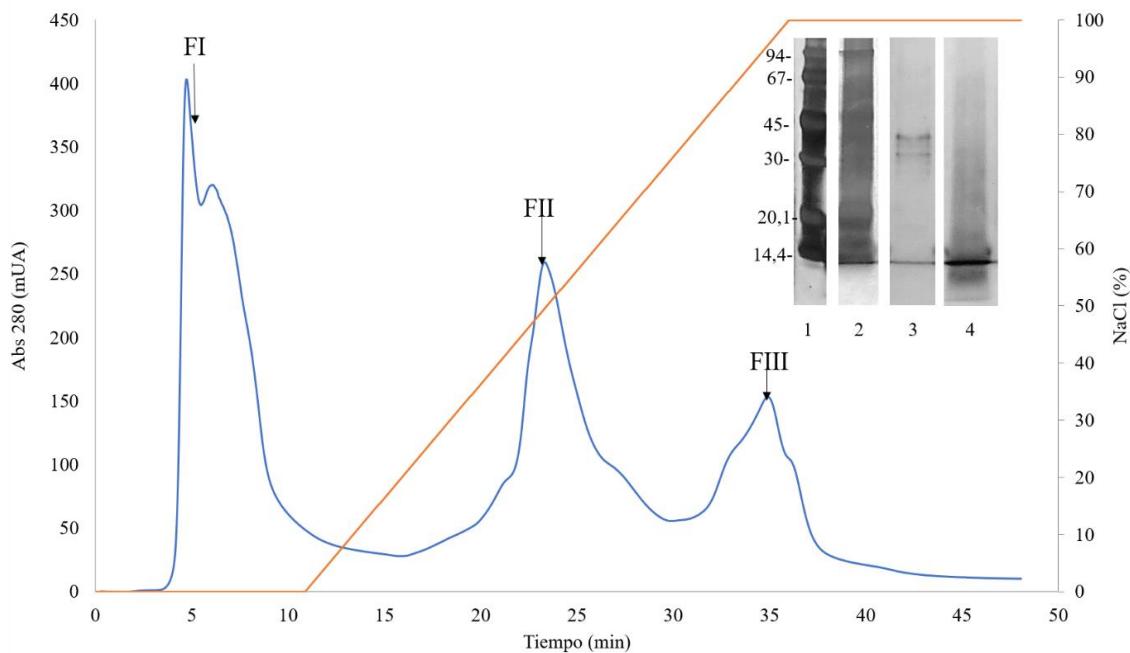


Figura 18. Cromatografía de intercambio aniónico (Q-Sepharose High Performance) del AE de *Bromelia serra*. Diámetro de la columna: 1,6 cm; *buffer* inicial: Tris-HCl 50 mM, pH 8,5; gradiente de elución salina: 165 ml de 0,0 a 0,1 M de cloruro de sodio en el *buffer* inicial. Caudal, 1,0 ml $^{-1}$ min. Las flechas indican actividad proteolítica en la fracción no retenida (FI) y en las fracciones retenidas (FII y FIII). Inserto en la Fig. 18 (SDS-PAGE). Fracciones con actividad proteolítica FI (calle 2), FII (calle 3), FIII (calle 4), FIV y el estándar de peso molecular (calle 1).

Discusión

1. Actividad proteolítica según sustrato utilizado

La actividad específica utilizando caseína como sustrato de la AEB fue menor en comparación con otros frutos de Bromeliaceae (Pardo *et al.*, 2000; Bruno *et al.*, 2008; Payrol *et al.*, 2008), mientras que la actividad con hemoglobina fue similar a las reportadas por Moreno-Hernández *et al.* (2017) en los extractos de *Bromelia pinguin*. La actividad de bromelina aislada de residuos de cáscara de ananá (Bresolin *et al.*, 2013) extraída para aplicación terapéutica y probada con azocaseína fue menor que la actividad presentada en este estudio.

2. Electroforesis SDS-PAGE y Zimografía

El ECB solo mostró tres polipeptidos predominantes, siendo el de mayor interés el de 22 kDa (Fig. 4a, calle 2) ya que la mayoría de las proteasas de frutos de Bromeliaceae encontradas hasta ahora tienen un rango de peso molecular de 20 a 23 kDa (Natalucci *et al.*, 1995; Bruno *et al.*, 2006; Payrol *et al.*, 2008). Además, se pudo observar que en condiciones reductoras el AEB (Fig. 4a, calle 4) se observaron 2 proteínas de 21 y 23 kDa, las cuales podrían corresponderse a las encontradas en el ECB (Fig. 4a, calle 2). En la electroforesis SDS-PAGE (Fig. 4a, calle 4), se puede observar que la presencia de un agente reductor, como el 2-mercaptopetanol, el cual rompe los enlaces disulfuro de la estructura de la proteína, por lo que podría ser la posible causa de que se encuentren polipéptidos de menor peso molecular (Walsh, 2002). En extractos estudiados de *Bromelia serra* en frutos (Salese, 2023) encontró una banda mayoritaria de proteína correspondiente a valores de pesos molecular alrededor de 27-28 kDa, también en menor medida mostró la presencia de una segunda banda de aproximadamente 33 kDa.

En cuanto a la zimografía (Fig. 4b, calle 1) en este estudio solo se observó una proteína a la altura de los 94 kDa con actividad gelatinolítica. Estudios previos de frutos de *Bromelia karatas* encontraron actividad hidrolítica en zimogramas de proteasas en el rango de altos pesos moleculares (Meza-Espinoza *et al.*, 2018) y Villanueva-Alonso *et al.* (2019) encontraron 40 zonas claras en un zimograma bidimensional con pesos moleculares aparentes entre 27 y 290 kDa, que potencialmente representan proteasas.

3. Isoelectroenfoque

En el AEB, la banda mayoritaria fue en el pI de 5,85 y con bandas proteicas que variaron de 4,44 a 8,15, lo cual sugiere que en esta especie existe una gran diversidad de isoformas de las proteínas que van desde acidas a alcalinas. En el primer estudio en frutos de *Bromelia serra*, Caffini *et al.*, (1988) aislaron una endopeptidasa con un pI superior a 8. En estudios más recientes de extractos de frutos de *Bromelia serra* (Salese, 2023), encontró 7 bandas

proteicas mayoritarias según IEF (8,45; 8,65; 8,15; 6; 5; 4,5 y 3,5), de las cuales las bandas de mayor intensidad fueron las de pI 8,15, 6 y 3,5. En el caso de frutos de otras especies de Bromeliaceae, como *Bromelia hieronymi* y *Bromelia balansae*, los pI variaron de 5,45 a 9,3 (Pardo *et al.*, 2000; Bruno *et al.*, 2002), respectivamente. Tanto en AEB de este estudio y en frutos de *Bromelia serra* (Salese, 2023), se encontraron proteínas más acídicas que en el resto de otras especies de Bromeliaceae.

4. Identificación del tipo de sitio catalítico: actividad proteolítica en presencia de inhibidores de grupo.

En nuestro estudio, en el AEB se detectaron proteasas cisteínicas y aspárticas. Mientras que en extractos de frutos de *Bromelia serra* (Salese, 2023) se detectaron proteasas del tipo cisteínicas, obteniendo una actividad residual de solo 16% en presencia de inhibidores de proteasas del tipo cisteínicas. Moreno-Hernández *et al.* (2017) detectaron estas proteasas cisteínicas y aspárticas en extractos de *Bromelia pinguin* al igual que en el presente estudio. Dutta y Bhattacharyya (2013) encontraron de manera similar múltiples proteasas en el extracto de hoja de *Ananas comosus*. Las cisteíno proteasas de Bromeliaceae tienen pesos moleculares de 20 a 25 kDa, por lo que la banda proteica de 23 kDa del ECB de este estudio podría pertenecer a la familia de las cisteíno proteasas (Fig. 4a, calle 2).

Las proteasas aspárticas son ampliamente investigadas por sus propiedades de coagulación de la leche, especialmente en Asteraceae por la actividad encontrada en sus flores (Vioque *et al.*, 2000). También hay reportes de pI de proteasas aspárticas que van de 3 a 4,5, lo que sugiere que las proteínas ácidas encontradas en este trabajo de IEF podrían estar asociadas con este tipo de proteasas (Yegin y Dekker, 2013). Las proteasas aspárticas de *Solanum tuberosum* mostraron actividad antimicrobiana contra patógenos de la papa y actividad citotóxica contra patógenos de plantas y espermatozoides. Estas proteínas son capaces de unirse a la superficie de las células microbianas y provocar cambios en el flujo de iones desde la membrana plasmática, provocando la muerte celular (Mendieta *et al.*, 2006).

5. Determinación de K_M del AEB

En este estudio el K_M para azocaseína fue de 0,034 mM y hemoglobina de 0,0021 mM. El K_M define la afinidad de una enzima por un sustrato, siendo un valor más pequeño indicación de una mayor afinidad de la enzima al sustrato (Sudo, 1995). En el estudio realizado por Corzo et al. (2012), se observó que la bromelina obtenida directamente a partir del extracto de frutos, sin someterse a un proceso de purificación previa, mostró un valor K_M para azocaseína de 0,037 mM. El valor obtenido por Corzo et al. (2012) resultó ser similar al observado para la bromelina extraída de las hojas de *B. serra*. Aunque en este estudio no se encontraron únicamente proteasas cisteínicas en cuanto al tipo de sitio catalítico, se podría decir que existe una tendencia a obtener valores parecidos en cuanto a K_M , probablemente debido a la semejanza de proteasas cisteínicas obtenidas a partir de especies de Bromeliaceae. En el caso del K_M con la hemoglobina obtenido en este estudio (0,0021 mM), su valor fue menor que la con la azocaseína, demostrando que las enzimas en el extracto de *Bromelia serra* son más afines al sustrato hemoglobina probablemente debido a la composición y/o conformación de este sustrato proteico. En el estudio de los extractos de bromelina de fruto realizado por Corzo et al. (2012), se encontró un valor calculado de K_M de 0,165 mM. Este valor resulta significativamente mayor en comparación con el extracto analizado en el presente estudio. Esto podría atribuirse a una mayor afinidad al sustrato de hemoglobina por parte de las proteasas aspárticas detectadas en las hojas de *B. serra*.

*6. Determinación de las condiciones óptimas para medir la actividad proteolítica de los extractos de *Bromelia serra**

6.1 Efecto de la cisteína sobre el AEB

Luego se estudió el efecto de la concentración de cisteína sobre la actividad de AEB. La concentración de cisteína más baja utilizada (5 mM) aumentó la actividad del extracto en un 80% (con respecto a 0 mM) y al aumentar la concentración, se observó una variación aleatoria en la respuesta de la actividad proteolítica. Salese (2023), demostró que la adición de cisteína aumentó en un 46% la actividad de las proteasas de frutos de *B. serra* con una concentración mínima de 5 mM y que concentraciones mayores no mostraron diferencias significativas con respecto al aumento de la actividad de la catálisis. Por otro lado, Payrol et al. (2005) agregaron concentraciones crecientes de cisteína en extractos de *B. pinguin*, y la actividad

aumentó proporcionalmente. La adición de la cisteína a las peptidasas con grupos sulfhidrilos evita la oxidación del sitio catalítico favoreciendo la actividad proteolítica (Negishi & Ozawa, 2000). En este caso la mínima concentración de 5 mM cumple la función de crear un ambiente reductor para mejorar la actividad de las proteasas.

6.2 Perfil de pH de la actividad proteolítica del AEB

La dependencia del pH de la actividad proteolítica de AEB en medio ácido podría estar sugiriendo la presencia de proteasas aspárticas y en medio neutro debido a las cisteína proteasas. Caffini et al. (1988) evaluaron la dependencia del pH de la actividad en frutos *Bromelia serra*, en un rango de 6 a 11, encontrando la mayor actividad proteolítica a pH 6. En estudios más recientes (Salese, 2023), el rango de pH de mayor actividad caseinolítica de los extractos crudos de *Bromelia serra* fue entre 6,3-9,0 (80%) con el pH óptimo a 6,3 (100%). Mientras que en este estudio la mayor actividad (AEB) se vio en el valor de pH 5,75 y luego disminuyó abruptamente al aumentar el pH del medio por encima de 6,15. Moreno-Hernández et al. (2017) encontraron la mayor actividad a pH 2 con 3,2 U/mg en frutos de *Bromelia pinguin* utilizando hemoglobina como sustrato. La alta actividad proteolítica en condiciones ácidas puede ser útil como posible propiedad antibacteriana para bacterias acidófilas como *Aliciclobacillus* spp. que están relacionados con el deterioro de productos industriales como jugos y bebidas de cítricos y no se inactivan con tratamientos térmicos (dos Anjos et al., 2016).

6.3 Efecto de la temperatura sobre el aislado enzimático

El óptimo de actividad proteolítica (AEB) fue de 60°C, lo cual concuerda con los hallazgos de Caffini et al. (1988) para extractos de frutos de la misma especie. La temperatura influye prácticamente en todos los aspectos de una reacción bioquímica, incluida la ionización de enzima y sustrato dependiente del pH, cambios conformacionales de enzimas, oligomerización de proteínas, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, estados de transición, etc. Los cambios conformacionales en la conformación tridimensional de las proteínas pueden conducir a un aumento de la actividad enzimática (Purich, 2010).

6.3.1. Estabilidad térmica de los aislados enzimáticos

En nuestro estudio de estabilidad térmica, luego de pre-incubar a 98°C durante 60 minutos el AEB conservó el 47 % de actividad residual. Las proteasas de frutos encontradas en *Bromelia pinguin* (Payrol *et al.*, 2005) también conservaron una alta actividad proteolítica (80 %) a 55°C durante el mismo tiempo de incubación. Conservar el 47% de actividad proteolítica residual a 98 °C podría deberse a la presencia de otras proteínas en el extracto que desempeñan un papel protector a altas temperaturas (Priolo *et al.*, 2000) y/o enzimas con características estructurales como el enlace disulfuro que las hace termoestables (Sharma *et al.*, 2019). Otra posible explicación al alto porcentaje de actividad de actividad residual durante 60 minutos a 98°C es la presencia de mucilago, la cual es frecuente en hojas de la familia de las Bromeliaceae ya que representa un rasgo característico para el almacenamiento de agua ante periodos de escasez de agua, el cual podría funcionar también como protector de la actividad enzimática al tener la propiedad de adherirse a enzimas (Ballego-Campos *et al.*, 2023; Monteiro *et al.*, 2011).

Por otro lado, Caffini *et al.* (1988), encontraron que las proteasas en extractos de frutos de *Bromelia serra* tenían un 10% de actividad residual al incubarlas a 65 °C durante 60 min. Según Dumorne *et al.* (2017), las aplicaciones de proteasas termoestables (60–80 °C) son útiles en: los detergentes industria, hidrólisis parcial en tecnología alimentaria (piensos, cervecería y panificación), farmacéutica y biotecnología.

6.4 Efecto de NaCl en la actividad enzimática

La concentración salina del medio es uno de los aspectos a considerar cuando se estudia la actividad de una enzima, cuando la misma tiene una aplicación en procesos biotecnológicos. En presencia de NaCl 0,4 M, el AEB conservó el 65% de la actividad y se inactivó con una concentración de 2,5 M de NaCl. Vallés *et al.* (2007) encontraron que concentraciones bajas de cloruro de sodio (0,4 M) no afectaron la actividad caseinolítica, pero disminuyeron con el aumento de la concentración de sal en frutos de *Bromelia antiacantha* (28% de la actividad

residual en NaCl 2,5 M). La fuerza iónica del AEB y su capacidad de ser inactivado con bajos valores de sal es de gran importancia en la industria alimentaria debido a la posibilidad de ser utilizado como ablandador de carne o como coagulante de leche.

7. Actividad enzimática sobre sustratos sintéticos

Utilizando el AE de hojas de *Bromelia serra* se pudieron encontrar diferencias con respecto a la actividad endoesterásica entre hojas y frutos. En el caso de las hojas solo se detectó actividad con Alanina, Fenilalanina, Glicina, Tirosina, Leucina y Valina. Mientras que estudios realizados en frutos de *Bromelia serra* realizado por Salese (2023), además de encontrar actividad en estos sustratos los detectó en Arginina, Asparagina, Glutamina, Isoleucina, Lisina, Prolina y Triptófano. Si bien, Salese (2023) también encontró mayor preferencia con Alanina al igual que Bruno, 2007 con *Bromelia hieronymi*, en este estudio para el resto de los sustratos sintéticos la afinidad medida en porcentaje fue diferente, como es el caso de la gran afinidad por la Fenilalanina en este estudio. Los sustratos que se utilizaron son derivados de diversos aminoácidos, por lo que la actividad endoesterásica puede deberse a la diferencia en la composición de enzimas en el AEB de hoja como o por los diferentes sitios catalíticos que poseen las enzimas. Bruno et al. (2008) al purificar enzimas en *Bromelia hieronymi*, observó que la Alanina fue el derivado preferido en el caso de hieronymaína I y II, seguido de Glicina y Ácido aspártico, respectivamente; por el contrario, hieronymaína III escindió preferentemente el derivado Lisina, seguido del Alanina, un comportamiento muy común dentro proteasas vegetales cisteínicas. Las diferencias de especificidad frente a la unión peptídica para su clivaje son estudios imprescindibles para la utilización de enzimas como herramientas biotecnológicas específicas; en el caso de hidrolizados para la industria alimentaria, si se conoce la especificidad de escisión de la proteasa es posible predecir qué péptidos pueden liberarse durante la hidrólisis y de esa manera obtener diferentes propiedades funcionales (Bruno et al., 2008).

8. Cromatografía de exclusión molecular

Una de las proteínas con alto peso molecular (94 kDa) de esta la fracción II (Fig. 17) podría ser la enzima con actividad gelatinolítica observada en el zimograma (Fig. 4b, calle 1).

Además, los polipéptidos presentes en la fracción II y IV (Fig. 17) también se observaron en los perfiles electroforéticos en condiciones no reductoras de ECB y AEB (Fig. 4a, calles 2 y 3). Caffinni et al. (1988), también utilizó la técnica de separación de cromatografía de exclusión molecular con Sephadex G-75, encontrando una pequeña fracción activa (A280: 0,5 UA-unidades de absorbancia) sin atribución a un PM específico. En varios estudios se han informado bandas de proteínas similares a las del FIV (Fig. 17) en proteasas de Bromeliaceae, lo que podría sugerir la presencia de cisteíno proteasas en esta fracción.

9. Cromatografía de intercambio aniónico

En estudios recientes (Salese, 2023), utilizó una columna de intercambio aniónico a pH 8,9 logrando retener cinco proteínas ácidas presentes en los extractos de frutos de *Bromelia serra*, mientras que a pH 6 eluyó de la columna aquellos polipéptidos de pI 6, 5,2 y 5 y mejoró la obtención del esquema para retener las proteasas de pI más ácido. Así, mediante IEF, la autora, observó en una fracción una banda única de pI menor a 3,5 a la cual se le determinó la huella peptídica por espectrometría de masas. En el presente estudio se encontró una gran variedad de proteínas según el SDS-PAGE en las tres fracciones de la columna Q-Sepharosa, si bien todas presentaron actividad caseinolítica, no se logró aislar enzimas específicas.

Conclusiones parciales

Se llevó a cabo una caracterización de proteasas vegetales utilizando como base el extracto de hojas de *Bromelia serra*, con el propósito de analizar sus propiedades y compararlas con un extracto de fruta previamente documentado. En este estudio fue demostrada que las concentraciones de proteínas y actividad enzimática obtenida a partir de hojas no varía según las estaciones del año.

Un hallazgo significativo fue el aumento considerable, de 2 a 3 veces, de la actividad proteolítica de los extractos de *Bromelia serra* al emplear la precipitación con acetona. Aunque también utilizando etanol se pueden obtener actividades proteolíticas semejantes.

A través de diversos métodos de separación como la cromatografía de exclusión molecular, se logró aislar dos enzimas proteolíticas con pesos moleculares distintos de 21 y 54 kDa, si bien se destaca la necesidad de estudios adicionales de espectrometría de masas para identificar con precisión estas enzimas purificadas.

Teniendo en cuenta que los AEB de hojas de *Bromelia serra* están compuesta con proteasas cisteínicas y aspárticas con proteínas de diferentes pesos moleculares e isoformas, resulta complicado inferir a partir de las cromatografías realizadas y bibliografía previa, qué proteasas se relacionan a un PM y pI específico. También se debe tener en cuenta que la posible presencia del mucilago dificulta su purificación previa a las cromatografías.

En cuanto a su comportamiento bajo diferentes condiciones, se observó que el AEB presentó actividad en un rango de pH de 2,7 a 7, mostrando una preferencia marcada en pH ácidos. Además, se evidenció una alta estabilidad térmica en los AEB obteniendo un 47% de actividad residual luego de pre incubar por una hora a 98°C. Además, alcanzó su máxima actividad proteolítica a una temperatura de 60°C. No obstante, se destaca la fácil desactivación del AEB frente al efecto de NaCl, lo que señala una sensibilidad particular de estas enzimas a las condiciones de alta salinidad. Considerando estas características y aprovechando la abundante disponibilidad de hojas de *Bromelia serra*, el AEB se posiciona como una fuente prometedora para su aplicación como catalizador industrial, abriendo posibilidades en el ámbito de la biotecnología y la producción sostenible. Sin embargo, es necesario seguir estudiando en profundidad al AE, teniendo en cuenta las dificultades presentadas en este estudio.

Capítulo III

**Efecto del estrés hídrico sobre los órganos
de *Ananas comosus* L. Merr y su relación
con los contenidos de proteasas cisteínicas**

Introducción

El ananá, *Ananas comosus* (L.) Merr., es la única especie de la familia de las Bromeliaceae que se cultiva comercialmente por su fruto. Su producción se realiza tanto en los trópicos como en los subtrópicos (Botella y Smith, 2008). Las diferentes especies de la familia de las Bromeliaceae son nativas de América del Sur, más concretamente, de una amplia zona que abarca los países de Brasil, el norte de la Argentina y Paraguay. La concentración de las especies en esta región no excluye una propagación más amplia de especies salvajes de ananá, que podría llegar hasta Venezuela. El intercambio entre tribus de las frutas más interesantes para el consumo podría haber favorecido su progresiva difusión hacia la América peninsular y el Caribe (Hossain, 2016).

El ananá es una planta tropical que puede crecer en la mayoría de los climas cálidos con temperaturas entre 20 y 36°C, pero el clima templado y fresco en invierno mejora la calidad de la fruta e induce la floración, sin embargo, las bajas temperaturas afectan el crecimiento de las plantas, registrándose reducciones importantes del crecimiento con temperaturas por debajo de 16°C media diaria y las heladas generan daños irreversibles (Carvalho *et al.*, 2005). En relación con el requerimiento hídrico, y si bien se reconocen a las plantas de ananá como tolerantes al estrés hídrico, éstas responden muy bien a precipitaciones de 1000 a 1500 mm/año (Salerno y González, 2008) bien distribuidas.

En cuanto a los co-productos del cultivo, el centro de la fruta representa el 15% del descarte de la fruta, la cual contiene la más alta concentración de Bromelina a comparación de la cáscara y corona (Tochi *et al.*, 2008).

Bromelina es el nombre colectivo de enzimas proteolíticas relacionadas que se encuentran en los tejidos de las especies pertenecientes a la familia Bromeliaceae, de los cuales el ananá (*Ananas comosus*) es el más conocido. Se reconocen dos tipos distintos de bromelina de la piña: bromelina del tallo (CE 3.4.22.32) y la bromelina de la fruta (CE 3.4.22.33), siendo ambas cisteíno proteasas (Maurer, 2001). La bromelina de tallo es la proteasa predominante (90%) en los extractos provenientes del mismo, la cual se halla presente junto a otras dos

peptidasas que se encuentran en menor cantidad, ananaína y comosaína (Harrach *et al.*, 1998).

La secuencia aminoacídica completa de la bromelina del tallo (212 aminoácidos) ha sido deducida por Ritonja *et al.* (1989) y corresponde a una única cadena polipeptídica glicosilada con un PM informado que varía entre 26 y 37 kDa (Suh *et al.*, 1992) y un punto isoeléctrico (pI) de 9,55 (Murachi y Takahashi, 1970). Contiene siete residuos de cisteína (Napper *et al.*, 1994; Harrach *et al.*, 1998) y tres puentes disulfuro.

Esta enzima se encuentra dentro de las denominadas proteasas sulfhidrílicas o cisteína endopeptidasas cuya actividad depende del grupo tiol del residuo de cisteína localizado en el sitio activo de la enzima. Por ello, para expresar su máxima actividad la bromelina requiere la presencia de agentes reductores, tales como cisteína. El rango de pH de actividad óptimo está entre 4,00 y 7,00 y depende tanto de la naturaleza del sustrato empleado, tipo y concentración del buffer y de la presencia o no de agentes reductores (Rowan y Buttle, 1994). La bromelina del tallo hidroliza una gran variedad de sustratos naturales y sintéticos mostrando condiciones óptimas de temperatura y pH variables. La azocaseína, caseína y la hemoglobina son los sustratos naturales más utilizados para esta proteasa (Bala y Babagana, 2016). Además, se demostró la alta especificidad y sensibilidad que tiene dicha enzima de hidrolizar el sustrato α -N-CBZ-L-lisin-p-nitrofenil éster (LNPE) (Silverstein, 1974). La acumulación de enzimas proteolíticas, como la bromelina, se presenta en diferentes especies de la familia de las Bromeliaceae. La más estudiada por su uso comercial es la del *Ananas comosus*, donde estas enzimas se almacenan en grandes cantidades en el tallo, de allí su importancia ya que en la cosecha del cultivo los mismos son residuos que podrían ser aprovechados para su extracción. Se puede observar en la Figura 19, la distribución y acumulación de la bromelina en el tallo según la edad de las plantas de ananá.

Las cisteína proteasas son actores clave en una cultivar de procesos, incluido el crecimiento, el desarrollo, las respuestas al estrés y defensa (Balakireva y Zamyatnin, 2018). Además, existen antecedentes que demuestran que ante condiciones de estrés hídrico se estimula la expresión de genes que codifican para la transcripción de cisteína proteasas en *Arabidopsis*

thaliana (Grudkowska *et al.*, 2004), lo cual podría favorecer a un aumento en el contenido de enzimas proteolíticas en la planta.

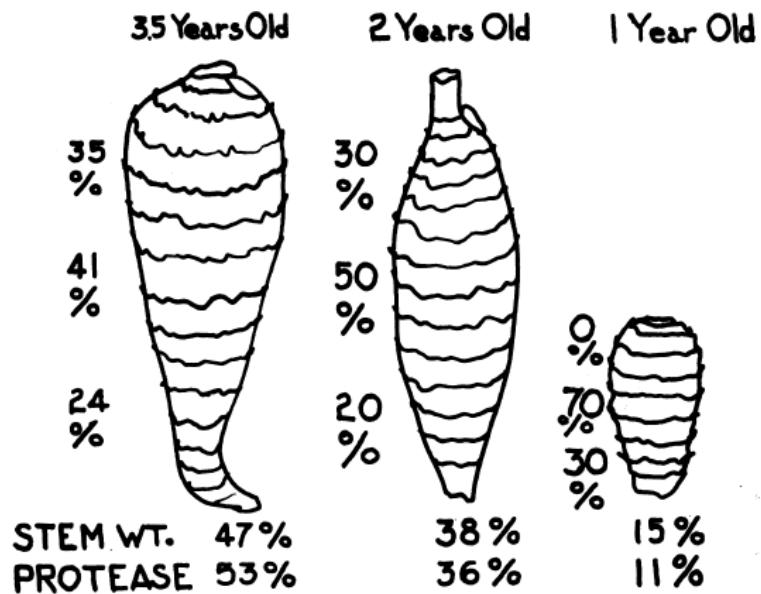


Figura 19. Distribución de bromelina en varias porciones de tallos plantas de ananá maduras al año, 2 años y 3 años y medio. Obtenida de Heinicke y W. A. Gortner (1957).

Por lo antedicho, el objetivo de este capítulo es estudiar el comportamiento de proteasas cisteínicas de *Ananas comosus* L. Merr bajo distintas condiciones de estrés hídrico.

Materiales y métodos

1. Material vegetal y tratamientos de estrés hídrico

Se utilizaron plantas de *Ananas comosus* (AC) cultivar Cayena lisa implantadas en macetas bajo condiciones controladas en invernadero en el Campo Didáctico Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes de un año de edad. Las plantas se sometieron a tres tratamientos que se corresponden con distintos contenidos de agua en el sustrato: capacidad de campo (CC), 50% y 25% y teniendo

en cuenta el método gravimétrico utilizado por Suassa et al. (2012) para establecer los 3 tratamientos a capacidad hídrica constante según cada tratamiento. Se consideró como 100% el volumen de agua a regar para llegar a CC, luego para el tratamiento 50% se suministró solo la mitad del volumen de agua de CC y para el último tratamiento (25%) se agregó un cuarto de la cantidad de agua de CC. El control de la humedad del sustrato se realizó mediante un sensor Tester TFA (Qualitäts-Erzeugnis, Alemania). Se realizaron las determinaciones en dos órganos de las plantas: tallos y hojas, con cuatro repeticiones y cada treinta días durante 3 meses (agosto, septiembre y octubre) repetido en 2 años (2019 y 2022). El diseño experimental fue completamente al azar, siendo la unidad experimental la planta.

2. Registro climático-temperatura promedio, máxima y mínima

Se registraron las temperaturas máxima, media y mínima dentro del invernáculo con termohigrómetro digital (DAF-10 Data-Logger, Schwyz, China).

3. Determinación de contenido relativo de agua (CRA) de las hojas

Se tomaron porciones de 2cm² de la parte media de 2 hojas “D” en cada momento de muestreo con 3 repeticiones por muestreo para determinar el estado hídrico de la planta en cada tratamiento. Se determinó el peso fresco (PF) y posteriormente, las porciones de hojas fueron sumergidas en agua durante ocho horas, para obtener peso turgente (PT). Se secaron a 70°C hasta peso constante para determinar el peso seco (PS). Los resultados se expresan en porcentajes (%).

$$\text{CRA (\%)} = (\text{PF} - \text{PS}) / (\text{PT} - \text{PS}) \times 100.$$

4. Índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI)

El índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI) expresa la relación de reflectancia espectral en el dosel en la región infrarroja y roja y se utiliza para monitorear el efecto del estrés hídrico en el crecimiento de las plantas y pronosticar la biomasa (Romano *et al.*, 2011). El NDVI se midió individualmente en cada planta utilizando un sensor de cultivos portátil GreenSeeker® a las 12 p.m. cada 7 días.

5. Obtención del extracto crudo de tallo (ECAt) y hoja (ECAh)

Los tallos y hojas de AC se lavaron con soluciones de peróxido de hidrógeno al 0,1 % (v/v) y luego fueron cortados en pequeños trozos. Inmediatamente pesados, triturados con una procesadora eléctrica Smart-tek en *buffer* acetato de sodio 100 mM pH 5,00 en una proporción 1 g hoja/mL *buffer* y 0,5g tallo/mL *buffer*. La suspensión se mantuvo en agitación en un baño de hielo durante 40 min, luego se filtró en baño de hielo usando tamiz de malla gruesa, su filtrado fue dividido en alícuotas de 1; 25 y 50 mL y conservados a -18°C hasta su empleo (Hernández *et al.*, 1997).

6. Obtención del aislado enzimático de tallo (AEAt) y hoja (AEAh)

Se obtuvieron las enzimas por precipitación con diferentes solventes orgánicos (etanol y acetona) con el objetivo de eliminar compuestos fenólicos, glúcidos y fragmentos proteicos inactivos de bajo peso molecular (Bruno, 2007). En primer lugar, se trató con cuatro volúmenes del solvente orgánico frío (-20 °C) a efectos de minimizar la desnaturización proteica (1:4, respectivamente) con agitación suave y se dejó reposar durante 20 minutos a 0 °C antes de la centrifugación a 4000 xg durante 20 minutos. Los pellets se secaron en un desecador al vacío para eliminar residuos de solventes orgánicos y se suspendieron en *buffer* fosfato de sodio pH 7 conteniendo EDTA y cisteína 5 mM, manteniendo el sistema a 0°C (Scopes, 1984). Este precipitado resuspendido se denominó aislado enzimático para tallo (AEAt) y hoja (AEAh).

7. Caracterización de los extractos crudos (ECAt y ECAh)

7.1 Concentración proteica

Al igual que con las hojas de *Bromelia serra* se utilizó el método de Bradford (1976) según ítem 3.1 del capítulo II, basado en que la unión del colorante Coomassie blue G-250 a la proteína produce un corrimiento del máximo de absorbancia de 465 nm (forma roja del colorante libre) a 595 nm (forma azul del complejo colorante-proteína).

Para poder cuantificar el ensayo se realizaron curvas de calibración utilizando como patrón seroalbúmina bovina en el rango de 2,5-45 µg/mL

7.2. Actividad proteolítica con sustrato proteico: azocaseína

La actividad proteolítica también se analizó utilizando azocaseína al 1% (p/v) como sustrato. La generación de péptidos solubles en TCA se siguió en condiciones alcalinas a 440 nm. Un ensayo sin enzima sirvió como control negativo. Una unidad de actividad caseinolítica, sobre azocaseína, se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir un cambio de absorbancia de 1,0 en una cubeta de 1 cm en las condiciones del ensayo (Sarah *et al.*, 1989).

7.3 Electroforesis desnaturizante y en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Descripta en el ítem 3.4 del capítulo II con las muestras ECAt y ECAh.

7.4 Zimograma

Se realizó la zimografía, descrita por Hames (1981) con ligeras modificaciones, para verificar la actividad gelatinolítica. Al ECAt y ECAh se les agregó *buffer* muestra SDS sin agentes reductores y se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12 % copolimerizados con 1,5 mg/mL de gelatina. A continuación, los geles se lavaron dos veces durante 30 minutos en Tritón X-100 al 2,5% (p/v) para eliminar el SDS en agitación orbital y luego se incubaron en *buffer* activador (fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0 con cisteína 15 mM) a 37 °C durante 18 h en estufa. Despues de la incubación, los geles se tiñeron con azul de Coomassie blue R-250 durante dos horas y luego se decoloraron siguiendo el mismo procedimiento mencionado para SDS-PAGE. La presencia de actividad gelatinolítica se

comprobó mediante bandas claras sobre un fondo azul uniforme. Se comparó el peso molecular de la bromelina comercial con los ECAt y ECAh con sus diferentes tratamientos de estrés hídrico.

8. Caracterización de los aislados enzimáticos de tallo (AEAt) y hoja (AEAh)

8.1 Actividad proteolítica con sustrato sintético: LNPE

Se utilizó el método espectrofotométrico basado en la capacidad que tiene dicha enzima de hidrolizar el sustrato α -N-CBZ-L-lisin-p-nitrofenil éster (LNPE). Este sustrato es altamente específico y sensible para la bromelina del tallo (Silverstein, 1974). La reacción fue monitoreada espectrofotométricamente a 340 nm (absortividad molar $6320\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). La concentración final de sustrato empleada fue de 1,8 mM. Las soluciones de trabajo son preparadas en buffer acetato de sodio 30 mM pH 4,60, KCl 100 mM, cisteína 1 mM y las medidas llevadas a cabo a 25 °C. Se realizó la actividad enzimática AEAt y AEAh del mes 3 de los tratamientos 100, 50 y 25%CC.

8.2 Separación cromatográficas por intercambio catiónico de los aislado enzimático de tallo (100 y 25%CC) y hoja (100 y 25%CC)

La cromatografía de intercambio se realizó en una columna (Pharmacia XK 16/40, con adaptadores AK16) empaquetada con 5 mL de HiTrap SP High Performance (GE Healthcare), de y equilibrada con buffer acetato-acético 0.1M (pH 5,6) a 20 °C. Después de lavar la columna con el mismo buffer, se cargaron las muestras de los AEAt y AEAh en la columna (0,5 mL) y las proteínas eluyeron con un gradiente salino: 165 mL de cloruro de sodio entre 0,00 y 1 M. Se analizó la absorbancia de la elución a 280 nm y se ensayó la actividad proteolítica con azocaseína y hemoglobina (descripto en el ítem 3.2.1 y 3.2.2 del capítulo II de los picos obtenidos de las cromatografías. También, se sembró como patrón bromelina comercial bajo las mismas condiciones de buffers. Se realizaron electroforesis SDS-PAGE de las eluciones en condiciones no reductores de los AEAt (100 y 25%CC), AEAh (100 y 25%CC) y bromelina comercial para determinar los pesos moleculares de las

proteínas. En las cromatografías, el perfil de proteínas se estimó por medida directa de la absorbancia a 280 nm.

9. Análisis estadístico

Los datos representan la media \pm desviación estándar (DE) de al menos cuatro réplicas. La significación estadística se probó mediante ANOVA unidireccional y Tukey y los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software InfoStat versión 2020 (Di Rienzo *et al.*, 2020).

Resultados

1. Registro de las temperaturas promedio, máximas y mínimas

Las temperaturas máximas como promedio fueron levemente mayores en el año 2019 que en 2022. Las temperaturas medias del año 2019 de cada mes fueron de 26 °C (agosto), 23 °C (septiembre), 26 °C (octubre); mientras que en 2022 las temperaturas fueron de 21 °C (agosto), 22 °C (septiembre) y 25 °C (octubre). En ambos años durante los tres meses se observó la oscilación de temperatura tanto de las medias, máximas y mínimas, siendo estas oscilaciones mayores en el año 2022.

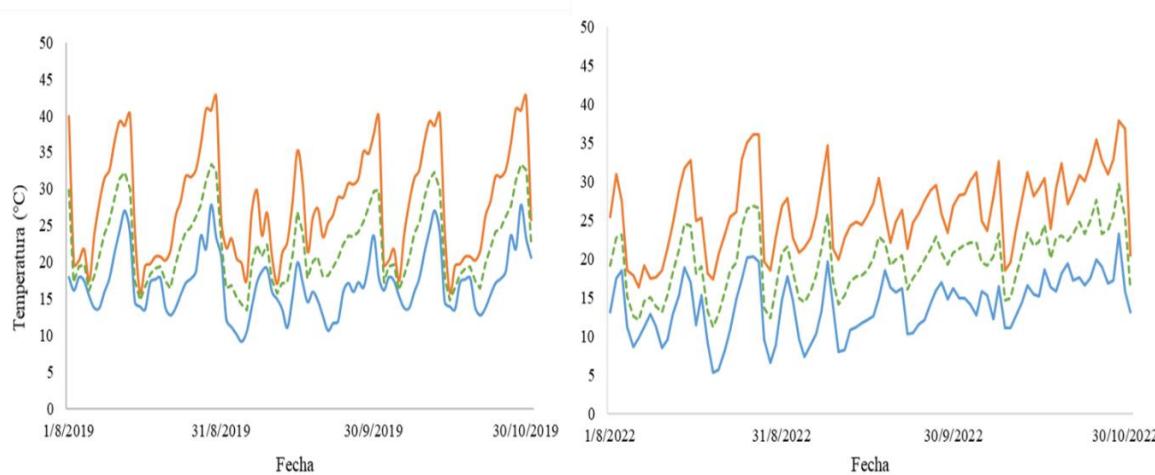


Figura 20. Temperaturas máxima, media y mínima dentro del invernáculo registradas con termohigrómetro digital durante agosto, septiembre y octubre de 2019 y 2022. Las líneas

indican las temperaturas máximas, las líneas punteadas verde las temperaturas promedios y las líneas azules las temperaturas mínimas de cada día.

2. El Índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI)

El NDVI es una herramienta es un indicador no destructivo que puede utilizarse para varios usos, siendo uno de ellos el monitoreo del estrés hídrico (Kamble *et al.*, 2013). Para este ensayo durante los dos años de experimento, se midió el NDVI de los tres tratamientos en la parte central de la hoja “D” (100%; 50% y 25% CC) cada 7 días incluyendo el momento del muestreo de las plantas de ananá en 3 hojas distintas en todas las hojas de los experimentos. Al analizar estadísticamente los valores de NDVI en los momentos de muestreo, se observa que en el mes 1 de distintas dosis de regado no hubo diferencias significativas entre los tres tratamientos (25%; 50% y 100% CC) con valores promedios de NDVI de 0,67 a 0,72. En el mes 2 del experimento se diferenciaron estadísticamente los tres tratamientos, obteniendo valores promedio de 0,57, 0,67, 0,72 para los tratamientos 25%; 50% y 100% CC respectivamente. En el mes 3, también se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con valores 0,53, 0,63 y 0,72 correspondientes a 25%, 50% y 100% CC. Si bien pareciera que los valores de NDVI para los tratamientos de estrés hídrico tienen un comportamiento lineal a medida que disminuye la cantidad de agua en el suelo, mediante el

ajuste de las curvas a líneas de tendencia demostraron una respuesta polinómica con un mejor ajuste de R^2 (Fig. 21).

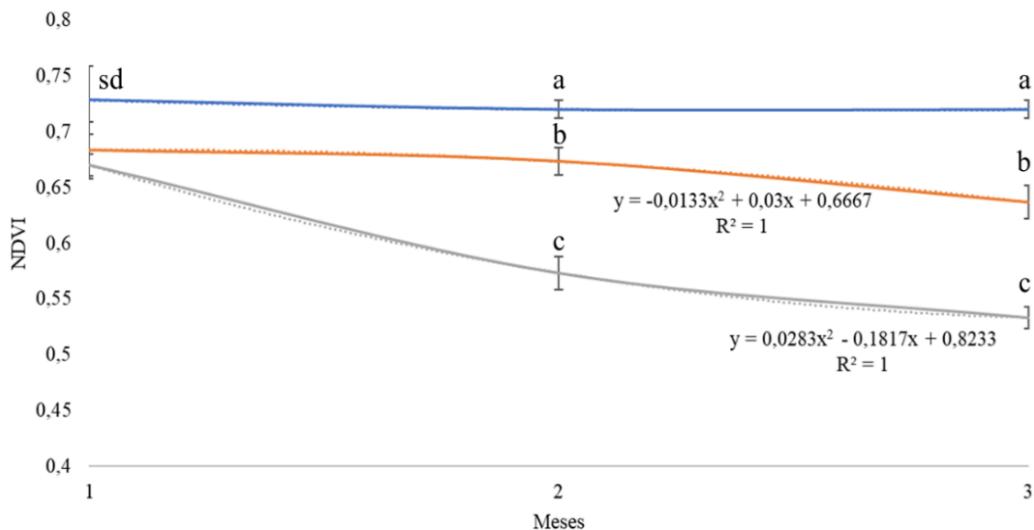


Figura 21. Valores NDVI tomadas a las 12 pm de hojas de ananá sometidos a tratamientos 100 % (línea azul), 50% (línea naranja) y 25% (línea gris) a capacidad de campo (CC) durante 3 meses. Las barras representan la desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$). Sd: sin diferencias estadísticas.

3. Contenido relativo de agua (CRA)

El contenido relativo de agua que se midió en la parte central de las hojas “D” en los tres meses de muestreo en 2 años diferentes se muestra en la Figura 22. En el mes 1 no se encontraron diferencias significativas entre los tres tratamientos (25%; 50% y 100% CC), los cuales tuvieron valores promedio entre 87 y 90% de CRA. En el mes 2, los tratamientos 50% y 100% CC (valores promedio de 89 y 91% de CRA respectivamente) fueron significativamente mayores que el tratamiento 25% CC con un valor promedio de 77%. En el último mes, se diferenciaron estadísticamente los tres tratamientos, siendo 100% CC el de mayor valor promedio con 96%, el de 50% CC con 86% y el tratamiento 25%CC con 76% de CRA.

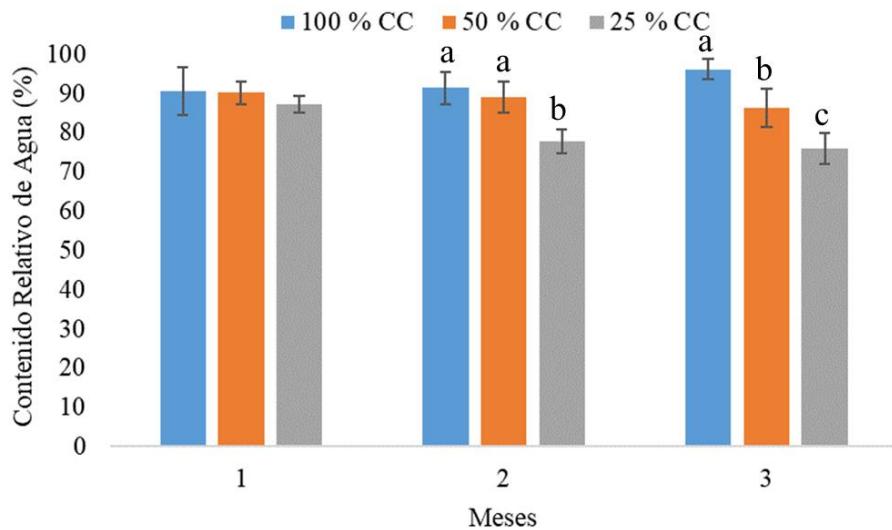


Figura 22. Contenido relativo de agua de hojas “D” ananá sometidas a tratamientos 100, 50 y 25% a capacidad de campo (CC) durante 3 meses. Las barras representan la desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$).

4. Efecto del estrés hídrico en los extractos crudos de hoja y tallo

4.1 Contenido de proteínas

En la Figura 23 se observa la variación de contenido de proteínas de ECAh realizando el tratamiento de 100%; 50% y 25 % CC por tres meses en dos años distintos iniciando siempre en el mes de agosto (2019 y 2022). En cuanto a los valores promedios de concentración de proteína de extractos de hojas, se observó que en el año 1 variaron de 0,31 a 0,44 mg/mL mientras que en el año 2 de 0,23 a 0,49 mg/mL. En cuanto a la concentración de proteína del mes 1, en el año 1 no se encontraron diferencias significativas entre los tres tratamientos, mientras que en el año 2 las plantas que fueron sometidas a estrés hídrico (25% y 50% CC) presentaron mayor cantidad de proteína que el tratamiento 100%. En el mes 2, también hubo respuestas diferentes según el año del experimento. El año 1, el tratamiento 25 % CC tuvo mayor concentración de proteína siendo estadística mayor que los demás tratamientos,

mientras que en el año 2 se diferenciaron estadísticamente los tres tratamientos; siendo mayor el tratamiento 25% CC, luego 50% CC y por último el tratamiento 100%CC. En cuanto al mes 3, presentó el mismo comportamiento que el segundo en términos estadísticos, siendo el tratamiento más estresado (25% CC) el que tuvo mayor concentración de proteína, culminando con 0,32 mg/mL en el año 1 y 0,49 mg/mL en el año 2.

El contenido de proteínas de los ECAt bajo los tratamientos 100%; 50% y 25% CC puede observarse en la Figura 24. La concentración de proteínas en el tallo es mayor que en hoja. La concentración promedio en el año 1 varió de 0,77 mg/mL a 1,2 mg/mL, por el otro lado el año 2 fue de 0,26 mg/mL a 1,18 mg/mL. En el mes 1 del año 1, la concentración de proteínas fue estadísticamente diferente entre los tratamientos, siendo mayor en las plantas más estresadas (25%CC), mientras que en el año 2 los tratamientos 50% y 25% CC fueron significativamente mayores al tratamiento no estresado (100%CC). En el mes 2 del experimento, el año 1 respondió estadísticamente diferente a los tres tratamientos, siendo siempre mayores las concentraciones de proteínas de los estresados (50% y 25%CC) mientras que en el año 2 el tratamiento 25% CC fue estadísticamente mayor a 50% y 100% CC. En el último mes, el comportamiento fue inverso al mes 2 comparando año uno vs año dos, ya que hubo diferencias estadísticas del tratamiento 25% CC con respecto a 50% CC y 100% CC, mientras que en el año 2 se encontraron diferencias en el contenido de proteína entre los tres tratamientos.

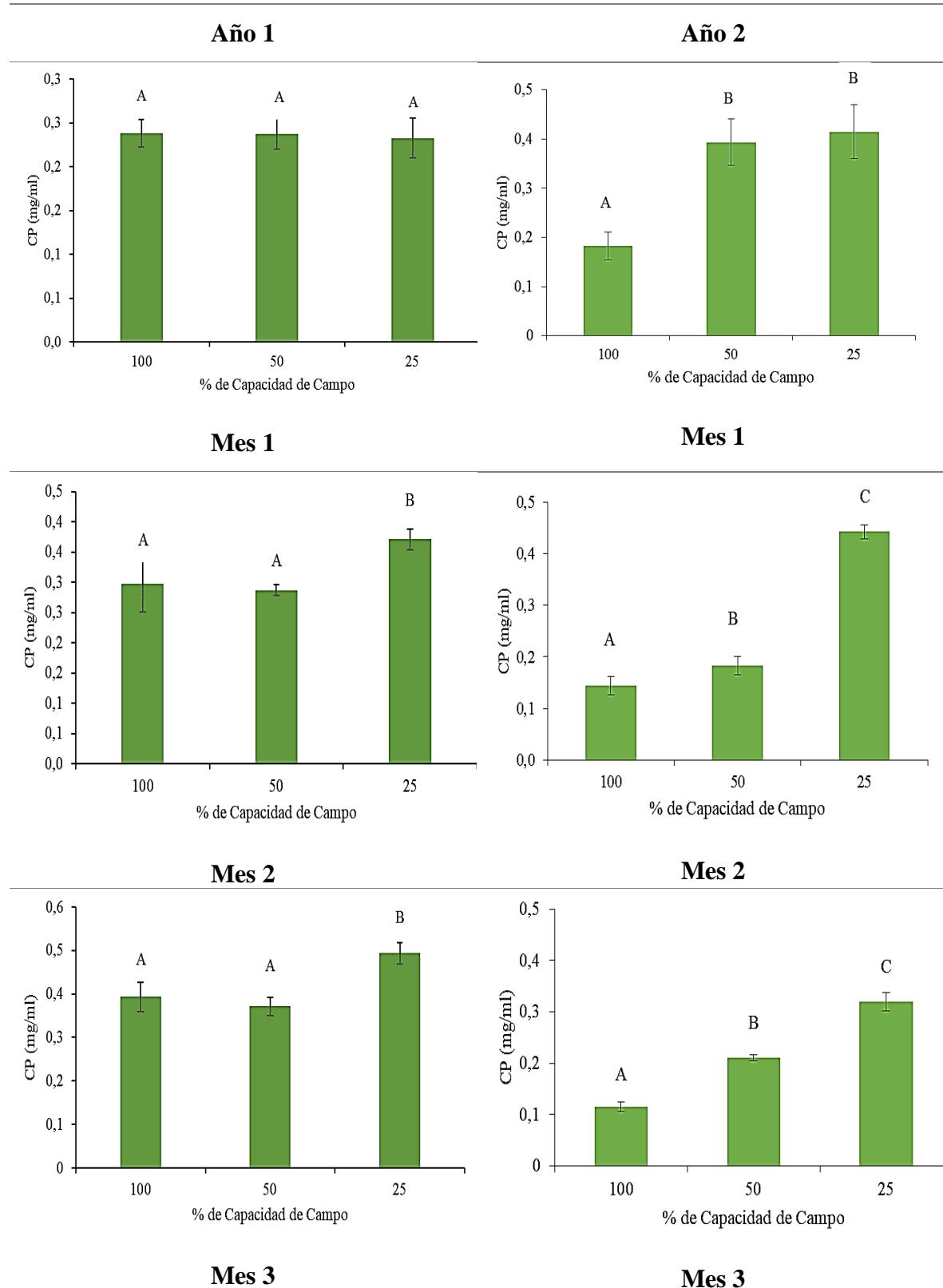


Figura 23. Concentración de proteínas en mg/mL (CP) en ECAh en tres meses a diferentes porcentajes de capacidad de campo. Cada columna representa un año diferente de muestreo y cada fila un mes (1, 2 y 3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias según el test de Tukey al 5%. Las barras representan la desviación estándar (n=3).

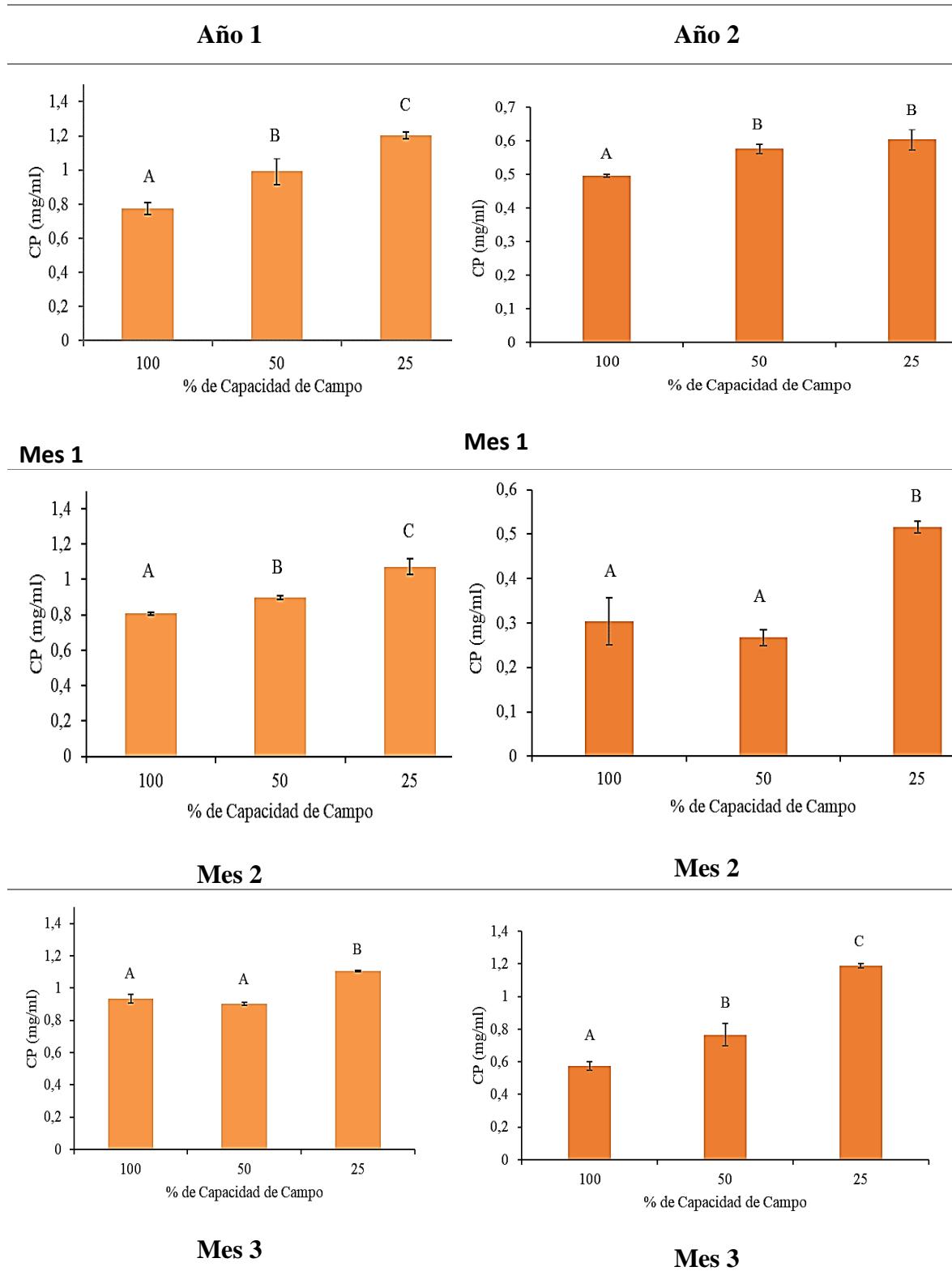


Figura 24. Concentración de proteínas en mg/mL (CP) en ECAt en tres meses a diferentes porcentajes de capacidad de campo. Cada columna representa un año diferente de muestreo y cada fila un mes (1, 2 y 3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias según el test de Tukey al 5%. Las barras representan la desviación estándar (n=3).

4.2. Actividad proteolítica

En las Figura 25 y 26 se observa la actividad proteolítica utilizando como sustrato a la azocaseína al 1%. La actividad está expresada, tanto con ECAh y ECAt, en unidades de absorbancia a 440 nm luego de 30 minutos de incubación de los extractos con el sustrato a 37°C. En términos generales se puede evidenciar mayor actividad proteolítica en el año 2 del experimento y a su vez mayor actividad en tallos que en hojas. Los valores promedios en unidades de absorbancia fueron de 0,09 U a 0,17 U en el año 1 en hojas y en el segundo de 0,34 U a 0,58 U y en el caso de tallos fueron de 0,22 U a 0,34 U en el año 1 y en el segundo de 0,50 U a 0,60 U de Absorbancia a 440 nm.

Existieron ciertas diferencias en los dos años de repeticiones, por ejemplo, en cuanto a actividad proteolítica de tallo, en el mes 1 del año 1 la actividad en los tallos estresados (50% y 25% CC) fueron significativamente mayores al no estresado (100%CC), por el otro lado en el año 2 la actividad proteolítica fue mayor solo en el tallo de la planta más estresada (25% CC) comparando los demás tratamientos (50%, 100% CC).

En el mes 1 del año 1, no se encontraron diferencias significativas en la actividad proteolítica de los ECAh (Fig. 25), mientras que en el año 2 se diferenciaron estadísticamente las plantas estresadas (25% y 50% CC) de las no estresadas (100% CC). Luego de 60 días de ensayo en el año 1 siguió sin mostrar diferencias significativas entre los tratamientos; mientras que en el año 2 solo el tratamiento con mayor estrés (25%CC) pudo diferenciarse estadísticamente de los demás con mayor actividad proteolítica (100% y 50%CC). En el último mes de ensayo del año 1 (mes 3), se observó diferencias estadísticas con mayor actividad proteolítica en el tratamiento 25% a comparación de 50% y 100% CC. En el caso del año 2 en el mes 3, los tres tratamientos fueron significativamente diferentes, teniendo mayor actividad proteolítica las plantas sometidas a 25%, luego 50% y por último 100% CC.

La actividad proteolítica en ECAt (Fig. 26) tuvo un comportamiento diferente a los tratamientos en ECAh ya que hubo mayor número de diferencias estadísticas en respuesta al estrés hídrico. En el mes 2 del año 1 la actividad proteolítica del tallo tuvo el mismo patrón que el mes 1 del año 2, siendo el tratamiento 25%CC significativamente mayor. que los

demás (50% y 100%CC). En el mes 2 del año 2, los tres tratamientos fueron significativamente diferentes, teniendo mayor actividad proteolítica las plantas sometidas a 25%, luego 50% y por último 100% CC. Por último, en el mes 3, las diferencias de actividad del primer y año 2 fueron las mismas que en el mes 2, es decir, mayor actividad proteolítica en el tratamiento 25%CC con respecto a 50% y 100% CC en el año 1 con diferencias entre los tres tratamientos del experimento.

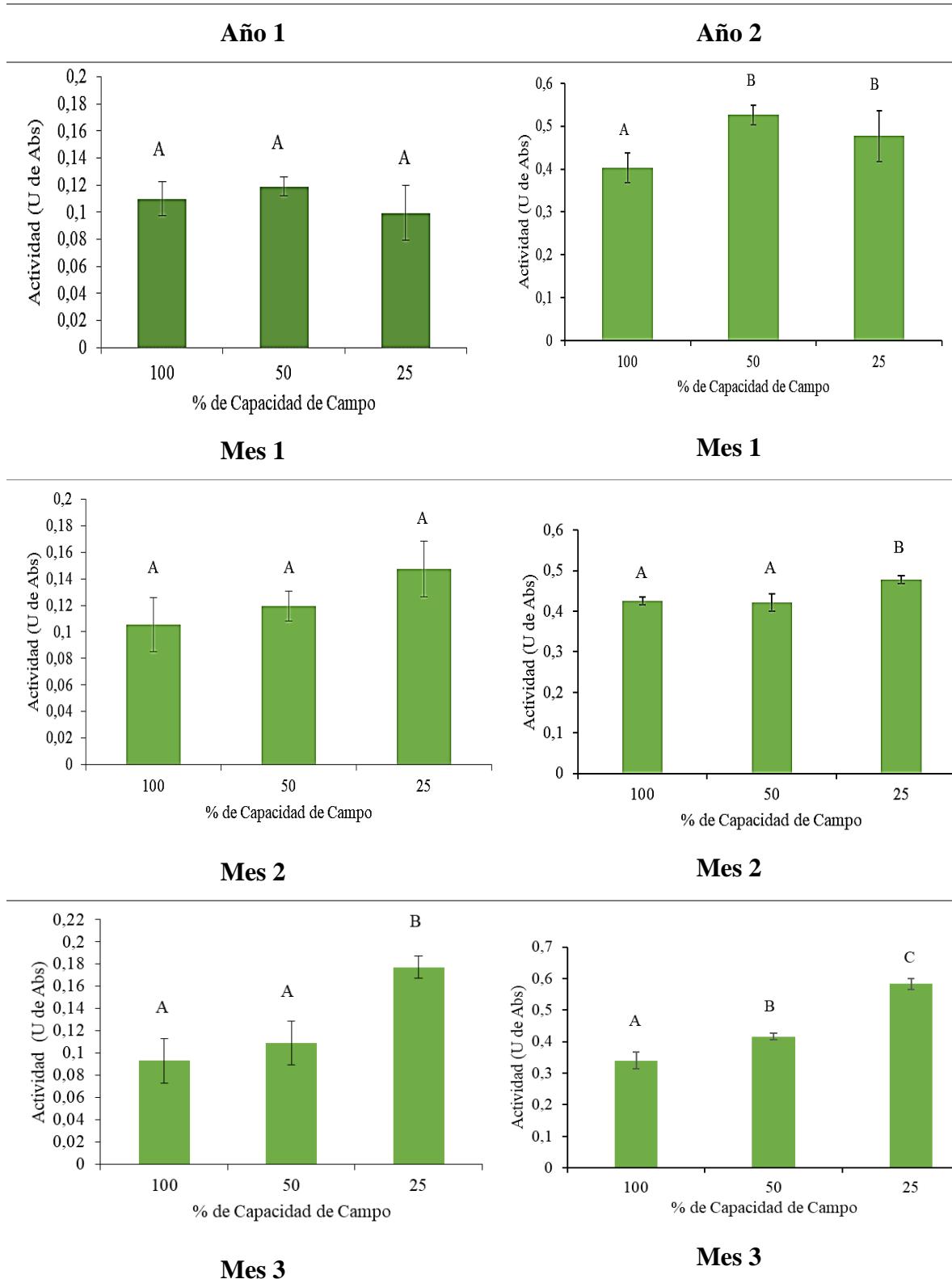


Figura 25. Actividad proteolítica (U abs/mL) en ECAh en tres meses a diferentes porcentajes de capacidad de campo. Cada columna representa un año diferente de muestreo y cada fila un mes (1, 2 y 3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias según el test de Tukey al 5%. Las barras representan la desviación estándar (n=3).

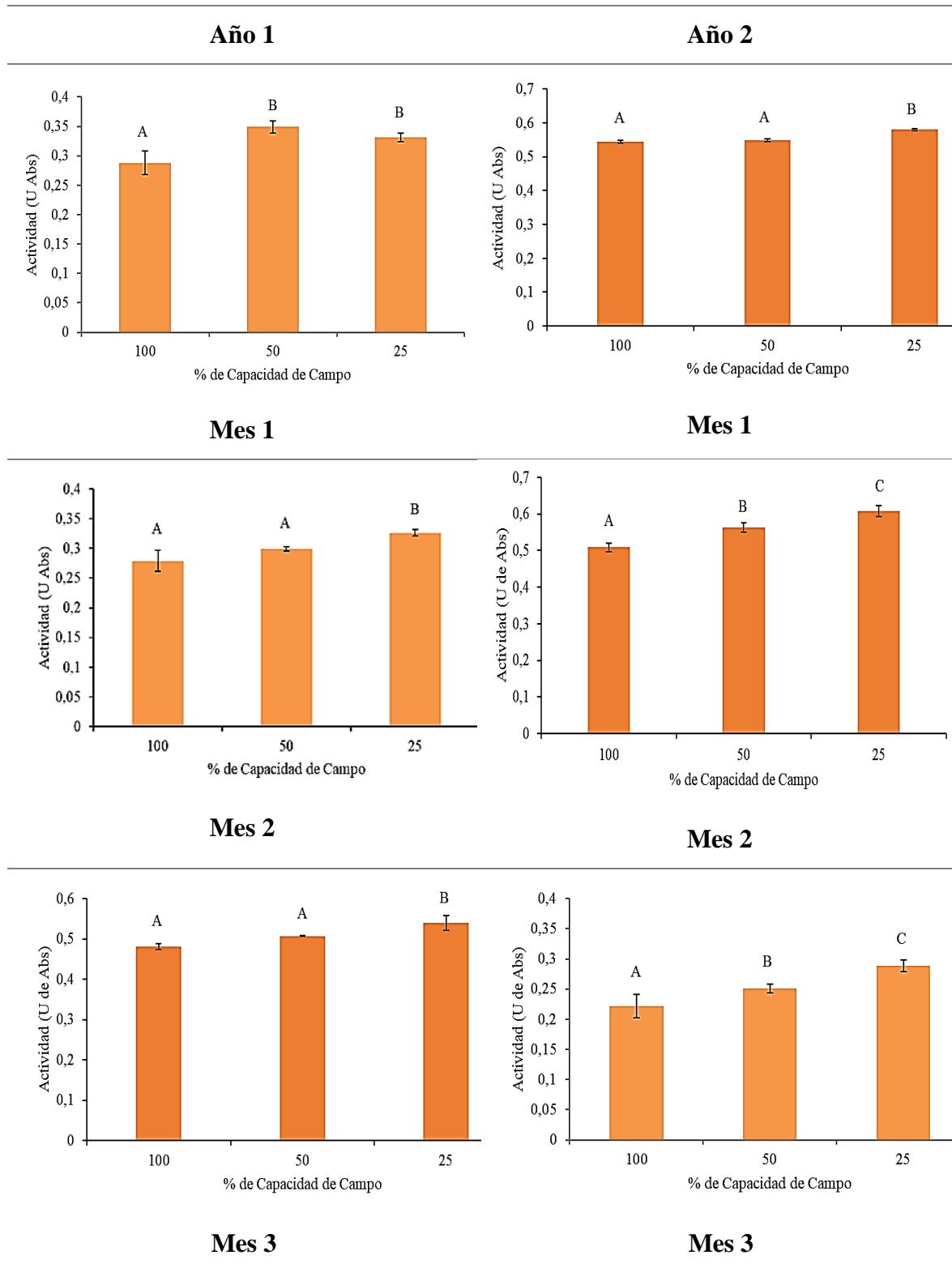


Figura 26. Actividad proteolítica (U abs/mL) en ECAt en tres meses a diferentes porcentajes de capacidad de campo. Cada columna representa un año diferente de muestreo y cada fila un mes (1, 2 y 3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias según el test de Tukey al 5%. Las barras representan la desviación estándar (n=3).

4.3 Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) y zimografía

En la Figura 27 se representan los tratamientos 100%; 50% y 25% CC con electroforesis SDS-PAGE de ECAh (Fig. 11a) y ECAt (Fig. 27b) con sus respectivos zimogramas del mes 1 del experimento. En el tratamiento de hídrico 100% CC de los ECAh (Fig. 27a) se observaron pocas bandas de proteínas a (19, 16 y 11 kDa). Cabe destacar que si bien las imágenes de las electroforesis SDS-PAGE están en blanco y negro, los geles fueron teñidos con Coomassie Blue R-250. Respecto a las hojas sometidas a estrés se diferenciaron mejor las bandas proteicas, en el tratamiento 50 %CC se notaron 5 bandas correspondientes a pesos proteicos de 22, 19, 16, 14 y 11 kDa. En el tratamiento más estresado (25%CC) también se vieron igual cantidad bandas de pesos moleculares muy parecidos (22; 20; 17; 15 y 11 kDa), y de mayor intensidad.

En los zimogramas de los ECAh (Fig. 27a) pueden verse a simple vista que, a medida que aumentó el grado de estrés hídrico, se detectó mayor actividad gelatinolítica (Calle 5 a 7). En calle 5 se observa la actividad gelatinolítica de extractos de hoja correspondientes a las bandas proteicas observadas en la electroforesis de 16-17 kDa y una banda clara bien marcada a los 22 kDa. En el caso del tratamiento 50% las bandas proteicas que tuvieron actividad gelatinolítica fueron las de 16, 18, y 22 kDa; mientras que se encontraron otras bandas claras con actividad gelatinolítica (25 y 60 kDa). En el tratamiento con mayor estrés hídrico (25% CC) aparecen bandas proteicas que se corresponden con la actividad proteolítica, como es el caso de las proteínas 17 y 22 kDa, y bandas de actividad (26, 62 y 72 kDa).

En la Figura 27b se observa la electroforesis SDS-PAGE de los ECAt sometidos a los tratamientos de estrés hídrico del mes 1 del experimento. En el ECAt 100%CC, se detectaron 6 bandas en la electroforesis, de pesos moleculares de 34, 31, 25, 15, 13 y 11,7 kDa. En el extracto de tallo de 50% CC, solo se detectaron dos proteínas de 34 y 31 kDa, mientras que en el tratamiento con mayor estrés hídrico (25% CC) se observaron bandas proteicas más intensas y en mayor cantidad que el tratamiento 50% CC (33, 30, 24 y 13 kDa).

En la actividad gelatinolítica del ECAt a 100% CC se observaron bandas claras de degradación de gelatina a los 25 kDa y alrededor de los 27 kDa. También se observó una banda clara no definida con actividad desde los 53 hasta los 64 kDa. En el tratamiento 50% CC se observó una leve actividad gelatinolítica a los 25 kDa y otra más intensa a los 28 kDa. Por encima de los 28 kDa se siguió observando una actividad proteolítica hasta los 52 kDa. En los tallos sometidos a estrés hídrico 50% CC se observaron 2 bandas proteolíticas de mayor peso molecular con actividad gelatinolítica, una más intensa de 68 kDa y otra de menor actividad de 79 kDa. En el tratamiento 25% CC, se observaron las mismas 5 bandas con el mismo patrón de comportamiento en cuanto a actividad gelatinolítica que en el tratamiento 50% CC (25, 28, 51, 66 y 78 kDa).

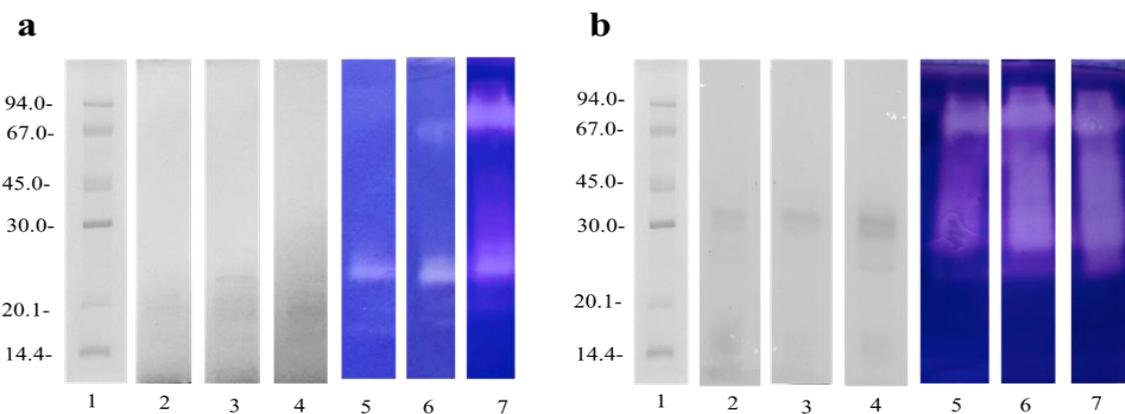


Figura 27. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) del mes 1. Calle 1: marcadores de proteínas estándar; calle 2: ECAh 100%; calle 3 ECAh 50%; calle 4 ECAh 25% CC; calle 5; Zimografía del ECAh 100%; calle 6: Zimografía de ECAh 50%; calle 7: Zimografía de ECAh 25% (a). Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE). Calle 1: marcadores de proteínas estándar; calle 2: ECAt 100%; calle 3 ECAt 50%; calle 4; ECAt 25% CC; calle 5; Zimografía de ECAt 100%; calle 6: Zimografía de ECAt 50%; calle 7: Zimografía de ECAt 25% (b).

En la Figura 28, se muestran los tratamientos al 100%, 50% y 25% CC mediante electroforesis SDS-PAGE, tanto para ECAh (Fig. 28a) como ECAt (Fig. 28b), acompañados por sus respectivos zimogramas correspondientes al mes 2 del experimento. A grandes rasgos se observa nuevamente el mayor contenido de proteínas y número de bandas proteicas en ECAt (Fig. 28b) en comparación con las electroforesis de los ECAh (10a). Al igual que en la

figura anterior (Fig. 27a), los geles fueron teñidos con Coomassie Blue R-250. En el ECAh 100% CC (calle 2) se observaron 4 bandas proteicas de 27, 19, 14 y 11 kDa, siendo la más predominante la proteína más pesada (27 kDa). En ECAh a 50% CC (calle 3), se vieron solo 3 bandas de proteínas, pero siguió presente la de 27 kDa un poco más intensa que en el tratamiento no estresado (100% CC) acompañada de otras dos proteínas de 25 y 11 kDa. En el tratamiento hídrico de mayor estrés (25%, calle 4) se detectaron más bandas proteicas (27, 25, 19, 18, 16, 14, 12 y 11 kDa). Nuevamente la banda de 27 kDa fue aún más intensa que en los demás tratamientos y que las demás proteínas dentro del mismo tratamiento. Notablemente se volvieron a detectar las proteínas de 19 y 14 kDa que no se había marcado en el tratamiento 50% CC.

Los resultados de los zimogramas obtenidos a partir de los ECAh (Figura 28a) muestran claramente que, a medida que se incrementó el nivel de estrés hídrico, hubo un aumento significativo en la actividad gelatinolítica (Calle 5 a 7). Una de las bandas proteicas de electroforesis de peso molecular más parecido a la que se podría atribuir de la actividad gelatinolítica es la de 27 kDa. La actividad proteolítica del tratamiento 100% (calle 5) mostró bandas claras a los 77, 31 y 24 kDa. En el tratamiento 50 % CC (calle 6) se observó una mayor degradación de la gelatina correspondiente a pesos moleculares de 77 y 37 kDa; además se detectó una alta actividad gelatinolítica desde 31 hasta 26 kDa, y luego otras bandas bien marcadas de 23 y 19 kDa. En el tratamiento de mayor estrés (25% CC, calle 7), se aprecia mayor actividad gelatinolítica entre los rangos de 20 a 30 kDa y nuevamente se evidenció actividad con proteínas de altos pesos moleculares (84, 71, 62 kDa). También, se observó una alta actividad proteolítica desde los 42 hasta los 28 kDa, en donde se puede destacar la actividad alrededor de los 28 kDa por el ancho de la banda en la zimografía. Otras enzimas con actividad gelatinolítica se correspondieron con pesos de 20 y 18 kDa.

En la Figura 28b se presenta la electroforesis SDS-PAGE y zimografía de los ECAt correspondientes a los tratamientos de estrés hídrico aplicados durante el mes 2 del experimento. En la electroforesis SDS-PAGE del tratamiento no estresado (100% CC, calle 2), se observan bandas de proteínas que se corresponden a pesos moleculares de 25, 23, 21, 18, 17, 16 y 15 kDa, siendo las de mayor concentración, por la intensidad de la tinción, las bandas de 15, 16 y 23 kDa. En el tratamiento 50% CC (calle 3), se distinguieron 8 bandas

proteicas (25, 22, 21, 18, 17, 16, 15 y 13 kDa). En este caso, las proteínas predominantes fueron las 15, 16, 17, 23 y 25 KDa. Por último, en el tratamiento 25% CC (calle 4) se observaron bandas de pesos moleculares de 45, 41, 25, 21, 18, 17, 16, y 13 kDa.

En el zimograma de ECAt (Fig. 28b, calle 5 a 7), no se detectó un claro aumento de la actividad gelatinolítica a medida que aumenta el estrés hídrico. En la actividad gelatinolítica del ECAt a 100% CC se observó actividad proteolítica a los 80 kDa. Se detectó una alta actividad proteolítica de 60 a 30 kDa. Luego se evidenció una banda más definida a los 25 kDa con baja actividad a comparación de las enzimas anteriores de la misma muestra, (calle 5). El ECAt del tratamiento 50% CC (calle 6) mostró actividad a los 96 y 82 kDa; y nuevamente se detectó una alta actividad proteolítica en el rango de pesos moleculares de 64 a 30 kDa y, además, se observó una banda bien definida de 25 kDa. En el tratamiento 25 % CC (calle 7) se evidenció el mismo patrón de actividad gelatinolítica que con el tratamiento 50% (calle 6), mostrando actividad a los 96 y 82 kDa y con un rango de actividad proteolítica de 64 a 30 kDa, y nuevamente se detectó la banda de proteica con actividad a los 25 kDa.

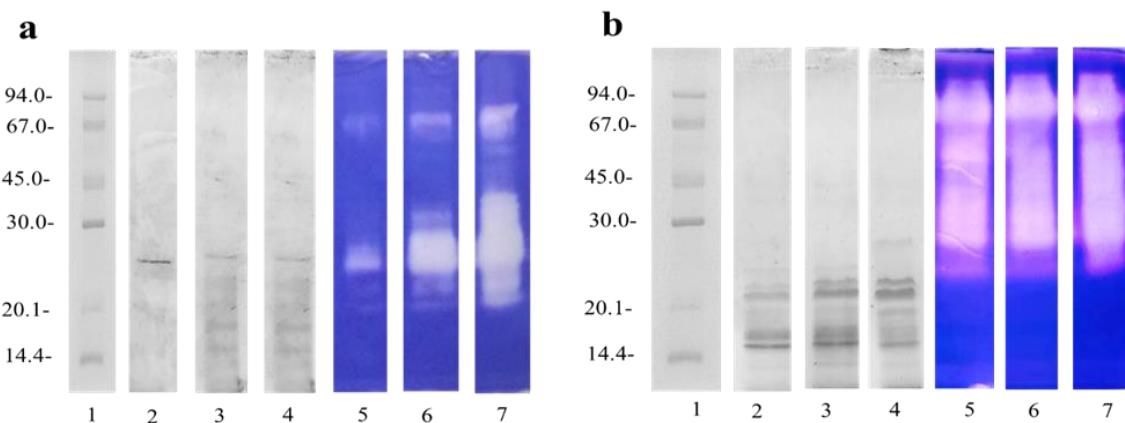


Figura 28. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) del mes 2. Calle 1: marcadores de proteínas estándar; calle 2: ECAh 100%; calle 3 ECAh 50%; calle 4; ECAh 25% CC; calle 5; Zimografía del ECAh 100%; calle 6: Zimografía del ECAh 50%; calle 7: Zimografía del ECAh 25% (a). Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE). Calle 1: marcadores de proteínas estándar; calle 2: ECAt 100%; calle 3 ECAt 50%; calle 4; ECAt 25% CC; calle 5; Zimografía de ECAt 100%; calle 6: Zimografía de ECAt 50%; calle 7: Zimografía de ECAt 25% (b).

En la Figura 29, se exhiben los tratamientos al 100%, 50%, y 25% (CC) a través de la técnica de electroforesis SDS-PAGE, tanto para ECAh (Fig. 29a) como para ECAt (Fig. 29b) del mes 3 de ensayo. Se incluyen, además, los zimogramas de los tratamientos respectivos correspondientes al mes 3 del experimento. En ECAh 100% CC nuevamente se presentaron 4 bandas proteicas coincidente con las detectadas en el mes 2 (Fig. 28a) de 27, 23, 20 y 14 kDa, de las cuales la proteína fijada con mayor intensidad fue la de 27 kDa. En el caso de las plantas estresadas, en el tratamiento 50% CC (calle 3), se detectaron más bandas a comparación del mismo tratamiento del mes anterior (Fig. 28a), con proteínas de pesos moleculares de 27, 24, 22, 20, 17 y 14 kDa. Nuevamente la banda predominante fue la de 27 kDa y se apreció una mayor intensidad en comparación con el tratamiento no estresado (100 %CC, calle 2). En el tratamiento de mayor estrés hídrico, 25 % CC (calle 4), también se encontraron el mismo número proteínas con pesos moleculares (27, 24, 22, 20, 17 y 14 kDa) y si bien la proteína mayor de concentración en este tratamiento fue la de 27 kDa, cabe destacar el aumento en la intensidad de las demás proteínas de menor peso molecular.

La zimografía con actividad proteolítica, utilizando como sustrato a la gelatina, de los ECAh en los tres tratamientos se presenta en Figura 29a. La actividad proteolítica del tratamiento 100% CC (calle 5) mostró bandas claras a la altura de pesos moleculares de 71, 27, 22 y 20 kDa. En el tratamiento con estrés hídrico 50 % CC (calle 6), se observaron bandas de 72, 62, 36 kDa y una alta actividad proteolítica desde los 29 hasta los 25 kDa. También se detectaron bandas de 22 y 20 kDa. En el tratamiento 25 % CC (calle 7), los geles mostraron bandas de alto peso molecular (73, 65, 58, y 51 kDa) y también se observó una banda bien marcada de 41 kDa. Luego se volvió a detectar una alta actividad proteolítica desde los 40 hasta los 25 kDa. Además, se observaron más bandas claras a la altura de 22 y 20 kDa pudiendo corresponderse a las proteínas del mismo peso molecular y tratamiento (calle 4).

La Figura 29b exhibe los resultados de la electroforesis SDS-PAGE y zimografía de ECAt obtenidos luego de aplicar tratamientos de estrés hídrico durante el mes 3 del experimento. En la electroforesis SDS-PAGE del tratamiento sin estrés hídrico (100%CC, calle 2), se detectaron bandas de pesos moleculares de 25, 22, 21, 18, 17, 15, 14 y 12 kDa, siendo las de mayor concentración, por la intensidad de la tinción, las bandas de 22, 21, 14 y 12 kDa. En el tratamiento 50% CC (calle 3), se visualizaron bandas de 25, 22, 21, 18, 17, 16, 15, 14 y 13

kDa, donde las de menor peso molecular (16 y 14 kDa) fueron las más intensas. En el tratamiento de mayor estrés (calle 4) 25 %CC, se detectaron proteínas de 43, 40, 25, 21, 18, 16, 15, 14 y 13 kDa, intensificándose las bandas proteicas de 25, 21, 18, 16, 15 y 14 kDa.

En el zimograma del mes 3 (Fig. 29b) se ve claramente que, a mayor estrés hídrico, aumenta la actividad gelatinolítica. La actividad proteolítica del tratamiento 100% CC (calle 5) mostró bandas claras a la altura de pesos moleculares de 89, 75, 55, 43, 30 y 25 kDa. El extracto de tallo del tratamiento 50% CC (calle 6) detectó actividad a los 91 y 77 kDa, y una alta actividad proteolítica en el rango de pesos moleculares de 60 a 28 kDa, se observó también una banda clara a los 25 kDa. En el tratamiento 25% CC (calle 7) se observó actividad por encima de y a los 94 kDa, otra banda ancha aproximadamente a 78 kDa y mayor actividad proteolítica desde los 60 hasta 28 kDa nuevamente en ese rango. Por último, se intensificó la banda de 25 kDa (calle 7) a comparación con el tratamiento anterior (calle 6).

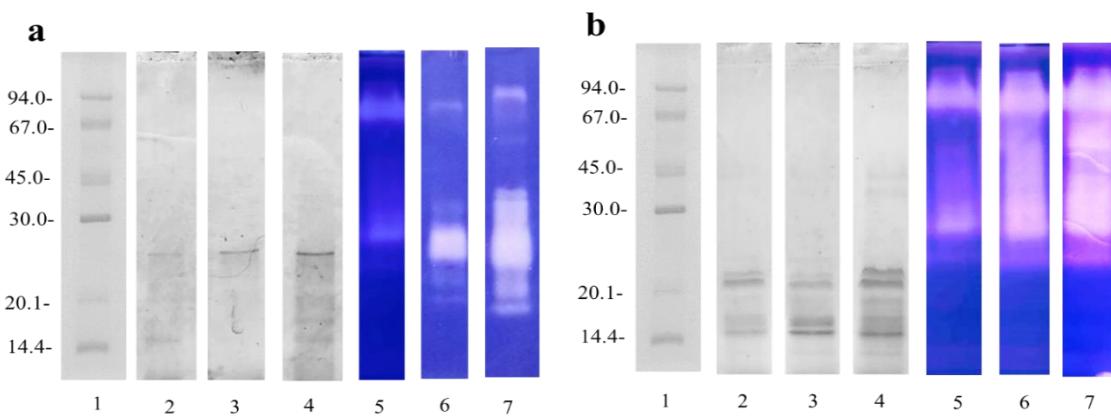


Figura 29. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) del Mes 3. Calle 1: marcadores de proteínas estándar; calle 2: ECAh 100%; calle 3: ECAh; calle 4: ECAh 25% CC; calle 5: Zimografía del ECAh 100%; calle 6: Zimografía de ECAh 50%; calle 7: Zimografía del ECAh 25% (a). Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE). Calle 1: marcadores de proteínas estándar; calle 2: ECAt 100%; calle 3 ECAt 50%; calle 4: ECAt 25% CC; calle 5: Zimografía del ECAt 100%; calle 6: Zimografía del ECAt 50%; calle 7: Zimografía del ECAt 25% (b).

5. Efecto del estrés hídrico de los aislados enzimáticos de hoja y tallo

5.1 Actividad proteolítica sobre sustrato sintético LNPE

Para la evaluación de la actividad proteolítica se utilizó el método espectrofotométrico basado en la capacidad que tiene dicha enzima de tallo (EC 3.4.22.4) de hidrolizar el sustrato α -N-CBZ-L-lisin-p-nitrofenil éster (LNPE). Este sustrato es altamente específico para la bromelina del tallo (Silverstein,1974). La reacción fue monitoreada cada 3 segundos espectrofotométricamente a 340 nm (absortividad molar $6320\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) durante 5 minutos. Se seleccionaron los aislados enzimáticos de mayor actividad proteolítica, utilizando como sustrato a la azocaseína, de las muestras del mes 3 de hoja y tallo (100%, 50% y 25%CC). Al realizar el ensayo con el sustrato específico para bromelina de tallo con todas las muestras se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 23. Se repitieron los ensayos 3 veces por muestra y se encontraron diferencias significativas entre las tres muestras de hojas. En cuanto a los aislados de tallo el tratamiento 100% CC (no estresado) se diferenció estadísticamente de los sometidos a estrés hídrico (50% y 25%CC).

Tabla 23. Unidades de sustrato liberados por mL de aislado enzimático (AE). Definición de Unidad del sustrato: Una unidad libera 1,0 μmol de p-nitrofenol del éster de p-nitrofenilo de Na-CBZ-L-lisina por minuto a pH 4,6 a 25°C.

Muestra	Unidades /mL de AE
Hoja 100% CC	0,0027 c
Hoja 50% CC	0,009 b
Hoja 25% CC	0,014 a
Tallo 100 % CC	0,06 b
Tallo 50 % CC	0,11 a
Tallo 25% CC	0,11 a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias según el test de Tukey al 5%.

5.2 Separación cromatográfica de intercambio catiónico

5.2.1 Bromelina comercial

En la Figura 30a se observa el perfil de elución de la cromatografía de intercambio catiónico (SP- High Performance) de la bromelina comercial. Luego de varias cromatografías de la bromelina comercial se observó una fracción no retenida y 3 picos que eluyeron a medida que se aumentó el gradiente salino. Uno de los picos retenidos con tiempo de retención a 23 minutos, fue el que mostró mayor absorbancia mientras que los demás picos retenidos de menor absorbancia se detectaron a los 13 y 30 minutos. En la Figura 30b se observa la electroforesis de cada una de las eluciones de la cromatografía de intercambio catiónico la bromelina comercial. En la calle 1 se observan los patrones utilizados como estándar para calcular los pesos moleculares de las proteínas y en la calle 2 se observa la fracción 1 o no retenida (NR) con pesos moleculares aproximados de 16 y 21 kDa. En el pico 1 o fracción 2, se observa en la calle 3 una sola banda proteica de peso molecular de 23 kDa el cual tiene muy baja absorbancia a 280. En el pico 2 o fracción 3 (tiempo de retención de 23 minutos), se observaron varias bandas (calle 4), obteniendo proteínas de 16, 22 y 25 kDa. En el caso del último pico 3 o fracción 4, se detectó una banda de 16 kDa de peso molecular. La calle número 6, se corresponde a la bromelina comercial, siendo la muestra utilizada para realizar esta cromatografía la cual presentó bandas proteicas de 16, 22, 25 y 28 kDa.

Se evaluó la actividad proteolítica de las 4 fracciones provenientes de la cromatografía de intercambio catiónico de la bromelina comercial. Todos los picos (1, 2, 3) y la fracción no retenida presentaron actividad proteolítica frente al sustrato azocaseína y con diferencias significativas en la actividad entre las 4 fracciones, siendo la de mayor actividad el pico 2 (0,40 Unidades de Absorbancia a 440 nm), pico 3 (0,38 UAbs 440), pico 1 (0,33 UAbs 440) y por último la fracción no retenida con 0,22 UAbs a 440 nm.

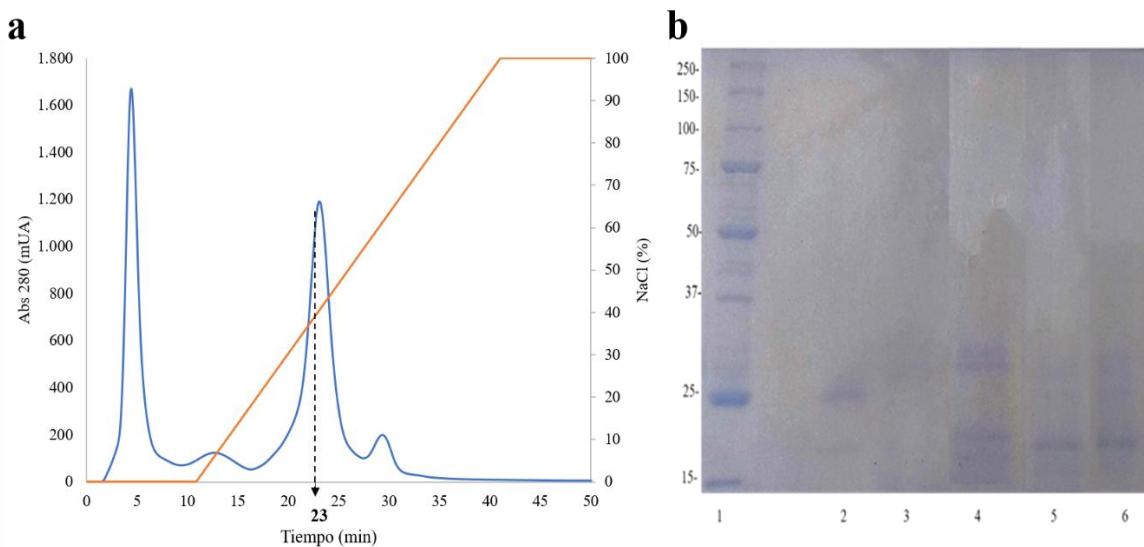


Figura 30. Cromatografía de intercambio catiónico (SP- High Performance) de bromelina comercial. Diámetro de la columna: 1,6 cm; buffer inicial: acetato-acético 0.1M, pH 5,6; gradiente de elución salina: 165 mL de 0,0 a 1 M de cloruro de sodio en el buffer inicial. Caudal, 1,0 mL/minuto. La línea punteada el tiempo de elución (23 min) en el cual se detectó la máxima absorción a 280 nm durante el gradiente de elución salina (a). SDS-PAGE de las fracciones y picos obtenidos de la cromatografía de intercambio catiónico (SP- High Performance) de bromelina comercial, patrones de PM (calle 1), fracción no retenida (calle 2), fracción 2 (calle 3), fracción 3 (calle 4), fracción 4 (calle 5), bromelina comercial (calle 6) (b).

5.2.2 Cromatografías de AEAt y AEAt de 100 y 25%CC

Las cromatografías de los aislados enzimáticos (AE) de tallo y hojas (estresados y no estresados) se repitieron tres veces siguiendo las mismas condiciones de elución que la bromelina comercial. Se decidió usar las muestras de tallo y hoja del mes 3 del ensayo, 100% y 25% CC debido a que el tratamiento 25% mostró la mayor actividad proteolítica con el sustrato azocaseína tanto en hoja como en tallo.

Las cromatografías de intercambio catiónico de aislados enzimáticos de tallo al 100% y 25% se presentan en las Figuras 31 y 32 respectivamente. En ambos casos, se repitió el comportamiento del pico no retenido y luego un segundo pico en el tiempo de retención de 23 minutos. En el caso del perfil de elución del aislado enzimático de tallo no estresado (Fig.

31) se observó que el pico retenido tuvo menor absorbancia a los 23 minutos que el aislado enzimático de tallo estresado (Fig. 32)

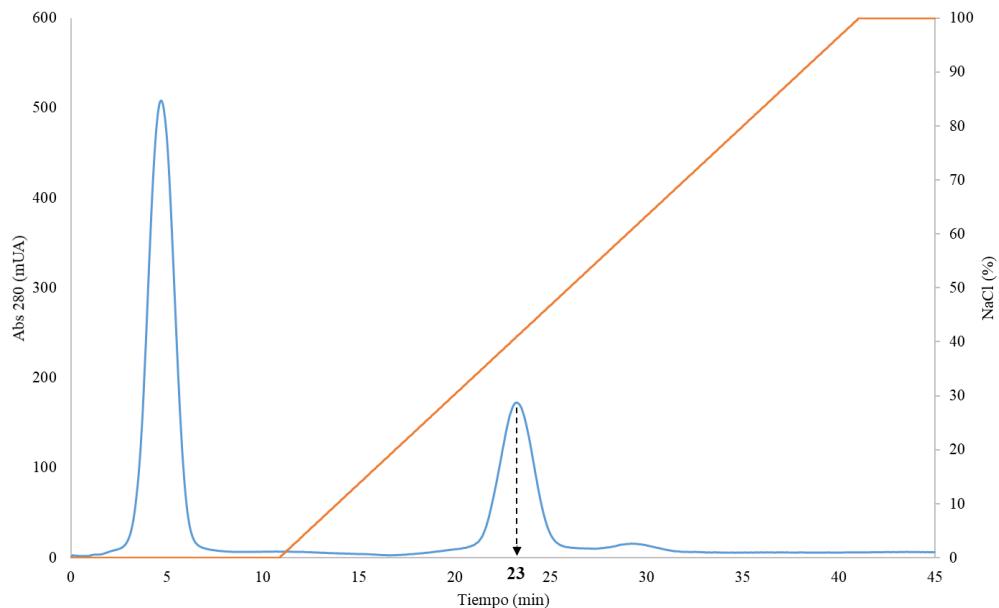


Figura 31. Cromatografía de intercambio catiónico (SP- High Performance) de Aislado Enzimático de tallo 100% CC. Diámetro de la columna: 1,6 cm; *buffer* inicial: acetato-acético 0.1M, pH 5,6; gradiente de elución salina: 165 mL de 0,0 a 1 M de cloruro de sodio en el *buffer* inicial. Caudal, 1,0 mL/min. La línea punteada el tiempo de elución (23 min) en el cual se detectó la máxima absorción a 280 nm durante el gradiente de elución salina.

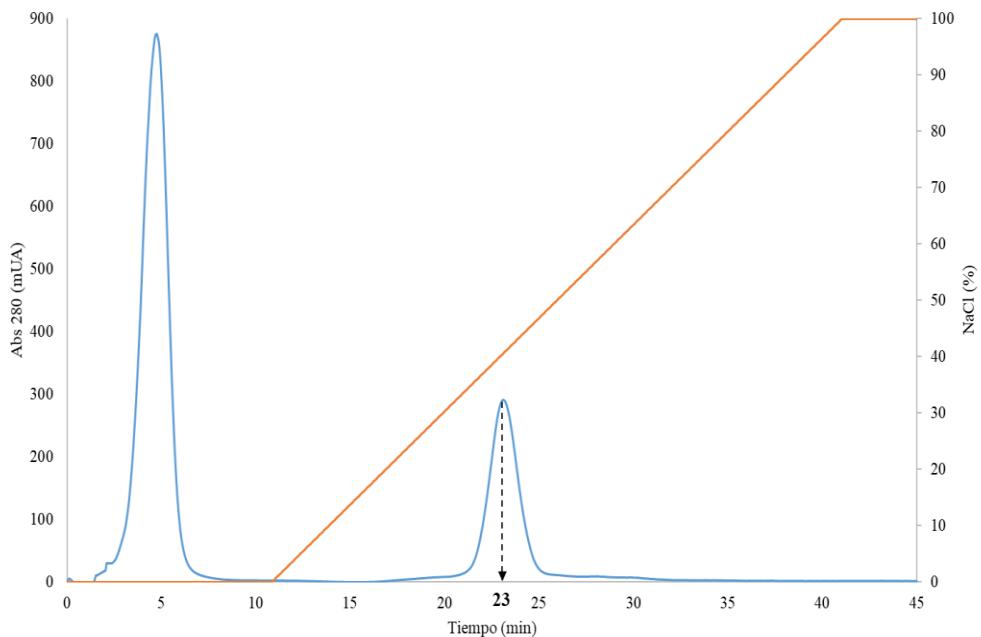


Figura 32. Cromatografía de intercambio catiónico (SP- High Performance) de Aislado Enzimático de tallo 25% CC. Diámetro de la columna: 1,6 cm; buffer inicial: acetato-acético 0.1M, pH 5,6; gradiente de elución salina: 165 mL de 0,0 a 1 M de cloruro de sodio en el buffer inicial. Caudal, 1,0 mL /min. La línea punteada el tiempo de elución (23 min) en el cual se detectó la máxima absorción a 280 nm durante el gradiente de elución salina.

5.2.3 Cromatografías de AEAh y AEAh de 100 y 25%CC

El perfil de elución de la chromatografía de intercambio catiónico de AEAh 100 %CC (no estresado) se presenta en la Figura 33. El primer pico no retenido corresponde a la fracción acídica del aislado y luego se observa un pequeño pico a los 23 minutos. Este último se corresponde con el mismo tiempo de retención de la bromelina comercial del pico de mayor absorbancia (Fig. 30). El aislado enzimático de hojas 25% (Fig. 33), tuvo el mismo comportamiento, pero con una mayor absorbancia al tiempo de retención de 23 minutos.

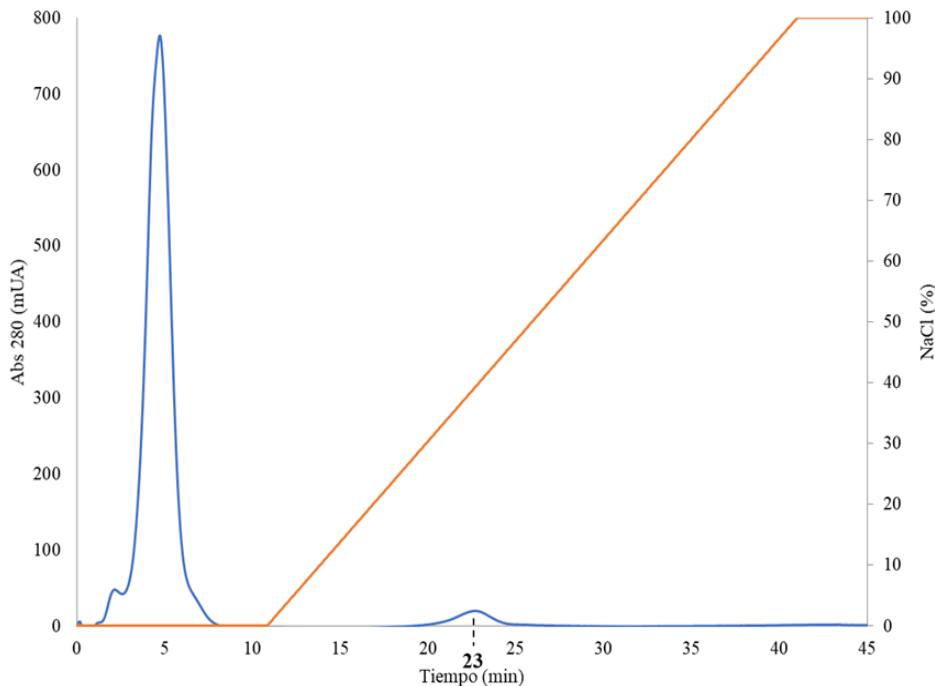


Figura 33. Cromatografía de intercambio catiónico (SP- High Performance) de AEAh de hoja 100% CC. Diámetro de la columna: 1,6 cm; buffer inicial: acetato-acético 0.1M, pH 5,6; gradiente de elución salina: 165 mL de 0,0 a 1 M de cloruro de sodio en el buffer inicial. Caudal, 1,0 mL/min. La línea punteada el tiempo de elución (23 min) en el cual se detectó la máxima absorción a 280 nm durante el gradiente de elución salina.

Debido a que el único pico retenido en común en el caso de los aislados de ananá y la bromelina comercial fue a los 23 minutos, se realizó un promedio de las absorbancias a 280 como estimación del contenido de proteína (Tabla 24). Se encontraron diferencias estadísticas en los aislados enzimáticos de los tratamientos y los órganos de la planta, los cuales de mayor a menor fueron, tallo 25 %, tallo 100%, hoja 25% y hoja 100% (Tabla 24).

Tabla 24. Valores de unidades de absorbancia a 280 a tiempo de retención de 23 minutos de los aislados enzimáticos de tallo (AET) al 100, 50, 25% CC y aislado enzimático de hoja (AEH) al 100, 50, 25% CC obtenidos de cromatografías SP.

	Abs 280 a 23 min			Test de Tukey
AET 100%	192	185	188,5	b
AET 25%	285	275	280	a
AEH 100%	18	17	17,5	d
AEH 25%	30	28	29	c

Letras diferentes indican diferencias significativas (p valor<0,05)

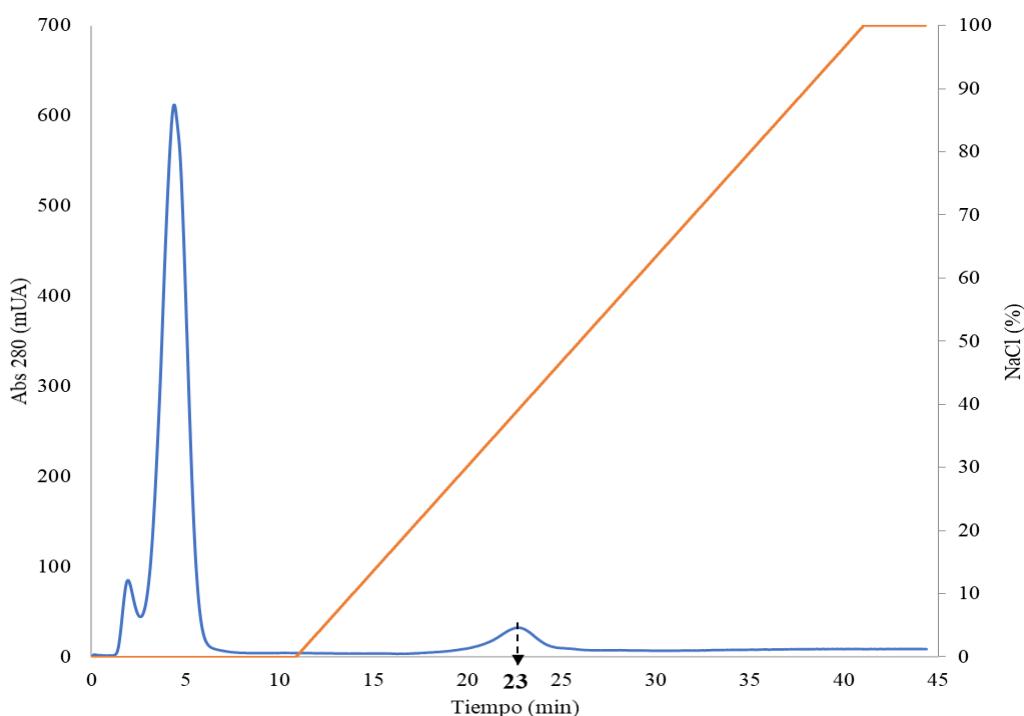


Figura 34. Cromatografía de intercambio catiónico (SP- High Performance) de Aislado Enzimático de hoja 25% CC. Diámetro de la columna: 1,6 cm; *buffer* inicial: acetato-acético 0.1M, pH 5,6; gradiente de elución salina: 165 mL de 0,0 a 1 M de cloruro de sodio en el *buffer* inicial. Caudal, 1,0 mL/min. La línea punteada el tiempo de elución (23 min) en el cual se detectó la máxima absorción a 280 nm durante el gradiente de elución salina.

5.3 Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones cromatográficas de AEAh y AEAt de 100 y 25%CC

Luego de colectar las eluciones obtenidas a partir de las cromatografías de intercambio catiónico de las muestras de los aislados enzimáticos (AE) de tallo y hoja, 100% y 25% CC del mes 3 (Fig. 31, 32, 33 y 34), se procedió a realizar las electroforesis SDS-PAGE correspondientes.

En la Figura 35 se observan tanto las muestras de hoja al 100% CC (calle 2) y hoja 25% (calle 5) previas a ser sembradas en la columna de intercambio catiónico. Para las fracciones obtenidas de las cromatografías fue necesario realizar una tinción con plata para determinar los pesos moleculares de las proteínas. Para la fracción no retenida de la muestra de hojas 100 % CC (calle 3) se determinaron proteínas con pesos de 17, 20 y 33 kDa. En cuanto al pico 1, el cual tuvo una muy baja absorbancia, se observó una sola banda de 22 kDa. En la muestra de hoja 25% CC, la fracción no retenida se calcularon pesos moleculares de 20 y 25 kDa. Finalmente, en el pico 1, se volvió a observar la banda proteica de 22 kDa.

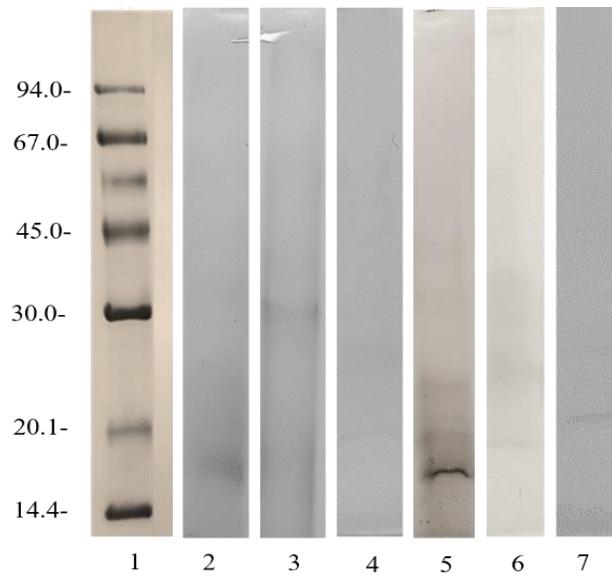


Figura 35. SDS-PAGE de las fracciones y picos obtenidos de la cromatografía de intercambio catiónico (SP- High Performance) de AE de hoja de ananá al 100 % y 25 % CC. Patrones de PM (calle 1), AEAh 100% CC (calle 2); fracción no retenida de AEAh 100% CC (calle 3); pico 1 del AEAh 100% CC (calle 4), AEAh 25% CC (calle 5), fracción no retenida del AEAh 25 % CC (calle 6) y pico 1 AEAh 25% CC (calle 7).

En la Figura 36, correspondiente a las muestras de tallo, la calle 2 muestra el AE de tallo al 100% y en la calle 5 al 25% CC. Nuevamente se observa la mayor concentración de proteínas en los tallos estresados (25%CC) que en los no estresados (100% CC). En cuanto a las eluciones de la cromatografía de tallo 100% CC, la calle 3 muestra la fracción no retenida por la columna, en la cual se detectó una proteína de peso molecular de 14 kDa. El pico 1 correspondiente al tiempo de retención de 23 minutos, que coincide con las muestras de hoja y de bromelina comercial, presentó 2 proteínas de pesos moleculares de 12 y 25 kDa. En la muestra de AE 25% CC (calle 5), las 2 eluciones obtenidas tuvieron los mismos pesos moleculares, es decir la fracción no retenida con 14 kDa y el pico 1 con 12 y 25 kDa. Si bien se repitieron las bandas proteicas, se observó una mayor concentración de proteínas, tanto en la fracción no retenida como en las proteínas del pico 1.

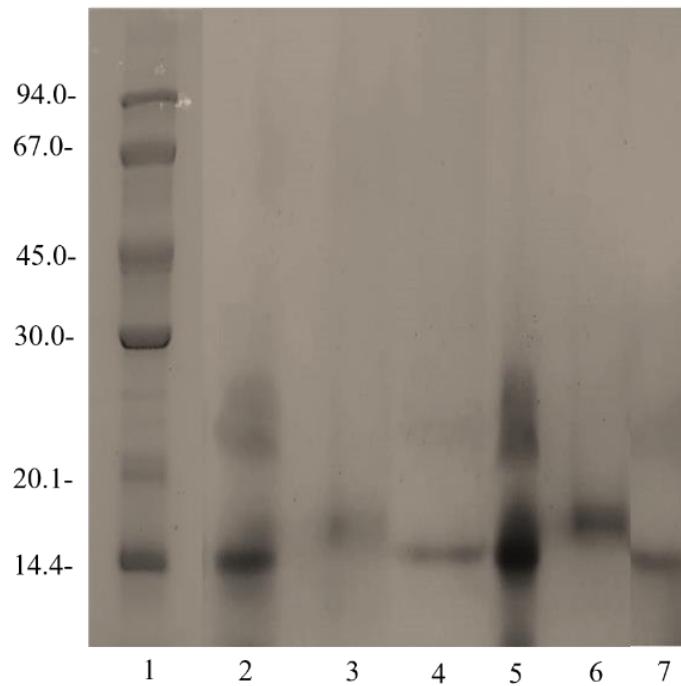


Figura 36. SDS-PAGE de las fracciones y picos obtenidos de la cromatografía de intercambio catiónico (SP- High Performance) de AEAt 100 % y 25 % CC. Patrones de PM (calle 1), AEAt 100% CC (calle 2), fracción no retenida de AEAt 100% CC (calle 3), pico 1 del AEAt 100% CC (calle 4), AEAt 25% CC (calle 5), fracción no retenida del AEAt 25 % CC (calle 6) y pico 1 AE de AEAt 25% CC (calle 7)

5.4 Actividad enzimática de las fracciones cromatográficas de los AEAh y AEAt (100 y 25% CC)

Se evalúo la actividad enzimática de los eluatos eluciones obtenidos de las cromatografías de intercambio catiónico (Tabla 25) de las muestras sembradas de los aislados enzimáticos de tallo (100%, 25% CC) y de hoja (100%, 25% CC). Al evaluar la actividad proteolítica con azocaseína a pH 7, todas las eluciones mostraron actividad. En la muestra de tallo no estresada (AEAt 100% CC), se observó menor actividad en el pico retenido (P1) que pico 1 (P1) de la muestra de tallo estresada (AEAt) 25% CC ($p <0,05$).

El pico 1 (P1) del aislado enzimático de hoja para el tratamiento 100% (AEAh) también demostró menor actividad proteolítica que el P1 de los aislados de hoja estresada (25% CC).

También se evaluó la actividad proteolítica ácida de las eluciones utilizando como sustrato a la hemoglobina a pH 3,3. Las eluciones de los aislados enzimáticos de tallo no retenidas (NR) tanto de 100% y 25% no mostraron actividad frente a este sustrato. En el pico 1 (P1) del aislado de tallo del tratamiento 25% CC mostró mayor actividad proteolítica ácida que el tratamiento 100% CC ($p <0,05$). En cuanto a los picos 1 (p1) de los aislados enzimáticos de hoja, tanto el tratamiento 100% y 50% CC, mostraron baja actividad proteolítica con poca diferencia entre ellas, aun así, mostrando diferencias significativas ($p <0,05$). En las eluciones no retenidas (NR), el aislado de hoja con estrés hídrico (25%CC) mostró mayor actividad frente al tratamiento 100%CC.

Tabla 25. Actividad proteolítica con azocaseína y hemoglobina (Hb) del aislado enzimático de tallo (AEt) y aislado enzimático de hoja (AEh) a 100 % y 25 % CC (Capacidad de campo) de las eluciones no retenidas (NR) y pico uno retenido a los 23 minutos (P1). Letras diferentes indican diferencias significativas (p valor<0,05)

Elución y muestra	Actividad proteolítica con azocaseína (Abs 440) (Abs 440)	Actividad proteolítica ácida con Hb (Abs 280)
NR AET 100%	0,27 a	0
P1 AET 100%	0,42 b	0,26 b
NR AET 25%	0,20 b	0
P1 AET 25%	0,47 a	0,29 a
NR AEH 100%	0,25 b	0,17 b
P1 AEH 100%	0,25 b	0,04 b
NR AEH 25%	0,39 a	0,33 a
P1 AEH 25%	0,28 a	0,06 a

Discusión

El cultivo del ananá con fines comerciales se realiza en lugares tropicales con precipitaciones de 1000 a 1500 mm/año en suelos ligeramente ácidos, evitando temperaturas por debajo de 20 °C las cuales afectan el crecimiento y resultan en pérdidas de peso al momento de cosecha (Bartholomew *et al.* 2003). Sin embargo, se han reportado estudios previos de la capacidad o resiliencia del cultivo de ananá frente a ambientes que le signifiquen un estrés hídrico. Debido a que posee un parénquima acuífero en las hojas (Derwidueé y González, 2010) estas plantas tienen la ventaja de que ante la posible falta de precipitaciones pueden disponer de su reservorio natural de agua. Además, es una especie posee el

metabolismo ácido de las crasuláceas, es decir, que es altamente adaptable al estrés ambiental y se encuentra naturalmente en sitios con períodos de escasa disponibilidad de agua o de CO₂ (Andrade *et al.*, 2007).

1. Indicadores CRA y NDVI

En la provincia de Corrientes, específicamente en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste (ambiente subtropical), se han realizado numerosos estudios para evaluar la adaptación de esta especie y utilizar diferentes indicadores destructivos y no destructivos para medir el estado hídrico de la planta y si sufre algún tipo de estrés hídrico. Se estudió la tasa fotosintética de las plantas de ananá que crecen bajo invernáculo donde se determinó que ésta se eleva en comparación con aquellas que crecen a campo (Gómez Herrera *et al.*, 2016). Al obtener buenos resultados con el cultivo de ananá en invernáculo se decidió investigar en profundidad, los indicadores antes mencionados. Para ello, se estudiaron 2 tipos de riego, por medio de irrigación y asperjado, en comparación a un testigo no regado por 45 días (Demarco *et al.*, 2020), utilizando el índice de estabilidad de membrana (IEM), (CRA), (NDVI) y contenido de índice de clorofila utilizando un medidor de índice de clorofila, Soil Plant Analysis Development o por sus siglas SPAD). Si bien el tiempo de ensayo fue relativamente corto, se concluyó que los indicadores más sensibles al tipo de riego fueron CRA y NDVI. También se realizaron estudios, utilizando los mismos indicadores a CC y sin riego en estaciones frías y cálidas, siendo el NDVI el indicador más sensible a la falta de agua, denotando mayor sensibilidad en las mediciones a las 12:00 del mediodía (8:00 vs 12:00) (Ríos *et al.*, 2020). En base a los antecedentes previamente mencionados, en este trabajo, se utilizaron indicadores destructivos (CRA) y no destructivos (NDVI) para monitorear el estrés hídrico durante los 3 meses de ensayos con 2 años de repetición. Con los datos semanales de NDVI, se construyó un modelo que se ajustó al tipo polinómico el cual representó el monitoreo del estrés hídrico de las plantas de ananá durante 3 meses, siendo los modelos diferentes de acuerdo al tipo de tratamiento hídrico (100%, 50% y 25% CC).

Las mediciones de NDVI al no ser destructivas se realizaron cada 7 días, obteniéndose resultados significativos entre los 3 tratamientos a partir del primer mes de iniciado el ensayo,

lo cual coincidió con lo obtenido por Ríos et al. (2020) tanto en estación fría como en estación cálida. En cuanto al CRA, se muestraron las hojas “D” en los meses 1, 2 y 3 de los tres tratamientos, observándose diferencias significativas en el mes 2 en los tratamientos 50% y 100% CC respecto al tratamiento 25% CC, mientras que en el mes 3 hubo diferencias significativas entre los tres tratamientos ($p<0,05$). Ríos et al. (2020) encontraron diferencias significativas entre tratamientos regados a CC y no regados en hojas de ananá (variedad Cayena lisa) según la época del año, en la estación cálida a los 7 días y en la fría a los 60 días, esto se explica debido a las temperaturas más altas en la estación cálida y con una evaporación más rápida del contenido de agua en la maceta. En otro estudio realizado en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste, Sugita et al. (2022) estudiaron dosis de riego bajo invernadero en hojas del cultivo de ananá (cayena lisa), donde en el CRA no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, mientras que con NDVI se obtuvieron valores significativamente mayores para las dosis de riego más altas a los 15 días de iniciado el ensayo.

2. Caracterización del extracto crudo de tallo y hoja ante diferentes condiciones de estrés hídrico

2.1 Concentración de proteínas

Si bien no existen antecedentes de variación de proteínas en extractos de hojas y tallos por estrés hídrico en ananá, existe un mecanismo de respuesta en general para todas las plantas. La respuesta al estrés hídrico induce cambios fisiología de las plantas incluyendo la regulación osmótica, la expresión de proteínas y los cambios morfológicos. También se suman mecanismos de resistencia de las plantas a la sequía, destacando la detección de señales de estrés y la producción de moléculas señalizadores como el ácido abscísico y el calcio. Estas señales desencadenan la expresión de genes relacionados con la resistencia al estrés hídrico para la supervivencia de las plantas en condiciones de sequía (Yang et al., 2021). En este ensayo se encontraron variaciones de proteína en extracto de tallo de 1,54 mg/mL - 1mg/mL al 100%CC; mientras que en hojas fue de 0,23 mg. mL - 0,18 mg/mL al 100%CC. Khairunnisa et al. (2018) en Indonesia, encontraron que la concentración de proteínas en tallo alcanzaba valores de 0,84 a 1,24 mg/mL. Por otro lado, Soares et al. (2012)

en el cultivar Perola obtuvieron una concentración proteica de 0,20 mg/mL en extracto crudo de tallo. En el caso del cultivar Española Roja, informaron que la concentración de proteínas en extracto de tallo fue de 4,8 mg/mL y 2,9 mg/mL en hojas. En otros estudios, en India, sin especificar el cultivar, se encontró menor concentración de proteínas en hoja (2,08 mg/ml) que en tallo (6,2 mg/mL) (Bhagavathy *et al.*, 2019). Como se mencionó previamente, las concentraciones en diferentes órganos de la especie *Ananas comosus* puede variar debido al cultivar, ambiente y edad de la planta (Vilanova *et al.*, 2012). Por lo tanto, se espera que, en tallo y hoja, la concentración de proteínas en las plantas del tratamiento con 100% CC aumente significativamente en comparación con las plantas estresadas (50% y 25% CC) a medida que avanzó el experimento de estrés hídrico.

2.2 Actividad proteolítica

En primer lugar, se utilizó un sustrato proteico como la azocaseína, que no es específico para bromelina de tallo, ya que la bromelina de tallo es la proteasa predominante (90%) en los extractos provenientes del mismo, junto a otras dos peptidasas menores, ananaína y comosaína (Harrach *et al.*, 1998). En el caso de los tratamientos no estresados (100%CC) y los estresados hídricamente (50% y 25% CC), en el mes 1 de ambos años de ensayo, ya se obtuvieron diferencias significativas, con mayor actividad proteolítica en las plantas estresadas. En este estudio, si bien la actividad proteolítica tardó más en diferenciarse en el año 1 que en el año 2, las hojas estresadas (25% y 50% CC) tuvieron mayor actividad proteolítica, con diferencias estadísticas en el mes 3 del año 2 de ensayo entre los tres tratamientos.

Estudios previos comprobaron la presencia de bromelina en extractos de hojas de ananá (Arshad *et al.*, 2014) sin tratamiento de estrés hídrico. Existen antecedentes que demuestran que las proteasas de las hojas de ananá pueden variar según la concentración de CO₂ y O₂, siendo mayor la actividad de la proteasa de la hoja suministrando, de manera externa, CO₂ por la noche y disminuyendo el O₂ (Daley y Vines, 1978). Recientemente, Huang *et al.* (2023) utilizaron a la actividad enzimática de bromelina de tallo, obtenida a partir de los extractos crudos de hojas (cultivares MD-2 y Tainong- 16), como indicador de estrés hídrico con el sustrato azocaseína. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la azocaseína no es un

sustrato específico y se necesitan estudios de mayor profundidad para asociar el estrés hídrico con un aumento en la actividad de la bromelina.

2.3. Zimograma y su relación con las proteínas detectadas con electroforesis SDS-PAGE

En base a los resultados de la actividad proteolítica con azocaseína (ítem 3.2.2) no se puede asegurar con certeza que la bromelina fue la responsable del aumento de actividad en los tratamientos con estrés hídricos se procedió a probar otros métodos para poder inferir que la misma se debe a la bromelina del tallo.

En líneas generales, tanto en extractos de hojas y tallos, a medida que avanzó el ensayo y aumentó el grado de estrés hídrico, mayor fue la degradación gelatinolítica en los zimogramas.

2.3.1 Extractos de tallos

En el mes 1 del experimento, la actividad gelatinolítica del extracto de tallo a 100% CC se observaron bandas claras de degradación de gelatina a los 25 kDa y alrededor de los 27 kDa. También se observó una banda clara no definida que tuvo actividad desde los 53 hasta los 64 kDa. La banda proteica de 25 kDa de electroforesis podría ser la responsable de la actividad gelatinolítica que se marcó en la zimografía a los 23 kDa. En el tratamiento 50% CC se observó una leve actividad gelatinolítica a los 23 kDa, luego una más intensa a los 28 kDa. Por encima de los 28 kDa se siguió observando una actividad proteolítica hasta los 52 kDa, probablemente pueda deberse a las proteínas presentes en la electroforesis en ese rango (34 y 31 kDa). En los tallos sometidos a estrés hídrico 50% CC se observaron 2 bandas proteolíticas de mayor peso molecular con actividad gelatinolítica, una más intensa de 68 kDa y otra de menor intensidad de 79 kDa. En el tratamiento 25% CC, se observaron las mismas 5 bandas con el mismo patrón de comportamiento en cuanto a actividad gelatinolítica que en el tratamiento 50% CC (24, 28, 51, 66 y 78 kDa). Probablemente las bandas de proteínas de electroforesis del tratamiento 25% CC de 24 kDa y 30 KDa sean las responsables de la actividad gelatinolítica; además de tener pesos moleculares semejantes a la bromelina del tallo (Chang *et al.*, 2021).

En el mes 2 del ensayo, el zimograma de los extractos de tallo no mostró un claro aumento de la actividad gelatinolítica con el incremento del estrés hídrico. En la actividad gelatinolítica del extracto de tallo a 100% CC se observó actividad proteolítica a los 80 kDa. Se detectó una alta actividad proteolítica de 60 a 30 kDa. Luego se evidenció una banda más definida a los 25 kDa con baja actividad a comparación de las enzimas anteriores de la misma muestra.

En el mes 3, en comparación con el zimograma del mes 2 de tallo, se puede ver claramente que, a mayor estrés hídrico, aumenta la actividad gelatinolítica. La actividad proteolítica del tratamiento 100% CC mostró bandas claras a la altura de pesos moleculares de 89, 75, 55, 43, 30 y 24 kDa. El extracto de tallo del tratamiento 50%CC detectó actividad a los 91 y 77 kDa, y luego una alta actividad proteolítica en el rango de pesos moleculares de 60 a 28 kDa. Luego se observó una banda clara a los 25 kDa, la cual podría corresponderse con la proteína detectada a los 25 kDa en la electroforesis. En el tratamiento 25% CC se observa actividad a por encima de los 94 kDa y una banda clara ancha a los 94 kDa. Luego se detecta una alta actividad aproximadamente a 78 kDa y mayor actividad proteolítica desde los 60 hasta 28 kDa nuevamente en ese rango. Cabe destacar que en la electroforesis del mismo mes se detectaron proteínas de 43, 40 y 28 kDa que pueden ser las responsables de la actividad gelatinolítica. Por último, en el mes 3, se intensificó la banda de 25 kDa en el zimograma

2.3.2 Extractos de hojas

En el zimograma de extracto de hoja del mes 1 del experimento, se observó la actividad gelatinolítica en las correspondientes bandas proteicas observadas en la electroforesis de 16-17 kDa y una banda clara bien marcada a los 22 kDa que no se vio en la electroforesis 100%CC. En el caso del tratamiento 50% CC las bandas proteicas que tuvieron actividad gelatinolítica fueron las de 16, 18, y 22 kDa; mientras que se encontraron otras bandas claras con actividad gelatinolítica (25 y 60 kDa) que no fueron identificadas en la electroforesis. En el tratamiento con mayor estrés hídrico (25% CC) se observaron bandas proteicas de 17 y 22 kDa con actividad proteolítica y por el otro lado se encontraron bandas de actividad (26, 62 y 72 kDa) que no se correspondieron con la aparición de bandas proteicas de la electroforesis.

Continuando con mes 2, los resultados de los zimogramas muestran claramente que, a medida que se incrementó el nivel de estrés hídrico, se observó una tendencia en aumento en la actividad gelatinolítica. La actividad proteolítica del tratamiento 100% CC mostró bandas claras a los 77, 31 y 24 kDa, sin embargo, estas bandas no se observaron en las electroforesis, ya que las que se encontraron fueron de menor peso molecular. Una de las bandas proteicas de electroforesis de peso molecular más semejante a la que se podría atribuir la actividad gelatinolítica es la de 27 kDa. En el tratamiento 50 % CC se observó una mayor degradación gelatinolítica correspondiente a pesos moleculares de 77, 37 kDa; además se detectó una alta actividad gelatinolítica desde 31 hasta 26 kDa, y luego otras bandas bien marcadas de 23 y 19 kDa. En el tratamiento de mayor estrés (25% CC), se observa una mayor actividad gelatinolítica entre los rangos de 20 a 30 kDa y de mayores pesos moleculares (84, 71, 62 kDa). En el mismo tratamiento, se pudo observar una alta actividad proteolítica desde los 42 hasta los 28 kDa, en donde se puede destacar la actividad alrededor de los 28 kDa por el ancho de la banda en la zimografía. Otras enzimas con actividad gelatinolítica se correspondieron con pesos de 20 y 18 kDa. Las bandas proteicas 19 y 27 kDa de la electroforesis podría corresponderse con la actividad proteolítica de la zimografía en esos pesos moleculares.

Finalmente, en el mes 3 la actividad gelatinolítica del tratamiento 100% CC mostró bandas claras a la altura de pesos moleculares de 71, 27, 22 y 20 kDa. De los cuales, las bandas claras que demuestran actividad gelatinolítica se podrían corresponder con las proteínas de la electroforesis con pesos de 27, 22 y 20 kDa. En los tratamientos con estrés hídrico como el 50 % CC, se observaron bandas de 72, 62, 36 kDa. Luego se observó una alta actividad proteolítica desde los 29 hasta los 25 kDa. Esto podría deberse a una mayor actividad por parte de la proteína de 27 kDa detectada en la electroforesis del mismo tratamiento. También se detectaron bandas de 22 y 20 kDa, las cuales podría atribuirse a las proteínas del mismo peso molecular. En el tratamiento 25 % CC, los geles mostraron bandas de alto peso molecular como: 73, 65, 58, y 51 kDa. También se observó una banda bien marcada de 41 kDa. Luego se volvió a detectar una alta actividad proteolítica desde los 40 hasta los 25 kDa, la cual podría deberse nuevamente a la proteína de 27 kDa. Además, se observaron más

bandas claras a la altura de 22 y 20 kDa pudiendo corresponderse a las proteínas del mismo peso molecular y tratamiento.

3. Caracterización del Aislado enzimático

3.1 Actividad proteolítica con sustrato sintético LNPE

Como se mencionó previamente, la azocaseína es un sustrato proteico no específico, por lo que cualquier enzima proteolítica puede actuar sobre ella. Es por ello que se comprobó la actividad con el sustrato sintético LNPE con alta especificidad a la bromelina del tallo (Silverstein, 1974), utilizando los aislados de tallo y hoja de los 3 tratamientos (100%, 50% y 25%CC) del mes 3. La actividad sobre este sustrato nos podría confirmar si varía la actividad de la bromelina de tallo en plantas sometidas a estrés hídrico. Según los resultados obtenidos, la actividad aumentó significativamente a mayor estrés hídrico en aislados de hojas obteniendo diferencias estadísticas entre los 3 tratamientos. En el caso del aislado de tallo, se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento no estresado (100%CC) vs estresados (50% y 25%CC). Estos resultados sugieren que la bromelina del tallo responde al estrés hídrico en plantas de ananá, y que su respuesta es más evidente en hojas que en tallo.

3.2 Separación cromatográficas por intercambio catiónico

La bromelina comercial, nominalmente de un peso molecular de 28 kDa, puede existir como una mezcla de distintas isoformas e incluso, al sembrar en una electroforesis SDS-PAGE, se pueden encontrar fragmentos de bajo peso molecular que se originan por degradación de las mismas en enzimas. Esto explicaría que, al sembrar una alícuota de bromelina comercial para la separación cromatográfica en FPLC, no se visualizó un único pico. Por este motivo, se realizó una separación cromatográfica por intercambio catiónico de la bromelina comercial (SP- High Performance). De esta muestra se obtuvo una fracción no retenida, que pertenece a la fracción acídica de la bromelina de tallo y 3 picos que eluyeron a medida que se aumentó el gradiente salino. La electroforesis de las eluciones de la bromelina comercial presentó bandas proteicas de 16, 22, 25 y 28 kDa. En la fracción no retenida se observaron proteínas

de 16 y 21 kDa, mientras que Matagne et al. (2017) al realizar el mismo tipo de cromatografía con bromelina comercial encontraron bandas de 24 y 28 kDa para la fracción no retenida.

En este estudio, la cromatografía de la bromelina comercial, produjo un primer pico correspondiente a una proteína del peso molecular de 23 kDa, y un segundo pico, con mayor absorbancia, a proteínas de 16, 22 y 25 kDa. El ultimo pico, de menor absorbancia que el segundo, se encontró una sola proteína de 16 kDa de peso molecular. Para comprobar cuales fracciones tenían actividad, se realizó un ensayo de actividad proteolítica con azocaseína. Al realizar el ensayo de actividad proteolítica sobre las eluciones de mayor absorbancia, todas demostraron tener actividad proteolítica, siendo el pico 2 el de mayor actividad, el cual fue eluido a los 23 minutos de iniciada la cromatografía.

La cromatografía de las muestras de tallo y hoja de mayor actividad proteolítica (mes 3, 100 y 25 % CC), se procesaron de la misma manera (tipo de columna y *buffers*) que la cromatografía de bromelina comercial para que sirva como modelo a comparar e inferir si las proteínas retenidas tienen relación con la bromelina del tallo en los tratamientos no estresados (100%CC) vs estresados (25%). En primer lugar, tanto aislados enzimáticos de hojas y tallos tuvieron una fracción sin retener y un solo pico que se retuvo a los 23 minutos de iniciada la corrida cromatográfica como sucedió con la bromelina comercial. También, mediante la medida de absorbancia a 280 que representa el contenido de proteína, se pudo diferenciar estadísticamente que hubo mayor proteína en las hojas y tallos estresados (25%CC) que en los no estresados (100%CC) en el pico retenido.

En cuanto a las electroforesis SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de la columna. El pico 1 de la muestra de hojas 100% CC y 25% CC obtuvo una sola banda de 22 kDa. El pico 1 mostró dos bandas proteicas, 12 y 25 kDa, intensificándose el pico 1 del aislado de tallo 25%CC. La actividad de dichos picos retenidos en hoja y tallo, aumentaron significativamente ($p < 0,05$) en el tratamiento 25% CC vs 100%CC.

Conclusiones parciales

Se utilizaron como indicadores del estrés hídrico el NDVI y CRA, los cuales fueron sensibles a diferentes momentos de muestreo. El indicador no destructivo, NDVI, mostró disminución en sus valores conforme avanzaban los tratamientos de estrés hídrico, observándose al segundo mes del tratamiento diferencias significativas entre los 3 tratamientos. En cuanto al CRA, recién en el mes 2 se encontraron diferencias entre los tratamientos, acentuándose en el mes 3. Esto denota la importancia de un indicador sensible y no destructivo como el NDVI para detectar estrés hídrico en ananá. La caracterización de los extractos de ananá de tallo y hoja, mostraron mayor actividad proteolítica sobre azocaseína y mayor concentración de proteína al aumentar el estrés hídrico. La concentración de proteínas en tallo fue mayor que en hoja, como era de esperarse, pero a comparación de otros autores, la concentración de proteína en ambos órganos sin someterlos a estrés hídrico fue menor. Las técnicas utilizadas para caracterizar el peso molecular de las proteínas y su actividad gelatinolítica fue diferencial en cuanto al tipo de órgano y nivel de estrés hídrico. En general, en el caso del extracto de tallo se encontraron varias proteínas a medida que aumentó el nivel de estrés, pero la banda más marcada y con mayor actividad gelatinolítica fue la de 25 kDa. En el caso de del extracto de hoja, también se observaron varias proteínas, predominando la de peso molecular de 22 kDa con mayor actividad gelatinolítica al aumentar el estrés hídrico. Al comparar los perfiles de la bromelina comercial con los perfiles de tallo y hoja se encontró un pico que se retuvo al mismo tiempo durante la cromatografía (23 min). En la bromelina comercial esos picos se correspondieron a proteínas de 16, 22 y 25 kDa (23 min). En el caso del pico del aislado de hoja se correspondió con una banda de 22 kDa y con el aislado de tallo dos bandas proteicas de 12 y 25 kDa (23 min). Los picos de retención ambos aislados presentaron mayor actividad proteolítica el tratamiento estresado (25%CC) que en el no estresado (100%CC). Finalmente, la actividad con LNPE fue mayor con los tratamientos estresados, tanto en hoja como en tallo, por lo que se podría inferir que a mayor estrés hídrico hay mayor actividad de la bromelina del tallo.

Capítulo IV

**Evaluación del uso de las proteasas
cisteínicas de *Ananas comosus* L. Merr y
Bromelia serra Griseb. como producto
orgánico para el control de
microorganismos fitopatógenos**

Introducción

Existen compuestos de origen natural y otros productos naturales que pueden tener aplicaciones en el control de patógenos en los alimentos (Delaquis y Mazza, 1995; Bowles y Juneja, 1998). El uso de agroquímicos se utiliza comúnmente para controlar las enfermedades fúngicas o microbianas en los cultivos, sin embargo, es ampliamente difundida la relevancia que están teniendo los estudios en la ciencia de la agroecología sobre productos con actividad biológica o biopesticidas de origen natural que pudieran sustituir a los agroquímicos que impactan sobre el medio ambiente, siendo en ciertos casos de manera desmedida.

El concepto de biopesticidas se introdujo para reducir los impactos peligrosos de los pesticidas de origen sintético en el medio ambiente. Los biopesticidas incluyen microorganismos o extractos de dichos organismos o plantas que solo causan daños a plagas y/o patógenos de cultivos. Además, en su mayoría no dejan efectos adversos ni secundarios en la planta ni en el medio ambiente. Los biopesticidas pueden considerarse como los mejores sustitutos posibles de los pesticidas de origen químico porque son altamente eficientes, específicos y no tienen ningún impacto sobre el medio ambiente. Los biopesticidas se diferencian de los pesticidas químicos por su configuración y mecanismos. La estructura de los biopesticidas es diferente ya que se obtienen de la naturaleza luego de pequeñas intervenciones biotecnológicas. Según el ingrediente activo presente, los biopesticidas se agrupan en biopesticidas microbianos y biopesticidas botánicos según US EPA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos). Se han identificado más de 6000 especies botánicas que tienen potencial para eliminar plagas y que también se utilizan como insecticidas. Una gran variedad de estos se ha obtenido de plantas como el neem (*Azadirachta indica*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y el piretro, que se utilizan como pesticidas más seguros.

Los pesticidas derivados de plantas muestran una actividad residual mínima y afectan a un número mínimo de especies de insectos benéficos y muestran compatibilidad con los programas de manejo integrado de plagas (MIP) (Xu *et al.*, 2011). Sin embargo, la difusión de biopesticidas de origen vegetal al momento se ve dificultada por la falta de un riguroso

control de calidad y estandarización del producto. Cabe aclarar que, al igual de los pesticidas sintéticos tradicionales, los biopesticidas, pueden generar resistencia a las plagas si se usan en cantidades inadecuadas y excesivas además de causar fitotoxicidad en los cultivos (Stevenson *et al.*, 2012).

Los biopesticidas son herramientas de manejo de plagas que fueron introducidas con el único motivo de controlar insectos y plagas sin dañar el medio ambiente, que incluye tanto el suelo como el perfil del agua del lugar de origen. El medio ambiente tiene implicaciones directas e indirectas para los humanos y otras formas de vida que residen y habitan el lugar o para quienes consumen los productos obtenidos mediante el uso de pesticidas de origen químico (Wani y Lee, 1995). Después de una serie de exploraciones científicas, los biopesticidas salieron a la luz como sustitutos de los pesticidas sintetizados químicamente. Los biopesticidas se sintetizan con la ayuda de microbios, extractos de plantas y otros principios biológicamente activos.

Los biopesticidas se clasifican principalmente en tres categorías amplias según sus métodos de acción, (1) bioquímicos (hormonas sexuales de insectos), (2) fitoprotectores insertados (pesticidas botánicos como aceite de neem, rotenona, suspensión de tabaco, etc.), y (3) pesticida-agrocina asistida por plantas extraída de *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma*. El uso de biopesticidas en el campo está ganando reconocimiento con el tiempo a medida que los agricultores y los cultivadores actuales son muy conscientes de los impactos negativos asociados con el uso de pesticidas de origen químico. Los agricultores ahora están cambiando a biopesticidas porque entienden qué es mejor para ellos y para los consumidores y a su vez los consumidores exigen productos seguros, orgánicos, a base de hierbas y plantas.

En cuanto a la importancia del control de las enfermedades que afectan a los cultivos en todo el mundo, se ha estimado que 67.000 especies de plagas dañan los cultivos (Ross y Lembi, 1985). Las enfermedades fúngicas y bacterianas son difíciles de curar, por lo que la principal preocupación es controlar y prevenir su crecimiento para evitar daños al rendimiento. En el caso de países como Argentina, donde se cultiva un gran número de variedades de cultivos por su diversidad climática, las prácticas culturales ampliamente divergentes en boga agravan

los problemas de control de las enfermedades de las plantas. Las pérdidas causadas tanto al cultivo como a las plantas individuales pueden clasificarse como pérdidas directas o indirectas. Las pérdidas directas consisten en pérdidas primarias y secundarias. Las pérdidas de rendimiento primario afectan no solo la cantidad de producto sino también la calidad, el precio de control, el costo excedente de la cosecha, el costo excedente de la clasificación, los costos de los reemplazos y la pérdida de ingresos por cultivos de reemplazo menos rentables. Las pérdidas secundarias se deben al deterioro del material de siembra y de plantación, a las enfermedades transmitidas por el suelo, al debilitamiento por la defoliación prematura de árboles/plantas perennes, al costo del control de enfermedades inesperadas, entre otras. Las pérdidas indirectas están relacionadas principalmente con las explotaciones agrícolas, las comunidades rurales, los exportadores, las empresas mayoristas y comercio minorista, consumidores, legislación, problemas medioambientales.

Los extractos de plantas que muestran propiedades biocidas se analizan para determinar su eficacia en el laboratorio y si se encuentra que la eficacia es significativa, se diseña la formulación. Si la toxicidad es insignificante, se puede conceder el registro. Regnault-Roger et al. (2005) mencionaron dos generaciones de pesticidas botánicos: la primera en la que se incluyen extractos crudos como extracto de neem, nicotina, rotenona, rinia, piretro y aceites esenciales, y la segunda generación consiste en piretroides sintéticos y azadiractina y otros nuevos botánicos potenciales. Los fitoquímicos cuya formulación requiere avances biotecnológicos pueden funcionar como pesticidas superiores a los pesticidas ya disponibles.

Las enfermedades bacterianas de los vegetales son causadas principalmente por miembros de los géneros: *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Xanthomonas*, *Spiroplasma*, *Phytoplasma* y muchos otros. La Revolución Verde en la producción de cultivos de cereales ha generado confianza en la opinión pública respecto de la satisfacción de las futuras necesidades alimentarias de la creciente población. Hay varias enfermedades devastadoras, como la plaga bacteriana (*Pyricularia oryzae*) del arroz (*Oryza sativa*), que se observa ampliamente en Asia tropical, donde vive aproximadamente el 60% de la población mundial (Asuntos UNDES 2011). El quitosano (poli-D-glucosamina) se está incorporando recientemente a los biopesticidas. Las bacterias son hipersensibles al quitosano y sus derivados, por lo que se

podría esperar que el quitosano proteja a la planta de enfermedades bacterianas (Hassan y Chang, 2017). El quitosano exhibió actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, respectivamente; estos se incorporaron en nanocápsulas huecas biodegradables (Pinheiroa *et al.*, 2015).

A partir de extractos crudos de tallo de *Ananas comosus*, se ha demostrado que, al extraer la bromelina del tallo, para luego analizar su actividad anti fúngica y antimicrobiana, inhibió en un 90% el crecimiento de *Fusarium verticilloides* (Lopez-Garcia *et al.*, 2012) y 70-95% el crecimiento de microbiano de *Bacillus subtilis* y *Candida albicans* (Dutta *et al.*, 2013). La acumulación de enzimas proteolíticas como la bromelina se da en grandes cantidades en el tallo, el cual es un residuo en la cosecha, ofreciendo un modelo atractivo para su rápida y conveniente producción como uso terapéutico en las plantas y alternativa al uso de fungicidas químicos y antimicrobianos (Lopez-Garcia *et al.*, 2012).

De los resultados en cuanto a actividad proteolítica del capítulo III, donde los extractos de ananá obtenidos de hojas y tallos que fueron estresados hídricamente obtuvieron mayor actividad proteolítica de bromelina de tallo, se podría decir que tienen una mayor tendencia de actuar como potenciales inhibidores del crecimiento bacteriano y fúngicos.

Las enzimas proteolíticas de diferentes especies de la familia Bromeliaceae han sido estudiadas anteriormente, pero solo han caracterizado el fruto de *Bromelia serra* Griseb (Caffini *et al.*, 1988, Salesse *et al.*, 2022). La mayoría de las proteasas investigadas dentro de la familia Bromeliaceae se derivan de sus frutos. Sin embargo, la presencia de estos frutos depende de las condiciones climáticas o de la época predominante de floración. En cambio, la disponibilidad de hojas y tallos se mantiene constante, y en el caso de *Bromelia serra* es notablemente abundante. En este sentido, Gómez Herrera *et al.* (2022) caracterizaron la actividad proteolítica de hojas de *Bromelia serra* en extractos crudos y aislados enzimáticos, mostrando características y propiedades interesantes para la industria alimentaria. Esto posiciona a los aislados de enzimas de hojas de *Bromelia serra* como fuentes potenciales de compuestos bioactivos, por lo que es necesario continuar estudiando su aplicación para diferentes usos, así como la aplicación de extractos de otros órganos de la planta del ananá.

El objetivo de este capítulo fue evaluar el uso de las proteasas cisteínicas de *Ananas comosus* L. Merr y *Bromelia serra* Griseb. como producto natural para el control de microorganismos fitopatógenos.

Materiales y métodos

1. Material vegetal y microorganismos fitopatógenos

Los ejemplares de Bromeliaceae cultivadas *Ananas comosus* (AC) bajo estrés hídrico, fueron cultivados en el Campo Didáctico Experimental de la Facultad de Cs. Agrarias (UNNE). Se muestrearon hojas de *Bromelia serra* (BS), Bromeliaceae a nativa proveniente de montes naturales de la región de la localidad de Santa Ana, Corrientes, Argentina.

*1.1 Obtención de aislados enzimáticos de hojas *Bromelia serra* (AEB), de tallo de *Ananas comosus* (AEAt) y hoja (AEAh)*

Preparación del extracto de tallo y hojas de AC y hojas de BS. Los tallos y hojas provenientes de Bromeliaceae cultivadas (AC) y nativa (BS) se lavaron con solución de peróxido de hidrógeno al 0,1 %. Ambos fueron cortados en pequeños trozos, pesados y triturados con una procesadora eléctrica en *buffer* fosfato de sodio (0,1 M) pH 7 conteniendo EDTA (5 mM) y cisteína (5 mM) en una proporción 1 g hoja/mL *buffer* y 0,5g tallo/mL *buffer*. La suspensión se mantuvo en agitación en un baño de hielo durante 40 minutos, luego se filtró usando tamiz de malla gruesa y el filtrado fue dividido en alícuotas de 1 mL y conservado a -18°C hasta su empleo. Los extractos fueron precipitados con 4 volúmenes de acetona para luego resuspenderlos en sus correspondientes *buffers*, los cuales fueron autoclavados para evitar contaminación proveniente de los mismos. Los pellets resuspendidos en *buffers* se denominaron aislados enzimáticos de *Bromelia serra* (AEB), aislado enzimático de *Ananas comosus* de tallo (AEAt) y hoja (AEAh)

1.2. Microorganismos fitopatógenos

Las bacterias y hongo fueron proporcionadas por el Laboratorio de Fisiología Vegetal e Interacción Planta-Microorganismo (Instituto Botánico del Nordeste - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas): *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xm), *X. citri* pv. *Citri* (Xc), *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (Cmm), *Ralstonia solanacearum* (Rs), *Pseudomonas syringae* pv. *Tomate* (Pse) y *Fusarium oxysporum* (Fo).

2. Actividad antimicrobiana

2.1 Activación de bacterias

Se procedió a la activación de las siguientes bacterias en medio Agar Tripticasa de Soja (TSA): *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, *Xanthomonas citri* pv. *citri*, *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*, *Ralstonia solanacearum* y *Pseudomonas syringae*.

2.2. Actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en disco en placa.

Los cultivos de las bacterias de Xc. Xm, Cmm, Pse y Rs se realizaron utilizando TSB (Caldo de Tripticasa de Soja) y se incubaron durante 48 horas, en agitación a temperatura ambiente (24°C).

Se embebieron discos de papel de filtro estériles (Whatman Nº 2 de 6 mm de diámetro) con 10 µl de los aislados enzimáticos de AC y BS. Los discos se dejarán secar a temperatura ambiente. Se sembraron 0,1 ml de inóculo equivalente a 10^8 UFC (Unidades formadoras de colonias) /mL en placas con TSA y se colocaron los discos de papel de filtro embebidos en los aislados proteicos. Se incubaron las placas a 28°C durante 24 horas y se midió el diámetro de la zona de inhibición (Demo *et al.*, 2005, Lambir *et al.*, 2022). Se realizaron controles positivos (antibiótico: estreptomicina) y controles negativos: *buffer* de los extractos (De Pooter *et al.*, 1995).

2.3. Determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM) de crecimiento bacteriano por técnica de microdilución en microplacas con resazurina utilizando la técnica de Prieto *et al.* (2020).

2.3.1 Determinación de la concentración inicial de células

A partir de las suspensiones bacterianas se realizaron diluciones seriadas factor 10 hasta la dilución 10^{-5} . En microplacas estériles de 96 pocillos se colocaron 170 μl de estas diluciones, desde la columna 1 a la 5. Luego se agregarán 20 μl del diluyente (agua estéril) y 10 μl de solución de resazurina al 0,01%. Se incubó la placa durante 4 horas 28 °C y se eligió como dilución de trabajo la primera incapaz de reducir la resazurina (azul). La visualización se fundamenta en la capacidad que tienen los microorganismos vivos, a determinada concentración ($\sim 10^{-6}$), de reducir la resazurina. El color azul (estado oxidado) indica una concentración de células incapaz de reducir la resazurina y el rosado (estado reducido) indica la concentración adecuada que reduce la resazurina.

2.3.2 Detección de inhibición

En una microplaca de 96 pocillos, desde el 1 al 10, se colocaron 170 μl del cultivo microbiano en TSB, con una densidad de inóculo apropiada incapaz de reducir la resazurina (seleccionadas en el paso anterior, 3.1). Se agregaron a cada pocillo 20 μl de extractos a probar. Se incubó la microplaca durante 22 horas a 28°C y luego se agregó 10 μl de una solución sal sódica de resazurina al 0,01% en cada pocillo. Nuevamente, la placa se incubó durante 2 horas a 28 °C, determinando la inhibición visualmente (color azul). Cada tratamiento se sembró por duplicado y se repitió el ensayo al menos 2 veces.

2.3.3 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

En este caso se utilizaron eppendorfs estériles para aumentar el volumen de aislado enzimático y también se trabajó con diluciones al 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 para tallo y hoja de AC y hojas de BS. También se ensayó con bromelina comercial marca Sigma (0,1 mg/ ml) con diluciones al 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32. En los eppendorfs se colocaron 42,5 μl del inóculo y 400 μl de los aislados y sus diluciones. Se incubaron los eppendorfs durante 22 horas a 28°C y luego se agregó 10 μl de una solución de resazurina al 0,01% en cada eppendorf. Nuevamente, los eppendorfs se incubaron durante 2 horas a 28 °C, determinando la inhibición visualmente (color azul).

3. Actividad antifúngica con el método MTT

La actividad antifúngica de los aislados enzimáticos contra cepas de *Fusarium oxysporum* fue evaluada mediante técnica colorimétrica en microdilución. Este ensayo utiliza el indicador redox MTT de color amarillo pálido en estado oxidado, pero que presenta un color púrpura oscuro en su forma reducida (MTT-formazán). Esta reacción es llevada a cabo por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales activas en las células vivas (Kuhn *et al.*, 2003). La técnica se realizó según la metodología propuesta por Meletiadis *et al.* (2000), con algunas modificaciones de Camiletti (2018). El hongo creció por 10 días en medio agar papa (previamente autoclavado).

Posteriormente se realizó recuento en cámara de Neubauer sembrando 10 μ l del hongo alcanzando una concentración de conidios de 1×10^6 /mL. Posteriormente se incubó el hongo por 48 horas a 28°C con los aislados enzimáticos de hoja y tallo de AC, hoja de BS y bromelina comercial. También se hicieron los blancos del caldo de papa, aislados y suspensión del hongo. Posteriormente, 25 μ L (5mg/mL) de solución MTT fueron agregados a cada tubo y se continuó la incubación por 24 horas en oscuridad. Finalizada la incubación, los tubos se centrifugaron a 13.000 rpm por 5 minutos para obtener el MTT-formazán como precipitado. El colorante es liberado del interior de las células y disuelto mediante agregado de 100 μ L de DMSO, seguido por agitación en vórtex. Se midió la absorbancia a 550 nm de las soluciones en un espectrofotómetro. Los resultados de los tratamientos y controles son afectados por la absorbancia del blanco (tubos no inoculados). El porcentaje de inhibición de crecimiento del micelio (PIC), que corresponde a la cantidad de MTT no convertido en MTT-formazán, se calculó de acuerdo a la ecuación:

$$\text{PIC} = [(\text{AC}-\text{AT})/\text{AC}] \times 100$$

donde AC corresponde a la media (n=3) de la absorbancia para el control, mientras que AT indica la media (n=3) obtenida para la absorbancia de los tratamientos.

Resultados

1. Activación de bacterias fitopatógenas

Una vez obtenidos los aislados de AC (hoja y tallo) y BS, se activaron las bacterias fitopatógenas: *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, *Xanthomonas citri* pv. *citri*, *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*, *Ralstonia solanacearum* y *Pseudomonas syringae*. Se puede observar en la Figura 37, alguna de las bacterias activadas utilizadas en este estudio (Rs, Pse, Xm, Xc).

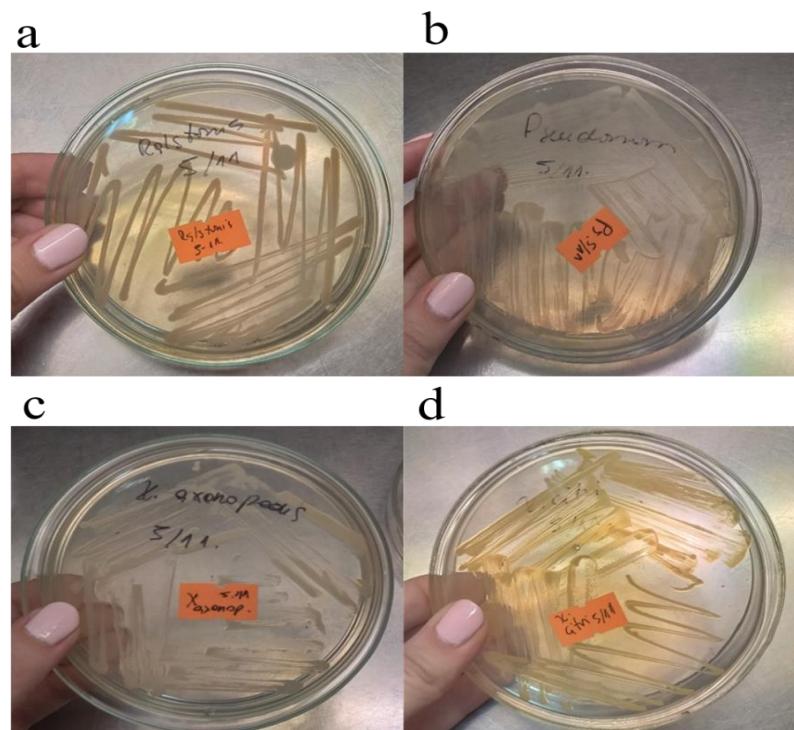


Figura 37. Activación de cepas de bacterias en medio TSA. *Ralstonia solanacearum*(a), *Pseudomonas syringae* (b), *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* (c), *Xanthomonas citri* pv. *Citri* (d).

2. Actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en disco en placa.

La actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en disco en placa se repitió tres veces para cada tratamiento (hojas de BS, tallo de AC y aislados de hojas de AC). El crecimiento de las cepas bacterianas analizadas: (*Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas*

axonopodis pv. *manihotis*, *Xanthomonas citri* pv. *citri*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Ralstonia solanacearum*) no fue inhibido por ninguno de los tratamientos (Tabla 26).

Tabla 26. Actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en disco

Tratamiento	Cepa bacteriana	Halo inhibitorio
BS aislado enzimático	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	S/I
BS aislado enzimático	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Manihotis</i>	S/I
BS aislado enzimático	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	S/I
BS aislado enzimático	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	S/I
BS aislado enzimático	<i>Ralstonia solanacearum</i>	S/I
AC aislado de tallo	<i>Pseudomonas syringae</i>	S/I
AC aislado de tallo	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Manihotis</i>	S/I
AC aislado de tallo	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>Citri</i>	S/I
AC aislado de tallo	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	S/I
AC aislado de tallo	<i>Ralstonia solanacearum</i>	S/I
AC aislado de hoja	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	S/I
AC aislado de hoja	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Manihotis</i>	S/I
AC aislado de hoja	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>Citri</i>	S/I

AC aislado de hoja	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	S/I
AC aislado de hoja	<i>Ralstonia solanacearum</i>	S/I

AC: *Ananas comosus*, BS: *Bromelia serra*, S/I: Sin inhibición

A continuación, se puede observar en la Figura 38 un ejemplo utilizando estreptomicina (S) como antibiótico (detectándose el halo inhibitorio) vs aislado enzimático de tallo de AC sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*.

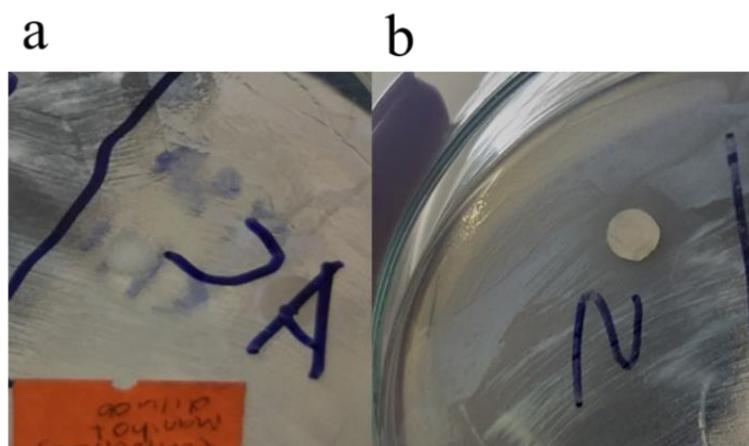


Figura 38. Césped de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* con discos de AC de tallo (a). Césped de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* con el antibiótico estreptomicina (indicado con la letra S) (b).

3. Determinación de la concentración inicial de células

La actividad antimicrobiana de los aislados de BS y AC contra las especies de bacterias y se analizó utilizando las técnicas de microdilución en caldo sobre resazurina. En este contexto, mediante la técnica de microdilución en caldo en microplacas se utilizó resazurina al 0,01% para evaluar la concentración mínima inhibitoria (CIM) para cada aislado (hojas de BS, hojas de AC y tallo de AC) frente a diferentes bacterias fitopatógenas. En primer lugar, se determinó colorimétricamente la concentración celular inicial ($\sim 10^5$ células). En la Figura

39, de *Ralstonia solanacearum* se eligió la dilución 2, *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* dilución 3, *Pseudomonas syringae* dilución 3, *Xanthomonas citri* pv. *Citri* dilución 3 y para *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* dilución 3. Para cada repetición de los tratamientos se debió hacer nuevamente la determinación de la concentración inicial de células bacterianas.

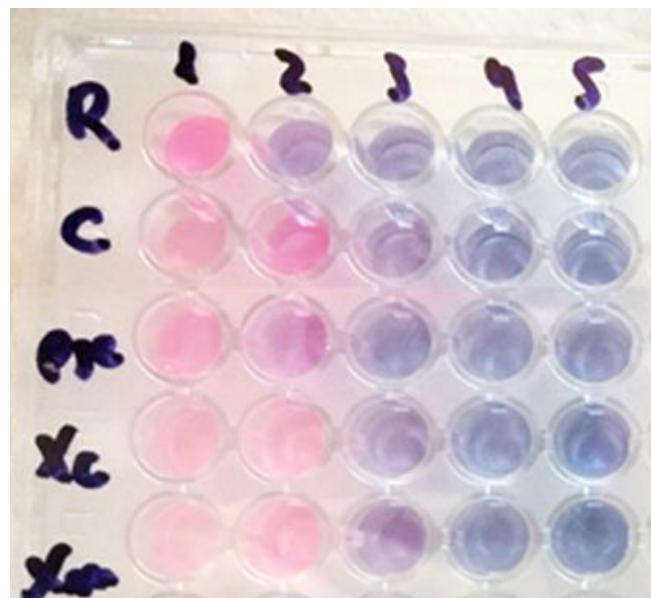


Figura 39. Determinación de la concentración inicial de células utilizando resazurina para *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* (*Xm*), *Xanthomonas citri* pv. *Citri* (*Xc*), *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (*C*), *Ralstonia solanacearum* (*R*) y *Pseudomonas syringae* (*Pse*). Los números del 1 al 5 indican diferentes concetraciones de células de cada bacteria.

3.1 Detección de inhibición y determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Los resultados de la técnica de microdilución en caldo y detección de inhibición del cultivo microbiano utilizando resazurina en una microplaca de 96 pocillos (Tabla 27) no mostraron inhibición del crecimiento de ninguna de las especies bacterianas analizadas expuestas a los diferentes aislados de enzimas o bromelina comercial (rosado, color malva). Sólo el control negativo en el que se utilizó resazurina y *buffer* no mostró crecimiento bacteriano y permaneció azul (Fig. 40).

Tabla 27. Determinación de la concentración inhibitoria mínima utilizando técnica de microdilución en caldo

Tratamiento	Bacteria	Color de la resazurina
Control Negativo	<i>Pseudomonas syringae</i>	Azul
Control Negativo	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Manihotis</i>	Azul
Control Negativo	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>Citri</i>	Azul
Control Negativo	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Azul
Control Negativo	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Azul
Bromelina comercial en diferentes disoluciones (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32)	<i>Pseudomonas syringae</i>	Rosa
	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Manihotis</i>	Rosa
	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>Citri</i>	Rosa
	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Rosa
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Rosa
Aislado de hoja de AC en diferentes disoluciones (1/2, 1/4, 1/8, 1/16)	<i>Pseudomonas syringae</i>	Rosa
	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Manihotis</i>	Rosa
	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>Citri</i>	Rosa
	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Rosa
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Rosa

Aislado de tallo de AC en diferentes disoluciones (1/2, 1/4, 1/8, 1/16)	<i>Pseudomonas syringae</i>	Rosa
	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Manihotis</i>	Rosa
	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>Citri</i>	Rosa
	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Rosa
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Rosa
Aislado de BS en diferentes disoluciones (1/2, 1/4, 1/8, 1/16)	<i>Pseudomonas syringae</i>	Rosa
	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Manihotis</i>	Rosa
	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>Citri</i>	Rosa
	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Rosa
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Rosa

Abreviaturas: AC: *Ananas comosus*, BS: *Bromelia serra*

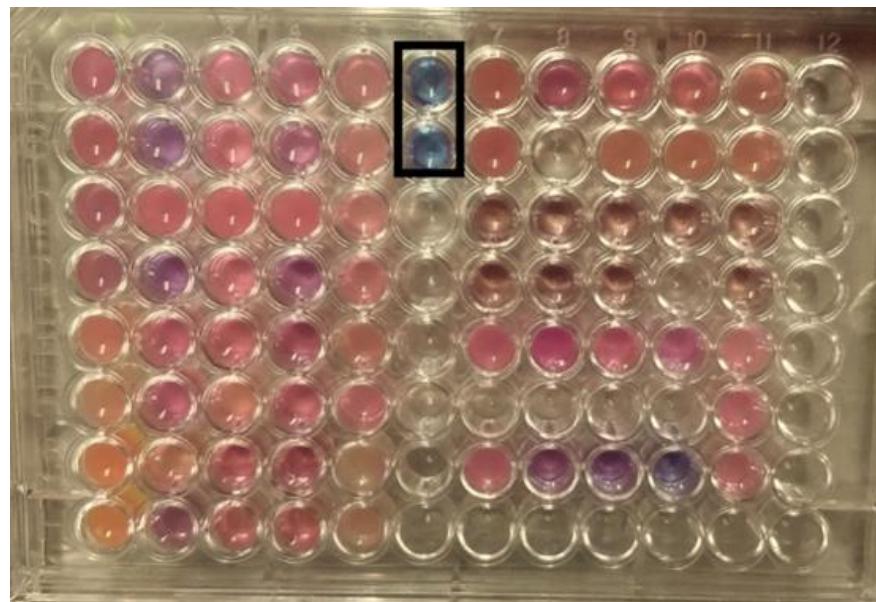


Figura 40. Técnica de microdilución en caldo. El rectángulo negro muestra el control negativo.

4. Actividad antifúngica con el método MTT

En la Figura 41 se puede observar a *Fusarium oxysporum* luego de 10 días a 28°C en placa de Petri y una muestra del mismo en el microscopio a 40X (Fig. 42). Luego se tomó una pequeña porción del hongo. Posteriormente, se raspó en el centro de la placa de Petri con un ansa y se colocó dentro de un tubo con 10 ml de agua estéril. De esa dilución se, extrajeron 10 µL y se sembraron en la cámara de Neubauer alcanzando una concentración de conidios de 1×10^6 /mL. Luego incubó el hongo por 48 horas 28°C con los aislados enzimáticos de hoja y tallo de AC, hoja de BS y Bromelina comercial. También se hicieron los blancos del caldo de papa, aislados y suspensión del hongo.

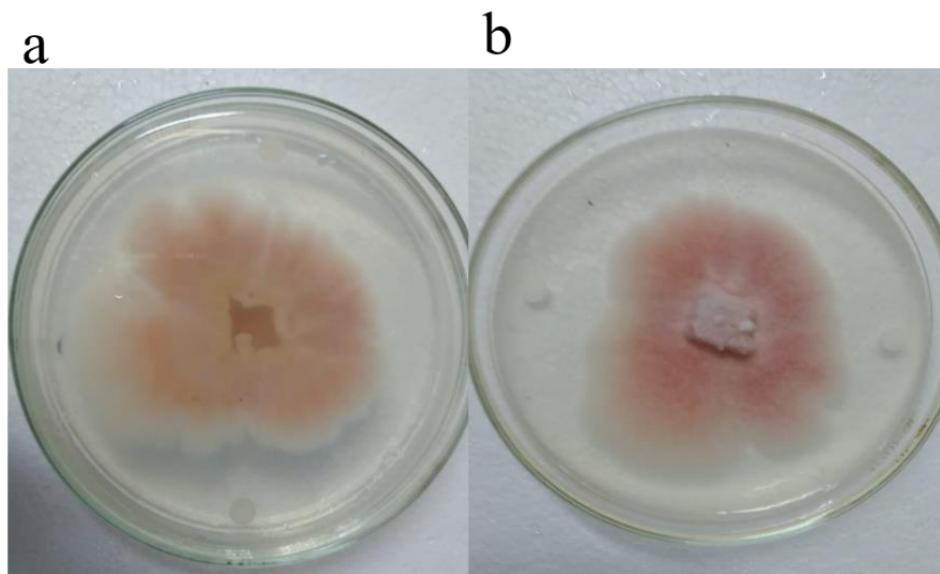


Figura 41. Crecimiento de *Fusarium oxysporum* luego de 10 días a 28°C. Vista del hongo desde el envés de la placa de Petri (a) y vista superior desde la tapa de placa (b).



Figura 42. *Fusarium oxysporum* en microscopio óptico binocular (40X). Presencia de microconidios en forma ovoide.

La actividad antifúngica de los aislados proteicos (hojas de BS, tallo y hojas de AC) y bromelina comercial contra cepas de *Fusarium oxysporum* se evaluó mediante la técnica colorimétrica de microdilución utilizando el método MTT. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 28. Cabe destacar que algunos de los porcentajes de inhibición fueron negativos. Esto se debe probablemente a la presencia de proteínas no relacionadas con enzimas en el aislado que resultó en un mayor crecimiento del hongo que en ausencia de ellas.

Tabla 28. Porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum* para diferentes aislados proteicos y bromelina comercial

Tratamientos	Porcentaje de inhibición (%)
Bromelina comercial	-59,72
Aislado enzimático de tallo de AC	-105,66
Aislado enzimático de hoja de AC	-116,33
Aislado enzimático de hoja de BS	-230,19

Abreviaturas: AC.: *Ananas comosus*, BS: *Bromelia serra*

Discusión

1. Actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en disco en placa

En este estudio, ninguno de los discos con los tratamientos de aislados enzimáticos formaron un halo inhibitorio. En otro estudio (Abdulrahman *et al.*, 2015), los extractos de ananá no inhibieron *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli*; sin embargo, sí mostró inhibición del crecimiento en *Proteus spp.* y *Corynebacterium spp.* La incubación a 24°C, demostró que la inhibición de estos extractos depende de la susceptibilidad de cada especie bacteriana. Abdulrahman *et al.* (2015) también probaron la actividad antibacteriana de los extractos de AC en varias temperaturas de incubación (24°, 37°, 45°C) y medios de

pH (7 y 10), mostrando diferentes respuestas de la inhibición del crecimiento bacteriano, lo que sugiere que las condiciones de cultivo pueden alterar la susceptibilidad bacteriana a los extractos o que los extractos pueden cambiar su bioactividad en diferentes condiciones de pH y temperatura. Por otro lado, no existen informes previos de actividad antimicrobiana de extractos de *Bromelia serra* realizados en la técnica de difusión en disco en placa contra las cepas de bacterias probadas en este estudio.

2. Utilización de técnicas colorimétricas: resazurina y MTT

Estas técnicas permiten evaluar la viabilidad celular y la proliferación de cultivos celulares en cada tratamiento, se evalúan mediante ensayos de proliferación colorimétricos, como resazurina y MTT. Estas técnicas se basan en la reducción enzimática de los compuestos MTT y resazurina mediante deshidrogenasas que utilizan NADH / NADPH como sustratos (Präbst *et al.*, 2017). La medición del contenido de NADH y NADPH está estrechamente relacionada con la viabilidad celular y la actividad metabólica. Si bien es posible realizar una medición directa de estos piridinanucleótidos, los niveles absolutos podrían no ser el indicador óptimo de la actividad metabólica, dada la importancia de su tasa de renovación. Entonces, la medición de la reducción de MTT/resazurina permite medir indirectamente el contenido de NADH/NADPH de una manera sencilla, dado que el producto coloreado resultante de la forma reducida de estos compuestos puede cuantificarse mediante métodos espectroscópicos básicos. Evaluar la tasa de recambio implica reducir selectivamente compuestos específicos, como varias sales de tetrazolio (MTT, MTS, XTT o WST) o resazurina. La reducción enzimática de estos compuestos mediante deshidrogenasas utiliza NADH/NADPH como cosustratos. El producto coloreado resultante de la forma reducida de estos compuestos se puede cuantificar utilizando métodos espectroscópicos básicos. Estos ensayos colorimétricos, que utilizan compuestos como MTT y resazurina, demuestran ser más sensibles y confiables que los métodos alternativos para probar la viabilidad celular (Präbst *et al.*, 2017).

2.1 Técnica de micro dilución con resazurina

Los resultados obtenidos de este ensayo muestran que las especies bacterianas analizadas no son susceptibles a la bromelina, ya que los diferentes aislados que potencialmente contienen esta enzima, y la bromelina comercial, no lograron inhibir su crecimiento. Por el contrario, Dutta et al. (2013) encontró que los extractos de hojas de las coronas del ananá inhibían el crecimiento microbiano en un 70-95% utilizando mediciones de turbidez con un rango de CIM de 1,65 a 4,95 mg/mL para *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*. Para otras especies de Bromeliaceae, Ávalos-Flores et al. (2022) demostraron que la proteasa parcialmente purificada de *Bromelia karatas* inhibió el crecimiento de *Salmonella typhimurium* en una concentración de 3,0 mg/mL y mostraba un efecto equivalente en *Listeria monocytogenes*.

2.2 Técnica de detección antifúngica con MTT

Los valores negativos obtenidos a partir del método MTT indicaría que los aislados enzimáticos evaluados tuvieron un efecto estimulador del crecimiento del hongo. Todos los aislados de proteínas analizados en este estudio mostraron los mismos resultados (como se muestra en la Tabla 3. Sin embargo, cabe señalar que López-García et al. (2012) encontraron que la bromelina comercial tenía un efecto fungicida sobre *Fusarium oxysporum*. Estos resultados difieren de los encontrados en nuestro estudio, podrían deberse a diferentes razones como la sensibilidad o resistencia de la cepa de *Fusarium oxysporum* identificada aislada en esta región que podría responder de manera diferente al tratamiento comercial con bromelina (Ghannoum et al., 1999) o a la técnica utilizada que podría ser más sensible que la utilizada en López-García et al. (2012), la cual solo midió turbidez mediante absorbancia.

Conclusiones parciales

En este capítulo se evaluó la actividad antimicrobiana de aislados enzimáticos de tallo y hoja de *Ananas comosus* y aislado enzimático de hojas de *Bromelia serra* sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, *X. citri* pv. *Citri*, *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*, *Ralstonia solanacearum* y *Pseudomonas syringae* pv. *Tomate*.

Se utilizaron diferentes metodologías como técnica de difusión en disco en placa y detección de inhibición por colorimetría utilizando resazurina.

También, se ensayó la actividad antifúngica de los mismos aislados y bromelina comercial sobre *Fusarium oxysporum* utilizando otro método colorímetrico (MTT).

Si bien ninguno de los aislados proteicos o la bromelina comercial, pudo controlar biológicamente los microorganismos examinados, es necesario continuar con la purificación de los aislados proteicos para obtener enzimas proteolíticas puras, ya que en el presente trabajo solo se realizaron pruebas con aislados enzimáticos de *Bromelia serra* y *Ananas comosus* que pueden tener otras proteínas que interfieren en la inhibición de microorganismos.

Capítulo V

**Hidrolizados de caseína y coagulación de
leche bovina**

Introducción

La leche contiene 30-35 g/L de proteína total de alta calidad nutritiva. La glándula mamaria sintetiza seis productos genéticos de carácter mayoritario: α caseínas, β -caseínas, κ - caseínas, β -lactoglobulinas y α - lactoalbúminas, que exhiben polimorfismo genético. Las proteínas de la leche se clasifican en caseínas y proteínas del lactosuero. Todas las caseínas forman un complejo esférico singular altamente hidratado, conteniendo fosfato cálcico, denominado micela. Debido a las características particulares de las caseínas y del complejo micelar, las proteínas de la leche pueden separarse fácilmente en las fracciones α caseínas, β -caseínas, κ - caseínas, β -lactoglobulinas y α - lactoalbúminas. La separación mediante precipitación ácida o la coagulación con cuajo ha constituido la base de muchos productos lácteos, como el queso, productos del suero e ingredientes alimentarios (Fennema, 1992; Bruno 2007)

La fracción caseínica de la leche representa cerca del 80% de las proteínas totales y está compuesta por α , β y κ caseínas y algunos productos de proteólisis, como la γ -caseína. La fracción caseínica total puede obtenerse por precipitación a pH 4,6. Su particular composición aminoacídica, su naturaleza anfifílica y la presencia de grupos fosfato esterificados en algunos residuos de serina, son factores que llevan a las caseínas a interactuar entre sí y con el fosfato cálcico para formar grandes complejos esféricos denominados micelas (Ikonen y Ojala, 1995).

La coagulación enzimática de la leche es un paso crucial en el proceso de elaboración del queso. Después de la adición de cuajo, este paso comienza con una escisión enzimática del enlace peptídico Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la caseína κ (Mahaut *et al.*, 2000). Le sigue la desestabilización de las micelas de caseína, junto con una agregación cooperativa que da como resultado la formación de una matriz proteica tridimensional (Mahaut *et al.*, 2000; Sinaga *et al.*, 2017). Como se mencionó antes, la coagulación de la leche utilizando cuajo de ternera es el procedimiento más utilizado. Sin embargo, el aumento mundial de la producción de queso, junto con la reducción de la oferta y el aumento de los precios del cuajo de ternera, ha llevado a la búsqueda de enzimas coagulantes de la leche alternativas, como sustitutos apropiados del cuajo (Anusha *et al.*, 2014; Shah *et al.*, 2006). Además, algunos factores religiosos (Islam y judaísmo) y otros relacionados con el vegetarianismo de algunos consumidores han limitado mucho su uso (Shah *et al.*, 2006).

La obtención de hidrolizados de caseínas a partir de la degradación parcial o total de las proteínas como productos peptídicos de menor peso molecular o incluso aminoácidos mediante enzimas puede observarse en la Figura 43. Esta hidrólisis puede ser catalizada por ácidos, bases o por enzimas proteolíticas (Adler-Nissen, 1979). La hidrólisis enzimática es superior porque puede llevarse a cabo bajo condiciones semejantes a las fisiológicas, produce hidrolizados conteniendo mezclas peptídicas bien definidas, evita la destrucción de los L-aminoácidos y la formación de sustancias tóxicas como la lisin-alanina (Lahl y Brown, 1994; Mahmoud, 1994; Pedersen, 1994). Los péptidos liberados durante la hidrólisis con actividad biológica pueden estar ocultos o inactivos en la secuencia aminoacídica de las proteínas lácteas y ser liberados o activados *in vivo* durante la digestión gastrointestinal, o más aún, durante el procesamiento de los alimentos vía proteólisis enzimática específica. Las caseínas, tanto en la leche sin procesar como en los productos lácteos, son una fuente importante de los péptidos arriba mencionados y su importancia biológica, el impacto en la salud humana y en la manufactura de nuevos aditivos funcionales para los alimentos ha sido motivo de intensa investigación (Silva y Malcata, 2000). También, es importante agregar que una excesiva hidrólisis de la caseína puede llevar a la formación de péptidos que contribuyan a un sabor amargo. Además, los hidrolizados se los puede agregar como ingredientes a otros alimentos ya que poseen propiedades funcionales (Vioque *et al.*, 2001).

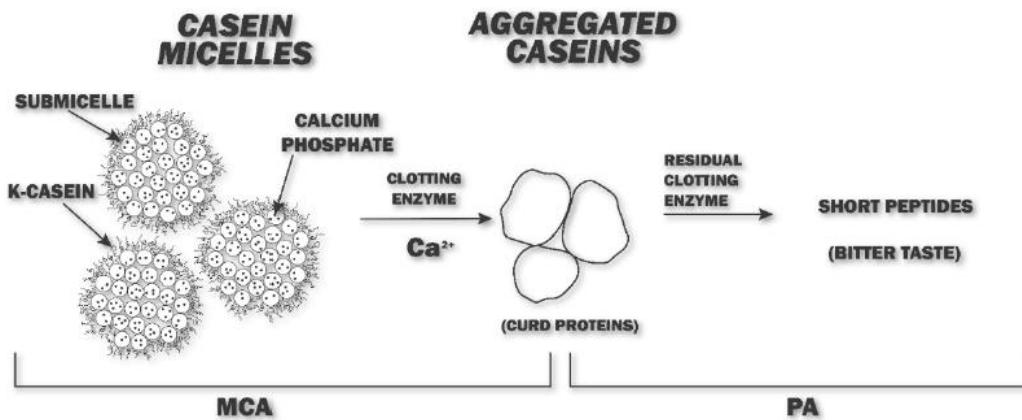


Figura 43. Degradación de caseína por enzimas de coagulación y desarrollo de péptidos amargos. MCA = Actividad coagulante de la leche, PA = Actividad proteolítica. Imagen obtenida de Nicossia et al. (2022)

Uno de los criterios más importantes para tener en cuenta a la hora de seleccionar una enzima coagulante es que la relación coagulación / proteólisis sea comparable con la de la quimosina (Dalgleish, 1992), tal que posea una alta actividad coagulante sumada a una baja actividad proteásica con bajo contenido de péptidos amargos (Vioque *et al.*, 2001), que son uno de los factores limitantes en la aceptabilidad de un queso (Lemieux *et al.*, 1989). Una proteólisis excesiva puede originar geles débiles y pérdida de material durante el proceso de la coagulación (Fox y Stepaniak, 1993), además de otros problemas durante la maduración.

Los cuajos vegetales se han convertido en un tema de creciente interés en la industria quesera, debido a su fácil disponibilidad y sencillos procesos de purificación (Grozdanovic *et al.*, 2013). Además, el uso de proteasas vegetales en la fabricación de queso promueve una mayor aceptabilidad por parte de los vegetarianos y puede mejorar su ingesta nutricional (Duarte *et al.*, 2009). Desde hace varios años, los extractos de plantas se utilizan ampliamente en la preparación de diversos tipos de quesos artesanales que se producen principalmente en los países mediterráneos, el sur de Europa y África occidental (Amira *et al.*, 2017)

La variedad de zonas fitogeográficas en nuestro país ha permitido el desarrollo de una importante flora autóctona, existiendo numerosos antecedentes sobre el aislamiento de proteasas de plantas pertenecientes a las familias Asclepiadaceae, Bromeliaceae, Asteraceae, Moraceae y Euphorbiaceae, algunas de las cuales con probada actividad coagulante de la leche (Vairo Cavalli *et al.*, 2005; Llorente *et al.*, 2004; Pardo *et al.*, 2001; Bruno *et al.*, 2002).

Debido a que la coagulación de la leche representa el primer paso antes del inicio de la manufactura de los quesos, en este capítulo se realizaron ensayos de hidrólisis sobre caseína a diferentes tiempos de incubación y posteriores ensayos de coagulación de leche bovina con los aislados enzimáticos de *Bromelia serra* (AEB).

Materiales y Métodos

En los ensayos realizados tanto para hidrolisis de caseína como coagulación de la leche se utilizaron los aislados enzimáticos obtenidos por precipitación etanólica (AEB) cuyo proceso de obtención se menciona en el capítulo II.

1. Hidrólisis de la caseína bovina

1.1 Preparación de los hidrolizados

Se empleó el método del ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS), basado en la reacción de este compuesto con los grupos amino primarios que quedan expuestos al hidrolizar los enlaces peptídicos (Adler-Nissen, 1979) sobre caseína bovina. Los hidrolizados fueron preparados utilizando una proporción enzima sustrato de 1 a 9 (v/v).

1.2 Preparación del sustrato: caseína bovina

Se preparó una solución de 1,5 g de caseína bovina en 100 mL de *buffer* fosfato 0,1 M pH 6,2. La suspensión obtenida fue homogeneizada, calentada a ebullición durante 20 minutos y por último filtrada en caliente.

1.3 Tiempo óptimo para la hidrólisis de la caseína

La reacción de hidrólisis se llevó a cabo a los tiempos 90, 120 y 240 minutos a 55°C dentro de una estufa con agitación constante a 300 rpm. La reacción fue detenida por shock térmico (ebullición por encima de 100 °C) durante 15 minutos. También se ensayaron los blancos que incluían caseína con agua destilada y enzima con agua destilada en las mismas proporciones 1 a 9 (v/v).

1.4 Determinación de la concentración proteica

Para medir la concentración de proteínas de la caseína se empleó el método de Lowry et al. (1951). Se realizó una curva de calibración partiendo de una solución patrón de seroalbúmina bovina de 1mg/mL y se midió la concentración de proteína de los hidrolizados incubados a diferentes tiempos por cuadriplicado para la determinación de grado de hidrólisis (ítem 1.5).

1.5 Determinación de grado de hidrólisis

Se mencionó en el punto 1.1, que se utilizó la técnica de Adler-Nissen (TNBS) para determinar el grado de hidrólisis a los diferentes tiempos de incubación a 55°C. El método del TNBS que se basa en la reacción de grupos amino primarios con el ácido trinitrobencenosulfónico, ha sido utilizado por diferentes autores para el análisis de hidrolizados de proteínas (Figura 44).

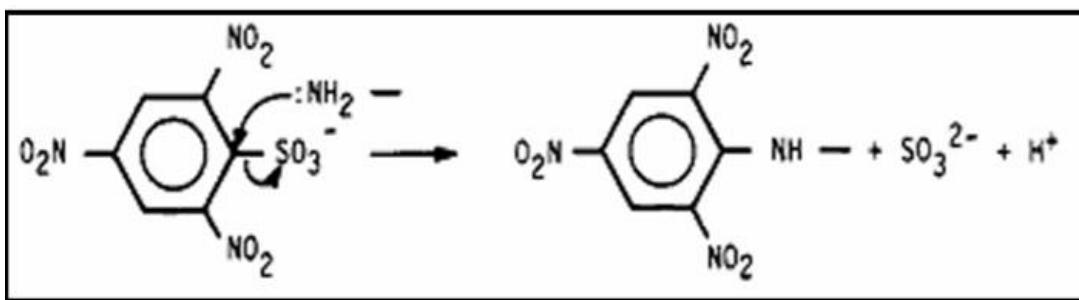


Figura 44. Reacción del TNBS con grupos aminos. Imagen obtenida de Ballerini (2011).

Se empleó una curva de calibración de leucina ya que presenta un grupo amino libre. Para ello se partió de una solución stock de leucina 45 mM, a partir de la cual se prepararon las soluciones diluidas (0,225-2,25 mM) correspondientes a los puntos de la curva de calibración que fueron leídos a 340 nm. La curva de calibración se muestra en la Tabla 29.

Tabla 29. Curva de calibración de leucina para el ensayo del TNBS.

Leucina (mM)	Buffer fosfato de sodio 0,2125 M con SDS (1%) en μ L	Volumen de la solución de Leucina 4,5 μ M (μ L)
0,225	190	10
0,45	180	20
0,9	160	40
1,125	150	50
1,5	133	67
2,25	100	100

Como paso a la determinación del grado de hidrólisis se calentaron las muestras y los patrones de leucina a 75 °C durante 15 minutos en un baño seco. En cuanto a los tratamientos, se colocaron alícuotas de los hidrolizados de tal manera que el volumen final de la reacción sea de 63 μ L. Luego se agregó 500 μ L de buffer fosfato de sodio 0,2125 M pH 8,2 y TNBS (0,05%). Durante 60 minutos se cubrió con papel aluminio las muestras a 50°C para mantener la reacción al resguardo de la luz y se detuvo la reacción con 1 mL de HCl 0,1 N. Se dejó

enfriar el ensayo y se leyó la absorbancia a 340 nm. Luego con los valores de absorbancia de los tratamientos y curva de calibración de leucina, se calculó el grado de hidrolisis (%GH) a través de la siguiente formula:

$$\%GH = 100 * \frac{([NH2]h [NH2]0)}{([NH2]1 [NH2]0)}$$

dónde: $[NH2]$ indica la concentración de grupos amino libres en la muestra no (0) o hidrolizada (h). El parámetro $[NH2]1$ se estimó según:

$$[NH2]1 = \frac{1}{Maa} (1 + f_{Lys}) C_{prot}$$

dónde: M_{aa} es la masa promedio de un aminoácido de la caseína (130g/mol), f_{Lys} es el factor lisina o tasa de lisina en esta proteína (1/13,7) y C_{prot} es la concentración de proteína utilizada en este ensayo (1g/L).

2. Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) de los hidrolizados

Se realizaron las electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) según lo descripto por Laemmli (1970) como se describe en el capítulo II. En esta electroforesis se usaron geles separadores al 15% (p/v).

3. Actividad antioxidante de los hidrolizados

Para cuantificar la capacidad antioxidante de una muestra en función a la capacidad de neutralizar al radical catiónico ABTS [ácido 2,2'-azinobis (3-etylbenzotiazolin-6-sulfónico)] se utilizó el método de Re et al. (1999).

El radical ABTS⁺ se generó mediante la reacción de ABTS 7 mM con persulfato de potasio 2,45 mM en ausencia de luz, a temperatura ambiente, durante 16 h antes de su uso. Esta solución acuosa de ABTS⁺ se diluyó con *buffer* fosfato 5 mM (pH 7,4) hasta una absorbancia

de $0,70 \pm 0,02$ UA a 734 nm. Se utilizaron 4 diluciones de cada hidrolizado por triplicado para obtener el valor de IC_{50} . Después de una incubación durante 45 minutos, se leyó la absorbancia en un lector de microplacas a 734 nm. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Se realizó una curva de calibración utilizando Trólox (0 a 2 mM) como antioxidante de referencia (Figura 45). Todas las medidas se realizaron por triplicado

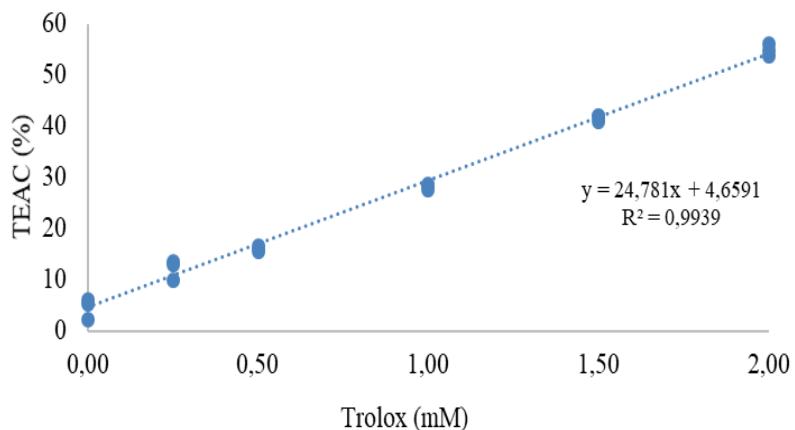


Figura 45. Curva de calibración de Trólox

4. Actividad coagulante de proteínas de la leche bovina

4.1 Ensayos preliminares de la actividad coagulante

Las mezclas de reacción contenían 500 μ l de una suspensión de leche en polvo al 10 % p/v en una solución de $CaCl_2$ 10 mM a pH 6,0 y 200 μ l del aislado enzimático de *Bromelia serra*. La temperatura de incubación fue de 37°C, midiéndose el tiempo en minutos que tarda en aparecer un coágulo macroscópico por observación directa a través del tubo. Se realizaron numerosas determinaciones previas hasta aproximar el valor del tiempo de coagulación, controlando la formación del coágulo por inclinación de los tubos. Luego de esta aproximación se realizaron cinco determinaciones finales con mayor exactitud, cuyos valores fueron promediados. Este procedimiento evita el error producido por la excesiva manipulación de los tubos, lográndose una menor dispersión en el grupo de datos a promediar. Se definió una unidad coagulante (UC) como la inversa del promedio de los

tiempos de coagulación en las condiciones de reacción en minutos. El blanco de reacción se preparó reemplazando la preparación enzimática por una solución de CaCl₂ 10 mM.

4.2 Influencia de la temperatura sobre la coagulación

El protocolo de reacción empleado fue el utilizado por Vairo-Cavalli et al. (2005). Se preparó una solución de leche descremada al 12% p/v (La Serenísima) en una solución de CaCl₂ 10 mM a pH 6,5. El ensayo de coagulación se llevó a cabo mezclando 200μl del aislado enzimático con 1 mL de leche reconstituida, registrando el tiempo necesario para observar la formación del coágulo firme. Cada determinación se realizó por quintuplicado, promediando los resultados. Se midió también la influencia de las temperaturas empleadas (40, 50 y 60 °C) mediante la fuerza del cuaje (RS), el cual es un método estándar internacional IDF 157:2007 (ISO11815:2007). La fuerza del cuaje se define como el número de volúmenes de sustrato coagulado por mililitro de muestra utilizada a 32°C durante 40 minutos (2400 segundos). Se calculó la fuerza del cuaje teniendo en cuenta un volumen V de sustrato, un volumen v de muestra enzimática y tiempo de coagulación t en segundos, según la siguiente fórmula:

$$RS = \frac{2400 \cdot V}{t \cdot v}$$

5. Análisis estadístico

Los datos representan la media ± desviación estándar (DE) de al menos cuatro réplicas. La significación estadística se probó mediante ANOVA unidireccional y Tukey y los valores de p <0,05 se consideraron significativos. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software InfoStat versión 2020 (Di Rienzo *et al.*, 2020).

Resultados

1. Perfil de hidrolizados de caseína

Teniendo en cuenta que AEB presentó actividad proteolítica utilizando caseína como sustrato (0,030 Ucas/mg) y fue el doble que al utilizar el ECB (0,014 Ucas/mg) se procedió a utilizar

el AEB para los estudios de hidrólisis. En la Figura 46 se puede observar, la caseína control o blanco (calle 2), presentando polipéptidos de alto peso molecular que no ingresaron al gel y mayoritariamente las fracciones proteicas de la caseína con en un rango de 23 a 25 kDa los cuales pueden pertenecer a α , β y otra banda de 19 kDa a κ caseína. También, se observó un polipéptido de alta intensidad de ≥ 31 kDa. La progresión del proceso de hidrólisis a 55°C puede observarse a los 90 minutos (calle 4), 180 minutos (calle 5) y 240 minutos (calle 6). A los 90 minutos se siguen observando los mismos polipéptidos presentes en la caseína control, pero con la aparición de nuevas bandas con rangos de peso molecular que van de 15 a 10 kDa. Luego de 180 minutos de hidrólisis (calle 5), no se observa mucha diferencia a comparación del tratamiento anterior, con la excepción de la disminución de intensidad de bandas de alto peso molecular en el rango de 50 a 150 kDa. En el último tratamiento, 240 minutos (calle 6), ya no se observan las bandas mayoritarias de 23 y 31 kDa, predominando un polipéptido de 36 kDa y proteínas peso molecular menor, 19, 15 y 10 kDa.

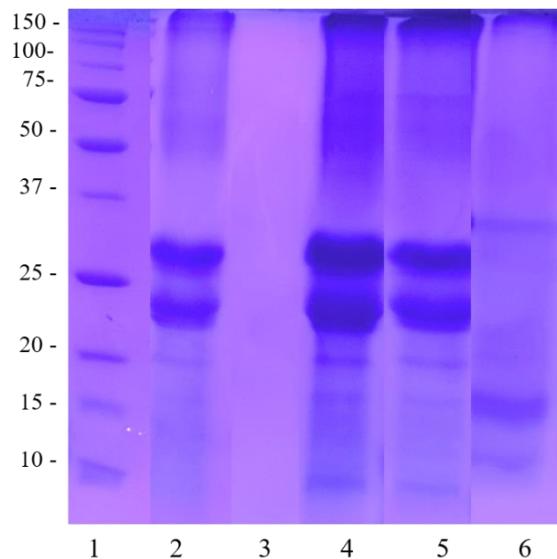


Figura 46. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE-SDS). Calle 1: patrones de peso molecular; calle 2: caseína sin hidrolizar; calle 3: blanco de enzima AEB; calle 4: 90 minutos; calle 5: 180 minutos; calle 6: 240 minutos.

2. Grado de hidrólisis y actividad antioxidante

Utilizando la técnica TNBS se obtuvieron los grados de hidrólisis de la caseína utilizando AEB a diferentes tiempos de incubación a 55°C. La Figura 47 muestra la progresión del %GH con el tiempo de digestión, en el cual se puede apreciar que no se encontraron diferencias significativas entre los tiempos 90 y 180 minutos, obteniendo 5,68 y 6,91% de GH respectivamente. A los 240 minutos de incubación se obtuvo el mayor valor de GH con un 12%.

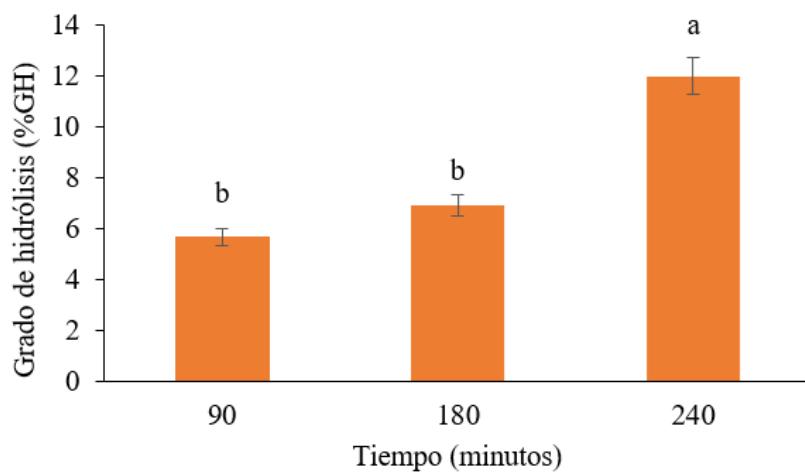


Figura 47. Grado de hidrolisis de la caseína a 55° C a diferentes tiempos de incubación (90, 180 y 240 minutos). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$)

Se midió la actividad antioxidante por el método de ABTS (Tabla 30) a los hidrolizados obtenidos de cada uno los tratamientos (0, 90, 180 y 240 minutos). También, se realizaron diluciones (Fig. 48) de los hidrolizados de cada uno de los tratamientos para obtener el % de inhibición en función de la concentración proteica y determinar el valor IC_{50} . En cuanto al modelo de ajuste de las curvas construidas con el % de inhibición ABTS vs concentración de proteínas para cada uno de los hidrolizados, puede observarse que los tratamientos 0, 180 y 240 fueron logarítmicos, mientras el tratamiento de 90 minutos fue lineal (Fig. 48). La actividad antioxidante expresada en TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), mostró que la caseína (0 minutos), tiene actividad antioxidante sin hidrolizar (Tabla 30). Además, se observó que la actividad antioxidante de la caseína al exponerla frente a una hidrólisis a 55°C

durante 90 y 180 minutos con AEB disminuyó su actividad significativamente. Sin embargo, a los 240 minutos de hidrólisis con el AEB aumentó significativamente su actividad antioxidante, aproximadamente en un 18%. En cuanto al IC_{50} , se observó un comportamiento similar, obteniendo el valor significativamente más bajo para el hidrolizado de 240 minutos y luego la caseína sin hidrolizar, lo que implica que 1,68 mg/mL de caseína hidrolizada (55°C-240 minutos) son necesarios para alcanzar el 50% de inhibición del radical catión ABTS, frente a los 1,98 mg/mL de la caseína sin hidrolizar.

Tabla 30. Grado de hidrólisis de caseína expresado en porcentaje para cada tiempo de hidrólisis (0, 90, 180 y 240 minutos) y sus correspondientes valores de IC_{50} y TEAC. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$)

Tiempo de hidrólisis (minutos)	Grado de hidrólisis (%)	Actividad antioxidante	
		IC_{50} (mg/mL)	TEAC (μ g de Trolox equivalente/mg)
0	0	1,98 c	231,23 b
90	5,68 b	2,21 b	206,97 c
180	6,91 b	2,91 a	150,54 d
240	12,01 a	1,68 d	272,89 a

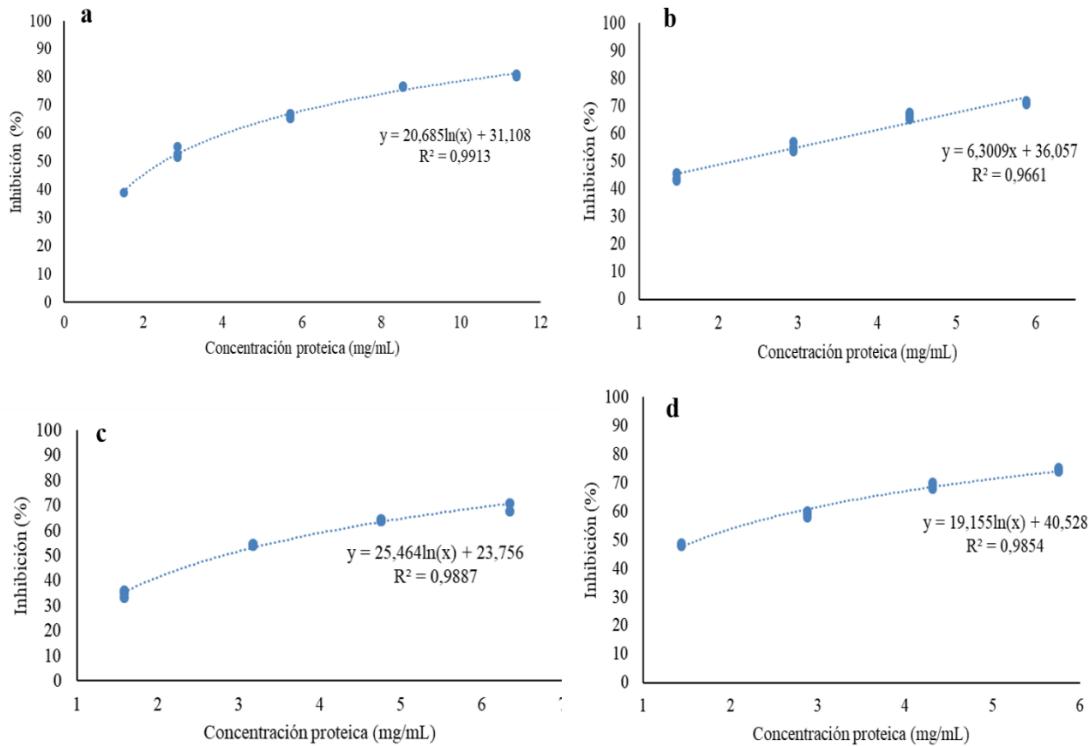


Figura 48. Porcentajes de inhibición de ABTS en función de la concentración proteica de los hidrolizados. Caseína 0 minutos (a), caseína 90 minutos (b), caseína 180 minutos (c) y caseína 240 minutos (d).

3. Actividad coagulante de la caseína bovina

A modo de ensayo preliminar para determinar el UC de la leche al 10% p/v frente a AEB se realizaron al menos 5 repeticiones. Luego de realizar el ensayo de coagulación de la leche a 37°C con el AEB, se obtuvo el valor de 0,03 UC, ya que tardaron 30 minutos en visualizarse los flóculos en las paredes del tubo de ensayo (Fig. 49).



Figura 49. Visualización de los flóculos en las paredes del tubo de ensayo. Tubo de la derecha (control sin enzima), tubo de la izquierda (con enzima AEB).

3.1 Influencia de la temperatura sobre la fuerza del cuaje

La capacidad de coagular la leche por parte de AEB a distintas temperaturas se evaluó a través de la determinación de la Fuerza del cuaje (RS). Lo que se observa de la Figura 50, es que a 40, 50 y 60°C la fuerza del cuaje fue de 4, 6 y 14 respectivamente. Se evidencia que, a mayor temperatura, mayor fue la fuerza del cuaje, es decir, menor tiempo para evidenciar la presencia de coágulos.

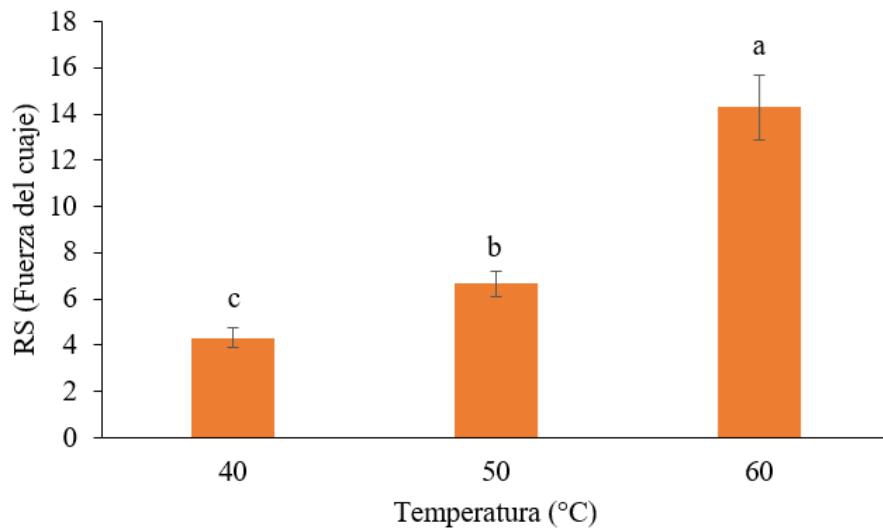


Figura 50. Influencia de la temperatura sobre la fuerza de cuaje con el AEB a diferentes temperaturas (40, 50 y 60 °C). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$)

Discusión

Las proteasas cortan los enlaces peptídicos y pueden liberar péptidos bioactivos cifrados en la secuencia de la proteína sustrato, que pueden presentar diferentes actividades, siendo uno de ellos la actividad antioxidante de los péptidos. El consumo de antioxidante naturales podría reducir la incidencia de diabetes, ciertos tipos de cáncer, hipertensión y enfermedades cardiovasculares (Alenisan *et al.*, 2017). Una alternativa, es el uso de proteasas provenientes de plantas, los cuales han demostrado que son una fuente alternativa y económica de proteínas y péptidos bioactivos (García *et al.*, 2013). Debido a que en el capítulo II AEB demostró actividad proteolítica con la caseína como sustrato, se decidió usar esta proteína para ensayos de hidrólisis enzimática. En este estudio, se evaluó en primer lugar la capacidad de hidrolizar la caseína a diferentes tiempos utilizando AEB y se midieron sus respectivas actividades antioxidantes.

La caseína es la proteína mayoritaria en la leche. Estos ensayos revelan la acción del AEB sobre las caseínas y están relacionados con los ensayos de coagulación de la leche bovina.

1. Perfil de los hidrolizados de caseína y grado de hidrólisis

En la electroforesis de los hidrolizados (Fig. 4), se observó la progresión de la hidrólisis desde minuto 0 (caseína sin hidrolizar), minuto 90 (5,68% GH), minuto 180 (6,91% GH) y minuto 240 (12% GH). En la caseína sin hidrolizar se observaron fracciones proteicas de la caseína con 23, 23,6 y 19 kDa que podrían pertenecer a α , β y κ caseína. Salese (2023), realizó ensayos de hidrólisis sobre caseína con enzimas proteolíticas pertenecientes al fruto de *Bromelia serra* a diferentes tiempos (5, 10, 30, 60, 90 y 180 minutos) a 55°C. En la electroforesis de su estudio, sólo una observó fracción muy pequeña de las otras caseínas permanecieron sin hidrolizar por las enzimas de *Bromelia serra* hasta los 10 min a 55 °C. En su estudio la aparición de una banda ancha de 10,2 kDa junto con otras más delgadas de 7,9 y 6,5 kDa, que desaparecieron a mayor tiempo de hidrólisis. También identificó una banda de 9,0 kDa que se hizo visible entre 60 y 90 min de hidrólisis y desapareció casi por completo después de 180 minutos (27% GH) a los 55°C (Salese, 2023). En este estudio, en el minuto 240 a 55°C, desaparecieron de igual manera las bandas 23 y 31 kDa, predominando un polipéptido de 36 kDa y proteínas peso molecular menor, 19, 15 y 10 kDa. Al comparar los aislados enzimáticos de hoja (AEB) y de fruto (Salese, 2023) a los 180 minutos de incubación a la misma temperatura se observa el mayor grado de hidrólisis por parte de las enzimas de los frutos que de las hojas, lo cual también se vio reflejado en la actividad proteolítica sobre sustrato caseína donde el AEB de este estudio fue de 0,030 Ucas/mg, mientras que Salese (2023) con las enzimas de fruta de *Bromelia serra* reportó 1,2 Ucas/mg. Si bien la actividad enzimática de las proteasas del fruto sobre caseína (Salese, 2023) fue 40 veces mayor que para AEB, el GH (55°C-180) fue solo de 3,8 veces. El 12% de grado de hidrólisis que se obtuvo en el presente trabajo a los 240 minutos, se clasifica según Vioque et al. (2001) dentro del hidrolizados extensivos, por obtener una hidrólisis superior al 10%. Los hidrolizados extensivos están destinados a una alimentación especializada, bien como suplemento proteico o en dietas médicas.

2. Actividad antioxidante de los hidrolizados

La hidrólisis enzimática se considera un método particularmente importante para generar péptidos biofuncionales. En comparación con los métodos químicos, requiere condiciones de

reacción suaves, genera pocos productos secundarios indeseables y facilita un alto rendimiento y calidad del producto. Las propiedades antioxidantes de los péptidos están relacionadas con su composición de aminoácidos, estructura, e hidrofobicidad (Czelej *et al.*, 2022). En este estudio, se midió la actividad antioxidante de los hidrolizados de caseína a diferentes tiempos (90, 180, 240 minutos) utilizando AEB como enzima proteolítica a través del método ABTS. Se detectó, al igual que Cervatto *et al.* (1999) y Salese *et al.* (2021), que la caseína bovina sin hidrolizar (0 minutos) posee actividad antioxidante. En este estudio la mayor actividad antioxidante se obtuvo a los 240 minutos con un valor de 272,89 $\mu\text{g}/\text{mg}$ o 1,10 $\mu\text{M}/\text{mg}$, mientras que Salese *et al.* (2021) a la misma temperatura (55°C) a los 180 minutos, alcanzo un valor de 1,41 $\mu\text{M}/\text{mg}$. Los menores valores de actividad antioxidante en este estudio en los tiempos 90 y 180 pueden deberse probablemente a cambios estructurales que sucedieron durante la hidrólisis, ya que ciertos aminoácidos con menor capacidad antioxidante quedan expuestos y de esta manera alteran la actividad (Nicossia *et al.*, 2022)

El valor de IC_{50} que representa la cantidad de proteína necesaria para obtener un 50% de inhibición del radical catión ABTS a los 240 minutos en este estudio fue de 1,68 mg/ml, es decir que a menor valor mayor es la capacidad antioxidante. Otros valores de IC_{50} reportados fueron con proteasas aspárticas obtenidas de *Amaranthus quitensis* con un valor de IC_{50} 2,1 mg/mL (Sabbione *et al.*, 2016) y 4,54 mg/mL con papaína (Chi *et al.*, 2015). Si bien se utilizaron diferentes sustratos proteicos para las enzimas anteriormente citadas, esta es la primera vez que se calcula el valor de IC_{50} para AEB en caseína.

3. Actividad coagulante de leche bovina

La coagulación enzimática de la leche es un paso clave en la elaboración del queso. La evaluación de las actividades enzimáticas de los coagulantes vegetales y su comparación con las del cuajo comercial (quimosina) es un primer paso importante en la selección de un sustituto adecuado del cuajo (Nicossia *et al.*, 2022).

La UC en este estudio fue de 0,03 utilizando AEB, mientras que Bruno (2007) obtuvo un valor 2,4 unidades coagulantes con el extracto de *Bromelia hieronymi*, debido probablemente a la mayor actividad proteolítica de *B. hieronymi* sobre caseína (10,9 Ucas/mg) a comparación de nuestro estudio (0,030 Ucas/mg). Crosetti *et al.* (2023), realizaron estudios

de coagulación de leche bovina con enzimas provenientes de flores de alcaucil (*Cynara scolymus* L.) obtuvieron un valor de UC de 0,2.

3.1 Influencia de la temperatura sobre la fuerza del cuaje

La actividad coagulante de la leche se determinó empleando el método descripto por la norma IDF 157:2007 (ISO11815:2007). Esta actividad se la expresó como fuerza del cuajo (RS) la cual se define como el número de volúmenes de sustrato coagulado por mililitro de muestra utilizada a 32°C durante 40 minutos (2400 segundos) como se indica en el ítem de Materiales y Métodos 2.2. Las fuerzas de cuaje aumentaron junto con el aumento de la temperatura, mientras que Bruno (2007) tuvo una tendencia contraria ya que al aumentar la temperatura disminuyó la fuerza de cuajo, obteniendo el valor óptimo a 25°C mientras que en este estudio fue a 60°C. Esta tendencia de mayor fuerza de cuajo a mayor temperatura podría deberse que el óptimo de actividad proteolítica de del AEB también fue a 60°C (Capítulo II).

Conclusiones parciales

En el desarrollo de este capítulo se prepararon hidrolizados de caseína utilizando AEB a diferentes tiempos, como estudio previo a la coagulación de la leche y la influencia que tiene la temperatura en la fuerza de cuajo.

El hidrolizado obtenido tras un tratamiento de 240 minutos exhibió la actividad antioxidante (ABTS) más elevada en comparación con los demás tratamientos. Además, esta investigación marca el primer estudio en el que se lleva a cabo la evaluación de la actividad antioxidante y la determinación del IC₅₀ en hidrolizados empleando AEB.

El hidrolizado de 12% de grado de hidrólisis obtuvo un valor de TEAC de 1,10 μ M/mg, el cual es comparable al de otras especies de Bromeliaceae.

El perfil polipeptídico de los hidrolizados exhibió una variación mínima en los tratamientos a los 90 y 180 minutos, lo que coincidió con el grado de hidrólisis. En cambio, a los 240 minutos, se hidrolizaron polipéptidos de alto peso molecular y se pudieron observar péptidos de menor peso molecular.

Una vez estudiado el efecto del AEB sobre la caseína, se procedió a los estudios de coagulación de la leche, que si bien presentaron valores bajos podrían aumentarse concentrando el AEB.

Estos ensayos permiten sentar base para estudios futuros para la manufactura de quesos, reemplazando el cuajo de origen animal, por vegetal. Posteriormente deberán realizarse estudios correspondientes a pruebas de acidez, alcohol, reductasa a la leche y análisis sensorial a la manufactura de quesos.

Capítulo VI

Conclusiones y perspectivas

Conclusiones

En este trabajo se ha llevado a cabo una investigación sobre la caracterización y aplicaciones de proteasas vegetales de extractos de diferentes órganos de *Bromelia serra* (hojas) y *Ananas comosus* (hoja y tallo) obtenidos bajo diferentes condiciones ambientales.

Para los extractos de hojas de *Bromelia serra* la actividad proteolítica y concentración proteica no demostraron diferencias estadísticas en relación a las estaciones del año. Estos resultados proporcionan información importante sobre la producción de estas enzimas y sugiere su viabilidad para ser recolectadas en diferentes momentos del año. Además, se ha demostrado que la precipitación con acetona y etanol puede aumentar significativamente la actividad proteolítica específica de los extractos, lo que sugiere un método efectivo para purificar de manera preliminar estas enzimas.

En cuanto a su comportamiento bajo diferentes condiciones de pH, se observó que el aislado de *Bromelia serra* presentó actividad en un rango de pH de 2,7 a 7, mostrando una preferencia marcada en pH ácidos. Además, se evidenció una alta estabilidad térmica en los aislado enzimático de *Bromelia serra* obteniendo un 47% de actividad residual luego de pre incubar por una hora a 98°C. También, alcanzó su máxima actividad proteolítica a una temperatura de 60°C.

Mediante diversos métodos de separación, se logró detectar actividad enzimática en fracciones con pesos moleculares de 21 y 54 kDa. Dada la composición de los extractos enzimáticos obtenidos de las hojas de *Bromelia serra*, que contienen una variedad de proteasas cisteínicas y aspárticas con diferentes pesos moleculares e isoformas, resulta muy preliminar inferir qué proteasas corresponden a un peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI) específicos únicamente a partir de las cromatografías realizadas y la información bibliográfica previa. Además, la posible presencia de mucílago en los extractos dificultó su purificación antes de someterlos a cromatografías.

La hipótesis que las diferentes condiciones ambientales propias de las cuatro estaciones del año, modifican la concentración y actividad proteolítica de las proteasas cisteínicas extraídas

de *Bromelia serra* Griseb. se rechaza debido a que no hubo diferencias estadísticas en la actividad proteolítica y concentración proteica según las diferentes estaciones del año.

Respecto al efecto del estrés hídrico sobre los órganos de *Ananas comosus* L. Merr y su relación con los contenidos de proteasas cisteínicas, se observó que las mismas sometidas a diferentes niveles de estrés hídrico mostraron modificaciones en la concentración y actividad proteolítica de las proteasas cisteínicas.

Se utilizaron el NDVI y el CRA como indicadores del estrés hídrico en las plantas de ananá, demostrando sensibilidad a diferentes momentos de muestreo. El NDVI mostró una disminución progresiva en sus valores a los 7 días de tratamiento con estrés hídrico, tanto en el tratamiento del 50% como del 25% de la capacidad de campo (CC), destacando su utilidad como indicador no destructivo para detectar estrés hídrico en las plantas de ananá. Por otro lado, la caracterización de los extractos de tallo y hoja de ananá reveló una mayor actividad proteolítica y concentración de proteínas en respuesta al aumento del estrés hídrico. La técnica de caracterización de peso molecular de las proteínas y su actividad gelatinolítica mostró diferencias entre los órganos y niveles de estrés hídrico, observándose un aumento en la actividad gelatinolítica con el incremento del estrés hídrico, especialmente en proteínas de 22 kDa en las hojas y de 25 kDa en los tallos. Al comparar los perfiles cromatográficos de la bromelina comercial con los de tallo y hoja, se encontraron diferencias en la actividad proteolítica, siendo mayor en los tratamientos estresados en ambos órganos. Esto sugiere una mayor actividad de la bromelina del tallo en condiciones de estrés hídrico.

Por lo tanto, la hipótesis que las plantas de *Ananas comosus* sometidas a diferentes niveles de estrés hídrico modifican la concentración y actividad proteolítica de las proteasas cisteínicas se confirma y además mediante la utilización del sustrato LNPE específico para bromelina de tallo se pudo verificar la mayor actividad de esta enzima a mayor estrés hídrico.

En cuanto al uso de las proteasas cisteínicas de *Ananas comosus* L. Merr y *Bromelia serra* Griseb. como producto orgánico para el control de microorganismos fitopatógenos se evaluó la actividad antimicrobiana de aislados enzimáticos de tallo y hoja de *Ananas comosus* y aislado enzimático de hojas de *Bromelia serra* y bromelina comercial sobre *Xanthomonas*

axonopodis pv. *manihotis*, *X. citri* pv. *Citri*, *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*, *Ralstonia solanacearum* y *Pseudomonas syringae* pv. *Tomate*.

Se utilizaron diferentes metodologías como técnica de difusión en disco en placa y detección de inhibición por colorimetría utilizando resazurina. También, se ensayó la actividad antifúngica de los mismos aislados y bromelina comercial sobre *Fusarium oxysporum* utilizando otro método colorímetrico.

Si bien ninguno de los aislados proteicos o la bromelina comercial, pudo controlar biológicamente los microorganismos examinados, es necesario continuar con la purificación de los aislados proteicos para obtener enzimas proteolíticas puras, ya que en el presente trabajo solo se realizaron pruebas con aislados enzimáticos de *Bromelia serra* y *Ananas comosus* que pueden tener otras proteínas que interfieren en la inhibición de microorganismos.

Por lo tanto, la tercera hipótesis que plantea que la aplicación de proteasas cisteínicas de *Ananas comosus* L. Merr. y *Bromelia serra* Griseb. tienen efectos como producto orgánico para el control de ciertos microorganismos fitopatógenos la cual se rechaza debido a que probablemente los aislados de *Bromelia serra* y *Ananas comosus* no estaban purificados o no tienen control biológico sobre los microorganismos ensayados.

También, se evaluó el efecto de las enzimas de *Bromelia serra* sobre la coagulación de la leche bovina, variación de temperatura en la coagulación y obtención de hidrolizados a partir de la caseína.

Se prepararon hidrolizados de caseína utilizando aislados enzimáticos de *Bromelia serra* en diferentes tiempos, como parte de una investigación previa de la coagulación de la leche y su relación con la temperatura. El hidrolizado obtenido después de 240 minutos mostró la mayor actividad antioxidante medida con ABTS, y se evaluó por primera vez la actividad antioxidante y el IC₅₀ en hidrolizados. El hidrolizado al 12% demostró una actividad antioxidante comparable a otras especies de Bromeliaceae. El análisis del perfil polipeptídico reveló cambios mínimos en los tratamientos de 90 y 180 minutos, pero a los 240 minutos se

observó una hidrólisis de polipéptidos de mayor peso molecular. Se estudió el efecto del aislado enzimático de *Bromelia serra* en la coagulación de la leche, mostrando valores bajos que podrían mejorarse concentrando el aislado enzimático.

La cuarta hipótesis que plantea el uso de aislado de hojas de *Bromelia serra* como agente coagulante se aprueba ya que se logró la coagulación de la leche y además aumento la fuerza del cuaje a mayor temperatura.

Perspectivas

Del presente trabajo de Tesis surgen los siguientes aspectos que requieren ser abordados en el corto y mediano plazo:

Considerando la disponibilidad abundante de las hojas *Bromelia serra* y propiedades sus proteasas, se identifica un gran potencial para su aplicación en la industria alimentaria. Específicamente, su uso como catalizadores en la fabricación de quesos animales, vegetales y otros procesos de producción de alimentos podría ofrecer alternativas sostenibles y eficientes. Además, estos estudios sientan las bases para seguir utilizando a los aislados enzimáticos de *Bromelia serra* como una enzima capaz de hidrolizar otros sustratos proteicos que puedan derivar en péptidos con bioactividad como es la actividad antioxidante.

Si bien la presencia del mucilago fue un impedimento al momento de la purificación de las enzimas de *Bromelia serra*, el mismo podría ser extraído para su estudio y aplicado en medicina, como agente espesante y estabilizante en alimentos, fabricación de materiales biodegradables y vehículo de sustancias en la farmacología.

En cuanto al aumento de la actividad de la bromelina de tallo bajo estrés hídrico en *Ananas comosus* con el sustrato específico, es un antecedente para continuar con la investigación de cómo es el mecanismo de acumulación en la planta. Además, se debería purificar la enzima de los órganos estresados para confirmar su identificación por espectrometría de masas.

Bibliografía

Abdulrahman Ali, A., Mohammed A. M. & Isa A. G. (2015). Antimicrobial Effects of Crude Bromelain Extracted from Pineapple Fruit (*Ananas comosus* (Linn.) Merr.). *Advances in Biochemistry*. 3 (1), 1–4.

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

Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1), 117-139.

Alenisan, M. A., Alqattan, H. H., Tolbah, L. S., & Shori, A. B. (2017). Antioxidant properties of dairy products fortified with natural additives: A review. *Journal of Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*, 24, 101–106.

Ali, A. A., Mohammed, A. M., & Isa, A. G. (2015). Antimicrobial effects of crude bromelain extracted from pineapple fruit (*Ananas comosus* (Linn.) Merr.).

Amira, A., Besbes, S., Attia, H., & Blecker, C. (2017). Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(sup1), S76-S93.

Andrade, J. L., De la Barrera, E., García, C. R., Ricalde, M. F., Soto, G. V., & Cervera, J. C. (2007). El metabolismo ácido de las crasuláceas: diversidad, fisiología ambiental y productividad. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (81), 37-50.

Anusha, R., Singh, M. K., & Bindhu, O. S. (2014). Characterization of potential milk coagulants from *Calotropis gigantea* plant parts and their hydrolytic pattern of bovine casein. *European Food Research and Technology*, 238, 997-1006.

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

Ávalos-Flores, E., López-Castillo, L. M., Wielsch, N., Hupfer, Y., Winkler, R., & Magaña-Ortiz, D. (2022). Protein extract of *Bromelia karatas* L. rich in cysteine proteases (ananain-

and bromelain-like) has antibacterial activity against foodborne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium*. *Folia Microbiologica*, 67(1), 1-13.

Babagana, K., & Bala, M. (2016). Comparative study on characterization of bromelain extracted from the stem and fruit of pineapple (Ananas comosus). *J Nat Sci Res*, 6, 57-62.

Balakireva, A. V., & Zamyatnin Jr, A. A. (2018). Indispensable role of proteases in plant innate immunity. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 629.

Ballego-Campos, I., Forzza, R. C., & Paiva, É. A. (2023). An overview of secretion in floral bracts of Tillandsioideae (Bromeliaceae), with emphasis on the secretory scales. *AoB Plants*, 15(5), plad066.

Barret, A.J. (2001). Proteolytic enzymes: nomenclature and classification, en “Proteolytic Enzymes. A practical approach” 2nd. Edition (R. Beynon & J.S. Bond, eds.). Oxford University Press, Great Britain.

Barrett (1970). Cathepsin D. Purification of isoenzymes from human and chicken liver. *Biochem. J.* 117: 601-607.

Barrett, A.J., N.D. Rawlings & J.F. Woessner (2004a). “Preface- Introduction”, en “Handbook of Proteolytic Enzymes”, 2nd Ed. Elsevier, London.

Bartholomew, D.P., Malézieux, E., Sanewski, G.M. & Sinclair, E. (2003) Inflorescence, and fruitdevelopment and yield. In: *The Pineapple: Botany, Production and Uses*. (eds D.P. Bartholomew, R.E. Paull & K.G. Rohrbach), pp. 167–202. Wallingford: CABI Publishing,

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

Berg, J.M., J.L. Tymoczko, L. Stryer & N.D. Clarke (2002). “Biochemistry”, 5th Ed., W.H. Freeman & Company, NY, págs. 189-225.

Bhagavathy, S., Pushya, K., Gayathridevi, R., & Jeniffer, J. (2019). Purification, characterization and application of bromelain from Ananas comosus. *Journal of Applied and Advanced Research*, 4(5), 133-140.

- Blum, H., Beier, H., & Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8(2), 93-99.
- Botella, J. R., & Smith, M. (2008). Genomics of pineapple, crowning the king of tropical fruits. In *Genomics of tropical crop plants* (pp. 441-451). New York, NY: Springer New York.
- Bowles, B. L., & Juneja, V. K. (1998). Inhibition of foodborne bacterial pathogens by naturally occurring food additives. *Journal of Food Safety*, 18(2), 101-112.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive technique to determine protein concentrations. *Anal. Biochem*, 72, 248-254.
- Bresolin, I. R. A. P., Bresolin, I. T. L., Silveira, E., Tambourgi, E. B., & Mazzola, P. G. (2013). Isolation and purification of bromelain from waste peel of pineapple for therapeutic application. *Brazilian archives of biology and technology*, 56(6), 971-979.
- Brocklehurst, K., & Philpott, M. P. (2013). Cysteine proteases: mode of action and role in epidermal differentiation. *Cell and Tissue Research*, 351, 237–244
- Bruno, M. A., Lazza, C. M., Errasti, M. E., López, L. M., Caffini, N. O., & Pardo, M. F. (2010). Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4), 695-701.
- Bruno, M. (2007). *Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas de frutos Bromelia hieronymi Mez. (Bromeliaceae)*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Bruno, M. A., Pardo, M. F., Caffini, N. O., & Lopez, L. M. (2002). Purification of a new endopeptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 21(1), 51-56.
- Bruno, M. A., Trejo, S. A., Aviles, X. F., Caffini, N. O., & Lopez, L. M. (2006). Isolation and characterization of hieronymain II, another peptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *The Protein Journal*, 25(3), 224-231.

- Bruno, M. A., Trejo, S. A., Caffini, N. O., & López, L. M. (2008). Purification and characterization of hieronymain III. Comparison with other proteases previously isolated from *Bromelia hieronymi* Mez. *The protein journal*, 27(7-8), 426-433.
- Bruno, M.A.(2007) Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas de frutos *Bromelia hieronymi* Mez. (Bromeliaceae). Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Buono, R. A., Hudecek, R., & Nowack, M. K. (2019). Plant proteases during developmental programmed cell death. *Journal of Experimental Botany*, 70(7), 2097-2112.
- Cabral, H., Leopoldino, A. M., Tajara, E. H., Greene, L. J., Faça, V. M., Mateus, R. P., ... & Bonilla-Rodriguez, G. O. (2006). Preliminary functional characterization, cloning and primary sequence of Fastuosain, a cysteine peptidase isolated from fruits of *Bromelia fastuosa*. *Protein and peptide letters*, 13(1), 83-89.
- Caffini, N. O. (2009). Enzimas proteolíticas de vegetales superiores. Aplicaciones industriales. *Editorial Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Buenos Aires, Arge*
- Caffini, N. O., Natalucci, C. L., Priolo, N. S., & Buttazzoni, M. S. (1988). Proteasas de Bromeliaceae. IV. Aislamiento de una fitoproteasa sulfhidrílica presente en frutos de *Bromelia serra* Griseb. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 7, 9-14.
- Carvalho, S. L. C. D., Neves, C. S. V. J., Bürkle, R., & Marur, C. J. (2005). Épocas de indução floral e soma térmica do período do florescimento à colheita de abacaxi'Smooth Cayenne'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 27, 430-433.
- Cervato, Roberta Cazzola, Benvenuto Cestaro, G. (1999). Studies on the antioxidant activity of milk caseins. *International Journal of food sciences and nutrition*, 50(4), 291-296.
- Chi, C. F., Hu, F. Y., Wang, B., Li, Z. R., & Luo, H. Y. (2015). Influence of amino acid compositions and peptide profiles on antioxidant capacities of two protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) dark muscle. *Marine Drugs*, 13(5), 2580-2601.
- Corzo, C. A., Waliszewski, K. N., & Welti-Chanes, J. (2012). Pineapple fruit bromelain affinity to different protein substrates. *Food Chemistry*, 133(3), 631-635.

Crosetti, V., Sola, A., Grigioni, G., & Torres, M. J. (2023). Milk-Clotting Properties and Primary Proteolysis of a Lyophilised Extract from Artichoke Flowers (*Cynara scolymus* L.). *Food Technology and Biotechnology*, 61(3), 402-409.

Czelej, M., Garbacz, K., Czernecki, T., Wawrzykowski, J., & Waśko, A. (2022). Protein hydrolysates derived from animals and plants—a review of production methods and antioxidant activity. *Foods*, 11(13), 1953.

Da Silva, R. R. (2017). Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, 183, 1-19.

Daley, L. S., & Vines, H. M. (1978). Pineapple (*Ananas comosus* L., Merr.) leaf proteinase. *Plant Science Letters*, 11(1), 59-67.

Dalgleish, D.G., (1992) The enzymatic coagulation of milk. In: Advanced Dairy Chemistry I: Proteins (P.F. Fox, ed.), pp.: 579-619. Elsevier Applied Science. Elsevier Science Publishers Ltd. England

De Pooter, H. L., Aboutabl, E. A., & El-Shabrawy, A. O. (1995). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of leaf, stem and rhizome of *Alpiniaspeciosa*. *Flavour and Fragrance Journal*, 10(2), 63-67.

Delaquis, P. J., & Mazza, G. (1995). Antimicrobial properties of isothiocyanates in food preservation.

Demo, M., Oliva, M. D. L. M., López, M. L., Zunino, M. P., & Zygallo, J. A. (2005). Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatic plants of Argentina. *Pharmaceutical biology*, 43(2), 129-134.

Derwidueé, F. S., & Gonzalez, A. M. (2010). Anatomía foliar en Bromeliaceae del Nordeste argentino y Paraguay. *Bonplandia*, 153-173.

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2020). InfoStat versión 2020. Centro de transferencia InfoStat. *FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina*. <http://www.infostat.com.ar>.

- dos Anjos, M. M., da Silva, A. A., de Pascoli, I. C., Mikcha, J. M. G., Machinski Jr, M., Peralta, R. M., & de Abreu Filho, B. A. (2016). Antibacterial activity of papain and bromelain on *Alicyclobacillus* spp. *International journal of food microbiology*, 216, 121-126.
- Duarte, A. R., Duarte, D. M. R., Moreira, K. A., Cavalcanti, M. T. H., Lima-Filho, J. L. D., & Porto, A. L. F. (2009). *Jacaratia corumbensis* O. Kuntze a new vegetable source for milk-clotting enzymes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52, 1-9.
- Dumorne, K., Córdova, D. C., Astorga-Elo, M., & Renganathan, P. (2017). Extremozymes: a potential source for industrial applications. *J Microbiol Biotechnol*, 27(4), 649-659.
- Dussourd, D.E. (1993). "Foraging with finesse: caterpillar adaptations for circumventing plant defenses", en "Caterpillars: Ecological and evolutionary constraints on foraging" (Stamp, N.E. & T.M.Cassey, eds.), págs. 92-131. Champman & Hall, New York.
- Dutta, S., & Bhattacharyya, D. (2013). Enzymatic, antimicrobial and toxicity studies of the aqueous extract of *Ananas comosus* (pineapple) crown leaf. *Journal of ethnopharmacology*, 150(2), 451-457.
- Errasti, M. E., Natalucci, C. L., Caffini, N. O., Rotelli, A. E., Brullo, A., Maras, B., ... & López, L. M. (2018). Structural Properties of Macrodontain I, a Cysteine Protease from *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *Applied biochemistry and biotechnology*, 186, 186-198.
- Fennema O. (1992). Química de los Alimentos. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España.
- Fox, P.F. & Stepaniak, L. (1993) Enzymes in Cheese Technology . International Dairy Journal 3:509– 530
- Freitas, C. D., Silva, R. O., Ramos, M. V., Porfírio, C. T., Farias, D. F., Sousa, J. S., ... & Grangeiro, T. B. (2020). Identification, characterization, and antifungal activity of cysteine peptidases from *Calotropis procera* latex. *Phytochemistry*, 169, 112163.
- Ghannoum M.A. & Rice L.B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12(4):501-17.

Gómez Herrera, M. D., Avanza, M. V., & Alayón Luaces, P. A. (2016). Actividad fotosintética de hojas de ananá (*Ananas comosus* L. Merr) en diferentes estadíos fenológicos bajo dos sistemas de cultivo. *FACEA*, 32, 9-18.

Gómez Herrera, M. D., Luaces, P. A., Liggieri, C., Bruno, M., & Avanza, M. V. (2022). Proteolytic characterization of a novel enzymatic extract from *Bromelia serra* leaves. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 94 (4), e20201871.

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

Grozdanovic, M. M., Burazer, L., & Gavrovic-Jankulovic, M. (2013). Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) extract shows potential as a low-cost and efficient milk-clotting agent. *International Dairy Journal*, 32(1), 46-52.

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

Hames, B. D. (1981). An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In *gel electrophoresis: a practical approach* Edited by: Hames BD, Rickwood D.

Harrach, T., Eckert, K., Maurer, H. R., Machleidt, I., Machleidt, W. y Nuck, R. (1998). Isolation and characterization of two forms of an acidic bromelain stem proteinase. *Journal of Protein Chemistry*, 17 (4): 351-361.

Hassan, O. & Chang, T. (2017) Chitosan for eco-friendly control of plant disease. *Asian J Plant Pathol* 11:53–70

Heinicke, R.M., W.A. Gortner (1957) Stem bromelain. A new protease preparation from pineapple plants. *Econ. Bot.* 11: 225-34.

Hernández, M., Chávez, M., Márquez, M., Rodríguez, G., Santos, R., González, J., Carvajal, C (1997). Proceso de Obtención de Bromelina a Partir de Tallos de Piña. Patente Cubana C12N 9/50, dic 23.

Hidalgo, M. E., Daroit, D. J., Corrêa, A. P. F., Pieniz, S., Brandelli, A., & Risso, P. H. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of bovine caseinate hydrolysates obtained

through microbial protease treatment. *International Journal of Dairy Technology*, 65, 342–352.

Hossain, M. F. (2016). World pineapple production: An overview. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 16(4), 11443-11456.

Huang, X., Rao, G., Peng, X., Xue, Y., Hu, H., Feng, N., & Zheng, D. (2023). Effect of plant growth regulators DA-6 and COS on drought tolerance of pineapple through bromelain and oxidative stress. *BMC Plant Biology*, 23(1), 180.

Husain, Q. (2018). Nanocarriers immobilized proteases and their industrial applications: an overview. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 18(1), 486-499.

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

Kamble, B., Kilic, A., Hubbard, K., 2013. Estimating crop coefficients using remote sensing-based vegetation index. *Remote sensing*, 5(4), 1588-1602.

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

Khairunnisa, F. A., Vedder, M., Evers, L., & Permana, S. (2018). Bromelain content of extract from stem of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2019, No. 1). AIP Publishing.

Kuhn, D. M., Balkis, M., Chandra, J., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2003). Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *Journal of clinical microbiology*, 41(1), 506-508.

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

Lahl, W. J., & Braun, S. D. (1994). Enzymatic production of protein hydrolysates for food use.

Lambir Jacobo, A. J., Carezzano, M. E., Quiroga, P. R. ., & Grosso, N. R. (2022). Fracciones de aceite esencial de laurel obtenidas por destilación molecular con mayor actividad antioxidante y antimicrobiana. *AgriScientia*, 39(1), 105–116.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2004). *Overhead Transparency Set for Lehninger Principles of Biochemistry 4th Ed.* WH Freeman.

Lemieux L. & Amiot J. (1989). Application of reversed-phase high- performance liquid chromatography to separation of peptides from phosphorylated and dephosphorylated casein hydrolysates. *J. Chromatogr.*, 73:189-206.

Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American chemical society*, 56(3), 658-666.

Llorente B.E., Brutti, C.B. & Caffini N.O. (2004). “Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) . J. of Agric. and Food Chem. 52 (26): 8182-9.

Lodeiro, A., & Hozbor, D. (2015). Catálisis Enzimática: Fundamentos químicos de la vida. *Facultad deficiencias exactas. Universidad Nacional de la Plata*.

López-García, B., Hernández, M., & Segundo, B. S. (2012). Bromelain, a cysteine protease from pineapple (*Ananas comosus*) stem, is an inhibitor of fungal plant pathogens. *Letters in applied microbiology*, 55(1), 62-67.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.

Mahaut, M., Jeantet, R., & Brulé, G. (2000). Initiation à la technologie fromagère. Technique et documentant Lavoisier Inc.: Paris, France.

Mahmoud, M. I. (1994). Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technol.* 48: 89-95

Manzoor, Z., Nawaz, A., Mukhtar, H., & Haq, I. (2016). Bromelain: Methods of extraction, purification and therapeutic applications. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59.

- Matagne, A., Bolle, L., El Mahyaoui, R., Baeyens-Volant, D., & Azarkan, M. (2017). The proteolytic system of pineapple stems revisited: Purification and characterization of multiple catalytically active forms. *Phytochemistry*, 138, 29-51.
- Maurer, H.R. (2001) Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell Mol Life Sci* 58, 1234–1245.
- Meletiadis, J., Meis, J. F., Mouton, J. W., Donnelly, J. P., & Verweij, P. E. (2000). Comparison of NCCLS and 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) methods of in vitro susceptibility testing of filamentous fungi and development of a new simplified method. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(8), 2949-2954.
- Mendieta, J.R. M.R. Pagano, F.F. Muñoz, G.R. Daleo & M.G. Guevara (2006). Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization. *Microbiology* 152: 2039–47
- Meza-Espinoza, L., de los Ángeles Vivar-Vera, M., de Lourdes García-Magaña, M., Sáyago-Ayerdi, S. G., Chacón-López, A., Becerreá-Verdín, E. M., & Montalvo-González, E. (2018). Enzyme activity and partial characterization of proteases obtained from *Bromelia karatas* fruit and compared with *Bromelia pinguin* proteases. *Food science and biotechnology*, 27, 509-517.
- Monteiro, R. F., Forzza, R. C., & Mantovani, A. (2011). Leaf structure of *Bromelia* and its significance for the evolution of *Bromelioideae* (Bromeliaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 293, 53-64.
- Montero, G., Klekailo, G., Freire, R., Torres, P., Cococcioni, A., & Barberis, I. (2017). Infructescence size has a larger effect than light environment on the abundance of different arthropod feeding guilds dwelling on the infructescences of a terrestrial bromeliad in a xerophytic forest. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 52(3), 216-227.
- Moreno-Hernández, J. M., Hernández-Mancillas, X. D., Navarrete, E. L. C., Mazorra-Manzano, M. Á., Osuna-Ruiz, I., Rodríguez-Tirado, V. A., & Salazar-Leyva, J. A. (2017). Partial characterization of the proteolytic properties of an enzymatic extract from “Aguama”

Bromelia pinguin L. fruit grown in Mexico. *Applied biochemistry and biotechnology*, 182(1), 181-196.

Murachi, T., & Takahashi, N. (1970). Structure and function of stem bromelain. In Structure–Function Relationships of Proteolytic Enzymes (pp. 298-309).

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

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

Negishi, O., & Ozawa, T. (2000). Inhibition of enzymatic browning and protection of sulfhydryl enzymes by thiol compounds. *Phytochemistry*, 54(5), 481-487.

Neurath, H. (1989). "The diversity of proteolytic enzymes". En "Proteolytic Enzymes. A Practical Approach" (Beynon, R.J. y J.S. Bond, eds.), págs. 1-13. IRL Press, Oxford.

Nicosia, F. D., Puglisi, I., Pino, A., Caggia, C., & Randazzo, C. L. (2022). Plant milk-clotting enzymes for cheesemaking. *Foods*, 11(6), 871.

Okayama, A., Cabral, H., & Gustavo Orlando, B. R. (2023). Isolation and Biochemical Characterization of Ananassains, Cysteine Peptidases from the Fruits of Ananas ananassoides. *Current Chemical Biology*, 17(3), 170-181.

Orsini, R. A., & Plastic Surgery Educational Foundation Technology Assessment Committee. (2006). Bromelain. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 118(7), 1640-1644.

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

- Pardo, M.F., López, L.M.I., Caffini, N.O., Natalucci, C.L. (2001). Properties of a milk clotting protease isolated from Fruits of *Bromelia balansae* Mez. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*. 382: 871-874.
- Pavan, R., Jain, S., Shraddha & Kumar, A. (2012) Properties and therapeutic application of bromelain: A review. *Biotechnology Research International*.
- Payrol, J. A., Obregón, W. D., Natalucci, C. L., & Caffini, N. O. (2005). Reinvestigation of the proteolytically active components of *Bromelia pinguin* fruit. *Fitoterapia*, 76(6), 540-548.
- Payrol, J. A., Obregón, W. D., Trejo, S. A., & Caffini, N. O. (2008). Purification and characterization of four new cysteine endopeptidases from fruits of *Bromelia pinguin* L. grown in Cuba. *The protein journal*, 27(2), 88-96.
- Pedersen, B. (1994). Removing Bitterness from Protein Hydrolysates. *Food Technol.* 48: 96-98.
- Pérez, A., Carvajal, C., Trejo, S., Torres, M. J., Martin, M. I., Lorenzo, J. C., ... & Hernández, M. (2010). Penduliflorain I: a cysteine protease isolated from *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez (Bromeliaceae). *The Protein Journal*, 29, 225-233.
- Peterson, G.L. (1979). "Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall", *Anal. Biochem.* 100: 201-20
- Pinheiro A.C., Bourbona AI., Cerqueiraa M.A, Maricato E., Nunes C., Coimbra M.A., Vicentea A.A. (2015). Chitosan/fucoidan multilayer nanocapsules as a vehicle for controlled release of bioactive compounds. *Carbohydr Polym* 115:1–9 Prakash A, Rao J, Berliner J, Pokhare SS, Adak
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., Hübner, H. (2017). Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. In: Gilbert, D., Friedrich, O. (eds) Cell viability Assays. Methods in Molecular Biology, vol 1601. Humana Press, New York, NY.
- Prieto, M.C., Lapaz, M.I., Lucini, E.I., Pianzzola, M.J., Grossi, N.R., Asensio, C.M. (2020). Thyme and suico essential oils: promising natural tools for potato common scab control. *Plant Biology*, 22 (1), 81-89.

- Priolo, N. S., López, L. M. I., Arribére, M. C., Natalucci, C. L., & Caffini, N. O. (1991). New purified plant proteinases for the food industry. *Acta Alimentaria*, 20, 189–196
- Priolo, N., Del Valle, S. M., Arribére, M. C., López, L., & Caffini, N. (2000). Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of Araujia hortorum fruits. *Journal of Protein Chemistry*, 19(1), 39-49.
- Purich, D. L. (2010). Factors influencing enzyme activity. *Enzyme Kinetics: Catalysis & Control—A Reference of Theory and Best-Practice Methods*. Elsevier, Amsterdam.
- Ramli, A. N. M., Aznan, T. N. T., & Illias, R. M. (2017). Bromelain: from production to commercialisation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(5), 1386-1395.
- Ramos, M. V., Demarco, D., da Costa Souza, I. C., & de Freitas, C. D. T. (2019). Laticifers, latex, and their role in plant defense. *Trends in plant science*, 24(6), 553-567
- Rawlings, N.D. & A.J. Barret (2004). “Introduction: clan PB containing N- terminal nucleophile peptidases”, en “Handbook of Proteolytic Enzymes”, 2nd Ed., págs. 2047-9. Elsevier, London.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Thomas, P.D., Huang, X., Bateman, A. & Finn, R.D. (2018) The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res* 46, D624-D632.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
- Ríos, V. M., Gómez Herrera, M. D., Sugita, N. H., & Alayón Luaces, P. (2020). Water status response of pineapple using destructive and non-destructive indicators and their relations in two contrasting seasons. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 19(8), 538-547.
- Ritonja, A., Rowan, A. D., Buttle, D. J., Rawlings, N. D., Turk, V., & Barrett, A. J. (1989). Stem bromelain: amino acid sequence and implications for weak binding of cystatin. *FEBS letters*, 247(2), 419-424.

- Ross M.A., Lembi C.A. (1985). Applied weed science. Burgess Publishing Co, Minneapolis
- Rowan, A. D. & Buttle, D. J. (1994). "Pineapple cysteine endopeptidases." Methods in Enzymology, 244: 555-568.
- Sabbione, A.C.; Ibañez, S.M.; Martínez, E.N.; Añón, M.C.; Scilingo, A.A (2016). Antithrombotic and antioxidant activity of amaranth hydrolysate obtained by activation of an endogenous protease. *Plant. Foods Hum. Nutr.*, 71, 174–182.
- Salahuddin K, Valluvaparidasan V, Ladhalakshmi D, Velazhahan R (2010) Management of bacterial blight of cotton using a mixture of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Plant Prot Sci* 46(2):41–50
- Salerno M. & González J. (2008). Buenas prácticas agrícolas en la producción de ananá de la provincia de Misiones [Archivo PDF]. <http://biblioteca.cfi.org.ar/wp-content/uploads/sites/2/2008/01/46294.pdf>.
- Salese, L. Caracterización de proteasas de bromelias autóctonas y su aplicación en la producción de biopéptidos a partir de proteínas alimentarias. 2023. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Salese, L., Liggieri, C. S., Bernik, D. L., & Bruno, M. A. (2022). Characterization of the fruit proteolytic system of *Bromelia serra* Griseb. (Bromeliaceae) and its application in bioactive peptides release. *Journal of Food Biochemistry*, 46(1), lópe
- Sarath, G., De La Motte, R., & Wagner, F. (1989). Protease assay methods. In 'Proteolytic enzymes: a practical approach'.(Eds R Beynon and J Bond) pp. 25–56.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671-675.
- Scopes, R.K. (1984). "Protein purification. Principles and practice", Springer- Verlag, N.Y., pág. 219.
- Shah, M. A., Mir, S. A., & Paray, M. A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science & Technology*, 94, 5-16.

Sharma, S., Vaid, S., Bhat, B., Singh, S., & Bajaj, B. K. (2019). Thermostable enzymes for industrial biotechnology. In *Advances in enzyme technology* (pp. 469-495). Elsevier.

Silva, S.V. & Malcata, F.X., (2000). Comparative catalytic activity of two plant proteinases upon caprine caseins in solution. *Food Chemistry*. 71:207-14.

Silva, D., Nerys, L., Silva, C., Borba, E., Leite, T., Silva, T., & Sena, A. (2022). Biochemical Characteristics and Healing Activity of *Bromelia laciniosa* Leaf Protease. *Catalysis Research*, 2(3), 1-34.

Silverstein, R. M. (1974). The assay of the bromelains using $\text{Na-CBZ-l-lysine p-nitrophenyl ester}$ and $\text{N-CBZ-glycine p-nitrophenyl ester}$ as substrates. *Analytical Biochemistry*, 62 (2): 478-484

Sinaga, H., Bansal, N., & Bhandari, B. (2017). Gelation properties of partially renneted milk. *International Journal of Food Properties*, 20(8), 1700-1714.

Soares, P. A., Vaz, A. F., Correia, M. T., Pessoa Jr, A., & Carneiro-da-Cunha, M. G. (2012). Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. *Separation and purification technology*, 98, 389-395.

Stevenson P.C., Nyirenda S.P., Mvumi B., Sola P., Kamanula J.M., Sileshi G., Belmain S.R. (2012). Pesticidal plants: a viable alternative insect pest management approach for resource-poor farming in Africa. In: Koul O, Khokhar S, Dhaliwal DS, Singh R (eds) *Bio-pesticides in environment and food security*. Scientific Publishers, Jodhpur, pp 212–238

Sudo, K. (1995). Enzyme kinetics for enzyme immunoassay. *Nihon rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*, 53(9), 2134-2139.

Sugita, N. H., Gómez Herrera, M. D., Marano, R. P., & Alayón Luaces, P. (2022). Evaluation of irrigation frequency on pineapple plants grown in greenhouse conditions. *Scientia Horticulturae*, 302, 111186.

Suh, H. J., Lee, H., Cho, H. Y., & Yang, H. C. (1992). Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple. *Applied Biological Chemistry*, 35(4), 300-307.

Tapia, O. C., & Ruiz, V. M. (2020). *Bioquímica de los procesos metabólicos*. Reverte.

Tochi B, Wang Z, Xu S, Zhang W (2008). Therapeutic application of pineapple protease (bromelain): A review. *Pakistan Journal of Nutrition* 7(4):513–520.man

Vairo Cavalli, S., Claver, S., Priolo, N. & Natalucci, C. (2005). Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate . *J. of Dairy Research*, 72(3): 271-5.

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

Van der Hoorn, R. A., & Jones, J. D. (2004). The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Current opinion in plant biology*, 7(4), 400-407.

Vilanova Neta, J. L., da Silva Lédo, A., Lima, A. A. B., Santana, J. C. C., Leite, N. S., Ruzene, D. S., ... & de Souza, R. R. (2012). Bromelain enzyme from pineapple: In vitro activity study under different micropropagation conditions. *Applied biochemistry and biotechnology*, 168, 234-246.

Villanueva-Alonzo, H. D. J., Polanco-Hernández, G. M., Lizama-Uc, G., Acosta-Viana, K. Y., & Alvarado-Segura, A. A. (2019). Proteolytic activity of wild fruits of *Bromelia karatas* L. of Yucatán, Mexico Actividad proteolítica de frutos silvestres de *Bromelia karatas* L. de Yucatán, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 25(2).

Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. D. M., & Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de hidrolizados proteicos. *Grasas y Aceites*. 52 (2), 132-136.

Vioque, M., Gómez, R., Sánchez, E., Mata, C., Tejada, L., & Fernández-Salguero, J. (2000). Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(2), 451-456.

Walsh, G. (2002). *Biochemistry and Biotechnology*. John Wiley and Sons, Chichester, UK. pp. 37-38, 419-435.

Wani S.P., Lee K.K. (1995). Microorganisms as biological inputs for sustainable agriculture in organic agriculture. In: Behl RK, Khurana AL, Dogra RC (eds) Plant microbe interaction in sustainable agriculture. CCS HAU Hisar and MMB, New Delhi, pp 62–88

Ward, O. P. (2011). Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*, 30, 1119–1139.

Xu X.M, Jeffries P, Pautasso M, Jeger MJ (2011). Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology* 101(9):1024–1031

Yang X, Lu M, Wang Y, Wang Y, Liu Z, Chen S. (2021) Response Mechanism of Plants to Drought Stress. *Horticulturae.*; 7(3):50.

Yegin, S., & Dekker, P. (2013). Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. *Dairy science & technology*, 93(6), 565-594.