



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

**ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DEL LÁTEX DE PLANTAS INDÍGENAS  
URUGUAYAS. OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS  
Y/O ANTIOXIDANTES**

**Q.F. Miriam Barros Baez**

**TESIS DE DOCTORADO**

Presentada como uno de los requisitos para el título de:

**DOCTOR**

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Noviembre/2023



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

**ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DEL LÁTEX DE PLANTAS INDÍGENAS  
URUGUAYAS. OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS  
Y/O ANTIOXIDANTES**

**Tribunal:**

Dra. Silvia Batista

Dra. María Torre

Dra. Cecilia Giacomini

Dra. Ana María Cantera, Director

Dra. Carolina Villadóniga, Director

Dedicada a mis hijos, con todo mi amor

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado en la Facultad de Química, Departamento de Biociencias, Área Bioquímica.

En primer lugar, deseo agradecer a mis directoras de tesis, la Dra. Ana María Cantera y la Dra. Carolina Villadóniga, por su invaluable apoyo académico, enorme paciencia y gran calidad humana.

Al Dr. Diego Vallés, por sus valiosos aportes técnicos, su buena disposición en todo momento y su inacabable energía que contagia.

A todos mis compañeros de Bioquímica de Facultad de Química, con quienes he compartido tantos años de formación, trabajo y también muchos momentos de diversión.

Un agradecimiento especial para Agustín Castilla, por el tiempo que invirtió asistiéndome con el uso del espectrofluorímetro y a Larissa Gioia por recorrer el norte del país en busca de una planta de *Araujia* para mí.

A Cristina Callero y Julián Gago, del Museo y Jardín Botánico Atilio Lombardo, por compartir su conocimiento, por su apoyo técnico y por permitirme extraer muestras de allí.

A María Julia Bassagoda, por su invaluable aporte en la clasificación taxonómica del material vegetal.

A todos los amigos que me han demostrado su apoyo de múltiples formas, especialmente a la siempre presente Claudia Pazos y a mis compinches Carolina de los Santos y Fiorella laquinta.

Por último, quiero dedicar un enorme agradecimiento a mis hijos, por ser tal como son, por dar sentido a mi vida y llenarme de orgullo todo el tiempo.

# Actividad proteolítica del látex de plantas indígenas uruguayas.

## Obtención de péptidos antimicrobianos y/o antioxidantes

Q.F. Miriam Barros Baez, Dr.

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

2023

DIRECTOR: Dra. Ana María B. Cantera y Dra. Carolina Villadóniga

Facultad de Química, Universidad de la República.

### RESUMEN

Las proteasas, además de sus importantes roles fisiológicos, son de gran interés industrial. El látex de diversas plantas es una fuente importante de estas enzimas, relacionadas con la defensa contra patógenos. Una aplicación biotecnológica relevante es la generación de péptidos bioactivos por hidrólisis *in vitro* de proteínas. Se obtuvieron extractos proteolíticos a partir de látex de especies nativas de la región, en particular de *Ficus luschnathiana* (Miq.) Miq., un árbol de la familia Moraceae y de *Araujia sericifera* var. hortorum (E. Fourn.), una enredadera perteneciente a la familia Apocinaceae, subfamilia Asclepiadaceae. Se realizó la caracterización parcial de los extractos crudos, denominados EC<sub>(Ficus)</sub> y EC<sub>(Araujia)</sub>. En este trabajo se describió y caracterizó por primera vez la actividad proteolítica del EC<sub>(Ficus)</sub>. En cuanto al EC<sub>(Araujia)</sub>, sus peptidasas han sido reportadas previamente, por lo que este trabajo se centró en la caracterización de aquellos aspectos del extracto sobre los que aún faltaba información. El EC<sub>(Ficus)</sub> mostró actividad proteolítica del tipo serínica. Los estudios del efecto del pH y la

temperatura en su actividad dieron como resultado máximos a pH 7.5 - 8.0 y 75 °C, respectivamente. La actividad mostró alta estabilidad cuando el extracto fue incubado a diversas condiciones de pH y temperatura. Se mantuvo el 96 % de actividad después de un almacenamiento de 5 meses a 7 °C y pH 7.5. En cambio, el EC<sub>(Araujia)</sub> tuvo una vida media de 40 días en estas condiciones. Respecto a temperaturas compatibles con aplicaciones industriales el EC<sub>(Ficus)</sub> tuvo una vida media de 14 h a 60 °C y pH 7.5, mientras que para el EC<sub>(Araujia)</sub>, a 50 °C y pH 7.5 la vida media fue de 140 min. El EC<sub>(Ficus)</sub> fue más estable a pH 6.5 y el EC<sub>(Araujia)</sub> en el rango de pH 6.0 a 9.0. En ambos casos un medio fuertemente alcalino (pH 9.9) fue el menos favorable. Se emplearon diferentes técnicas de análisis molecular como cromatografías de exclusión molecular, intercambios iónicos, espectrometrías de masas y estudios electroforéticos para estudiar la composición proteica del EC<sub>(Ficus)</sub>. El extracto mostró una composición altamente compleja, conformada por especies polipeptídicas de diferentes tamaños y puntos isoeléctricos, con tendencia a formar agregados dependiendo del pH del medio. Las peptidasas del extracto mantuvieron su actividad en presencia de SDS y agentes reductores. Los extractos crudos fueron capaces de hidrolizar proteínas de lactosueros en condiciones controladas de pH y temperatura. Las fracciones obtenidas se evaluaron en cuanto a su capacidad antioxidante y/o antimicrobiana frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus*. Con el EC<sub>(Ficus)</sub> se obtuvieron fracciones de concentración peptídica 0.96  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ , que lograron inhibir el 94  $\pm$  4 % del crecimiento de *S. aureus*. El uso del EC<sub>(Araujia)</sub> permitió obtener fracciones con capacidad antioxidante de 112,4  $\pm$  4,2 equivalentes Trolox ( $\mu\text{M}$ ). Estudios espectrométricos sugieren que los péptidos derivados de la  $\beta$ -lactoglobulina podrían ser responsables de esta actividad. Los resultados logrados, aprovechando recursos naturales y utilizando procesos controlados y reproducibles desarrollados en condiciones de reacción económicamente sostenibles a escala industrial, hacen del presente trabajo una contribución prometedora para potenciales aplicaciones tecnológicas.

# Proteolytic activity of the latex from Uruguayan indigenous plants.

## Production of antimicrobial and/or antioxidant peptides

Q.F. Miriam Barros Baez, Dr.

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química

Universidad de la República

2023

DIRECTOR: Dra. Ana María B. Cantera y Dra. Carolina Villadóniga

Facultad de Química, Universidad de la República.

### ABSTRACT

In addition to their important physiological roles, proteases are of great industrial interest. The latex of several plants is an important source of these enzymes, which are involved in the defense against pathogens. A relevant biotechnological application is the generation of bioactive peptides by *in vitro* hydrolysis of protein. Proteolytic extracts were obtained from latex of native species of the region, particularly from *Ficus luschnathiana* (Miq.) Miq., a tree of the Moraceae family, and *Araujia sericifera* var. *hortorum* (E. Fourn.), a vine of the family Apocinaceae, subfamily Asclepiadaceae. A partial characterization of crude extracts, named as EC<sub>(Ficus)</sub> and EC<sub>(Araujia)</sub>, was carried out. In this work, the proteolytic activity of EC<sub>(Ficus)</sub> was first described and characterized. As for EC<sub>(Araujia)</sub>, its peptidases have been previously reported, so this work has focused on the characterization of those aspects of the extract for which information was still lacking. EC<sub>(Ficus)</sub> showed serine type proteolytic activity. Studies of the effect of pH and temperature on activity revealed maxima at pH 7.5 - 8.0 and 75 °C, respectively. The activity showed high

stability when the extract was incubated at various pH and temperature conditions. After five months of storage at 7°C and pH 7.5, 96% of the activity was retained. In contrast, EC<sub>(Araujia)</sub> had a half-life of 40 days under these conditions. Regarding temperatures compatible with industrial applications, EC<sub>(Ficus)</sub> had a half-life of 14 hours at 60 °C and pH 7.5, while for EC<sub>(Araujia)</sub> the half-life at 50°C and pH 7.5 was 140 minutes. EC<sub>(Ficus)</sub> was more stable at pH 6.5 and EC<sub>(Araujia)</sub> in the range of pH 6.0 to 9.0. A strongly alkaline medium (pH 9.9) was the most unfavorable in both cases. The protein composition of EC<sub>(Ficus)</sub> was studied using various molecular analytical techniques such as molecular exclusion chromatography, ion exchange, mass spectrometry and electrophoretic studies. The extract showed a highly complex composition, consisting of polypeptide species of different sizes and isoelectric points, with a tendency to form aggregates depending on the pH of the medium. In the presence of SDS and reducing agents, the peptidases of the extract retained their activity. The crude extracts were able to hydrolyze whey proteins under controlled pH and temperature conditions. The resulting fractions were evaluated for their antioxidant and/or antimicrobial capacity against *E. coli* and *S. aureus* strains. EC<sub>(Ficus)</sub> yielded fractions with a peptide concentration of 0.96 µmol mL<sup>-1</sup>, capable of inhibiting 94 ± 4 % of *S. aureus* growth. Using EC<sub>(Araujia)</sub>, fractions with antioxidant capacity of 112.4 ± 4.2 Trolox equivalents (µM) were obtained. According to spectrometric studies, peptides derived from β-lactoglobulin could be responsible for this activity. The results obtained, involving the use of natural resources and using controlled and reproducible processes developed under economically sustainable reaction conditions on an industrial scale, make this work a promising contribution to potential technological applications.



## ÍNDICE

<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Resumen en español</b> .....	v
<b>Resumen en inglés</b> .....	vii
<b>Índice</b> .....	ix
<b>Lista de abreviaturas y siglas</b> .....	xii
<b>1- Introducción</b> .....	1
1.1- Enzimas proteolíticas.....	2
1.1.1- Definición.....	2
1.1.2- Clasificación.....	2
1.1.3- Funciones fisiológicas.....	10
1.1.4- Enzimas proteolíticas en látex.....	11
1.2- Especies laticíferas nativas.....	13
1.2.1- <i>Ficus luschnathiana</i> .....	14
1.2.2- <i>Araujia sericífera</i> .....	15
1.2.3- <i>Sapium glandulosum</i> .....	16
1.3- Aplicaciones de las enzimas proteolíticas.....	18
1.4- Péptidos bioactivos.....	19
1.4.1- Péptidos antimicrobianos.....	20
1.4.2- Péptidos antioxidantes.....	27
1.5- Proteínas de origen lácteo como fuentes de péptidos bioactivos.....	32
1.5.1- Lactosuero.....	32
<b>2- Objetivos</b> .....	36
2.1- Objetivos generales.....	36
2.2- Objetivos específicos.....	36
<b>3- Materiales y métodos</b> .....	37
3.1- Materiales.....	37
3.2- Métodos.....	37
3.2.1-- Preparación del lactosuero de caseinería.....	37
3.2.2- Obtención de los extractos crudos.....	37
3.2.3- Determinación de concentraciones de proteínas y péptidos.....	38

3.2.4- Determinación de la actividad proteolítica.....	38
3.2.5- Determinación de la capacidad de coagulación de la leche.....	30
3.2.6- Parado térmico y efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la actividad proteolítica.....	40
3.2.7- Efecto del pH sobre la estabilidad de la actividad proteolítica.....	40
3.2.8- Efecto del pH y la temperatura en la actividad proteolítica de los extractos.....	41
3.2.9- Efecto de inhibidores en la actividad proteolítica.....	41
3.2.10- Cromatografías de exclusión molecular.....	41
3.2.11- Intercambio iónico del EC <sub>(Ficus)</sub> .....	42
3.2.12- Determinación de puntos isoeléctricos.....	43
3.2.13- Hidrólisis de las proteínas del lactosuero.....	43
3.2.14- Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	44
3.2.15- Zimogramas.....	46
3.2.16- Fraccionamiento de los productos de hidrólisis.....	47
3.2.17- Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	47
3.2.18- Cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC).	48
3.2.19- Evaluación de la actividad antioxidante.....	48
3.2.20- Espectrometría de masas.....	50
3.2.21- Análisis estadístico.....	50
<b>4- Resultados y discusión.....</b>	<b>51</b>
4.1- Caracterización de la actividad proteolítica de los extractos.....	51
4.1.1- Actividad proteolítica de los extractos crudos, efecto de inhibidores y agentes reductores.....	51
4.1.2- Determinación de la capacidad de coagulación de la leche.....	55
4.1.3- Efecto del pH y la temperatura en la actividad proteolítica de los extractos.....	56
4.1.4- Efecto del pH y la temperatura sobre la estabilidad de la actividad proteolítica de los extractos.....	58
4.2- Características moleculares del extracto crudo de <i>Ficus luschnathiana</i> .....	64

4.2.1- Evaluación de la ocurrencia de autólisis de las peptidasas del EC <sub>(Ficus)</sub> .....	64
4.2.2- Fraccionamiento del EC <sub>(Ficus)</sub> por cromatografía de exclusión molecular .....	65
4.2.3- Evaluación de la formación de agregados moleculares dependientes del pH del medio.....	69
4.2.4- Fraccionamiento del EC <sub>(Ficus)</sub> por intercambio iónico.....	74
4.3- Hidrólisis de sueros lácteos.....	79
4.4- Obtención de péptidos antimicrobianos.....	84
4.5- Obtención de péptidos antioxidantes.....	90
4.6- Análisis de las secuencias de los péptidos antioxidantes.....	99
<b>5- Discusión general</b> .....	<b>105</b>
<b>6- Conclusiones</b> .....	<b>107</b>
<b>7- Anexos</b> .....	<b>109</b>
I- Características de la extracción y ejemplos de valores de actividad de los extractos crudos.....	109
II- Ecuaciones de las curvas de calibración.....	111
III- Códigos de denominación de aminoácidos.....	112
IV- Portadas de los trabajos publicados.....	113
<b>8- Referencias</b> .....	<b>115</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

**AAPH-** Diclorhidrato de 2,20-azobis 2-amidinopropano

**ABC-** Área bajo la curva

**AE-** Actividad específica

**ALA-**  $\alpha$ -lactoalbúmina

**ALA<sub><3</sub>**- Fracción peptídica proveniente de hidrolizados de  $\alpha$ -lactoalbúmina, enriquecida en péptidos menores a 3 KDa.

**ANOVA-** Análisis de varianza

**AR-** Actividad remanente

**BLG-**  $\beta$ -lactoglobulina

**BLG<sub><3</sub>**- Fracción peptídica proveniente de hidrolizados de  $\beta$ -lactoglobulina, enriquecida en péptidos menores a 3 KDa.

**BSA-** Seroalbúmina bovina

**CaCl<sub>2</sub>**- Cloruro de calcio

**CI<sub>50</sub>**- Concentración inhibitoria 50

**CIM-** Concentración inhibitoria mínima

**CONAPROLE-** Cooperativa Nacional de Productores de Leche

**DBO-** Demanda bioquímica de oxígeno

**DEAE-** Dietilaminoetil

**DPPH-** 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

**DQO-** Demanda química de oxígeno

**E-64-** Trans- epoxisuccinil- L-leucilamida-(4-guanidino)-butano

**EC-** Extracto crudo

**EC<sub>(Ficus)</sub>**- Extracto crudo obtenido a partir de látex de *Ficus luschnathiana*

**EC<sub>(Araujia)</sub>**- Extracto crudo obtenido a partir de látex de *Araujia sericifera*

**EDTA-** Ácido etilendiaminotetraacético

**E/S-** Relación enzima/sustrato

**ET-** Equivalentes Trolox

**GH-** Grado de hidrólisis

**GLYCAM-1-** Molécula de adhesión celular 1 dependiente de glicosilación

**HCl-** Ácido clorhídrico

**LS-** Lactosuero

**LSC-** Lactosuero de caseinería

**LSC<sub><3</sub>**- Fracción peptídica proveniente de hidrolizados de lactosuero de caseinería, enriquecida en péptidos menores a 3 KDa.

**LSC<sub>3-10</sub>**- Fracción peptídica proveniente de hidrolizados de lactosuero de caseinería, enriquecida en péptidos de tamaños entre 3 y 10 KDa.

**LSC<sub>>10</sub>**- Fracción peptídica proveniente de hidrolizados de lactosuero de caseinería, enriquecida en péptidos mayores a 10 KDa.

**LSM-** Lactosuero proveniente de la producción de Mozzarella

**LSM<sub><3</sub>**- Fracción peptídica proveniente de hidrolizados de lactosuero de Mozzarella, enriquecida en péptidos menores a 3 KDa.

**LSM<sub>3-10</sub>**- Fracción peptídica proveniente de hidrolizados de lactosuero de Mozzarella, enriquecida en péptidos de tamaños entre 3 y 10 KDa.

**LSM<sub>>10</sub>**- Fracción peptídica proveniente de hidrolizados de lactosuero de Mozzarella, enriquecida en péptidos mayores a 10 KDa.

**Ms-** Muestra de siembra

**NaCl-** Cloruro de sodio

**NaOH-** Hidróxido de sodio

**ORAC-** Capacidad de absorción de radicales de oxígeno

**PAGE-** Electroforesis en geles de poliacrilamida

**PAM-** Péptido antimicrobiano

**PAO-** Péptido antioxidante

**PBA-** Péptido bioactivo

**PM-** Peso molecular

**PMSF-** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

**ROS-** Sustancias reactivas de oxígeno

**RP-HPLC-** Cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa

**SDS-** Dodecil sulfato de sodio

**TCA-** Ácido tricloroacético

**TBNS-** Ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico

**TRIS-** Tris(hidroximetil)aminometano

**TROLOX-** Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

**TTZ-** Cloruro de 2,3,5- trifenil tetrazolio

**UCL-** Unidad de coagulación de la leche

**UE-** Unidad de enzima

**UFC-** Unidades formadoras de colonia

**V<sub>0</sub>-** Volumen muerto

## 1- INTRODUCCIÓN

La utilización de enzimas a nivel industrial trae aparejadas diversas ventajas que no suelen ofrecer los tratamientos químicos convencionales. A los beneficios de las altas eficiencias obtenidas con estos catalizadores y su biodegradabilidad, se suman la posibilidad de obtención de productos de mayor calidad, con menor consumo de energía y generación de desechos.

En particular, las investigaciones basadas en la búsqueda, caracterización y aplicación de nuevas enzimas proteolíticas son de gran interés y se encuentran en continuo crecimiento debido a que este tipo de enzimas actualmente constituyen el 60% de todas las que se comercializan a nivel mundial (Troncoso y col., 2022).

El presente trabajo se centró en la obtención de extractos proteolíticos a partir de ejemplares laticíferos de la flora nativa del Uruguay, para su aplicación en la generación de péptidos bioactivos utilizando sueros lácteos como fuente de proteínas sustrato.

Se consideró prioritario el aprovechamiento de recursos naturales normalmente desaprovechados, de manera de utilizar insumos de bajo requerimiento económico que tuvieran el potencial de generar productos de alto valor agregado.

Se realizaron diversos estudios de caracterización bioquímica de los extractos proteolíticos, generándose conocimiento en áreas de las cuales la información bibliográfica es muy escasa o nula, y logrando información relevante para el diseño de los procesos catalíticos que se llevaron a cabo.

Los procesos biotecnológicos utilizados siguieron una estrategia de diseño que contempló futuras aplicaciones competitivas tanto desde el punto de vista energético como económico, por lo que se basaron en el uso de temperaturas y tiempos de reacción moderados, además de minimizar el grado de procesamiento de los extractos y lactosueros empleados.

## 1.1- ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

### 1.1.1- Definición

Las enzimas proteolíticas son catalizadores biológicos cuyo rol consiste en la ruptura de los enlaces peptídicos presentes en proteínas y péptidos.

En la amplia mayoría de los casos, el enlace peptídico se cliva hidrolíticamente, consumiéndose una molécula de agua, lo que clasifica a estas enzimas como hidrolasas. Estas enzimas proteolíticas se denominan también proteasas, proteinasas o peptidasas, siendo esta última denominación la más utilizada actualmente.

Este término se aplica también a las enzimas denominadas omega peptidasas, las cuales son capaces de clivar los enlaces isopeptídicos, como los que unen a las proteínas con las etiquetas que señalan sus destinos de degradación o de exportación a otros compartimientos celulares, tal es el caso de las enzimas desubiquitinantes (Amerik y Hochstrasser, 2004). También son omega peptidasas las enzimas que pueden liberar un aminoácido N-terminal modificado, como la piroglutamato-peptidasa I, que libera un piroglutamato N-terminal, y la acilaminoacil-peptidasa, que libera un aminoácido acilado N-terminal (Rawlings, 2020).

### 1.1.2- Clasificación

Las peptidasas pueden diferenciarse según la posición de sus sitios de corte en la proteína sustrato y por la naturaleza química de los residuos catalíticos, también conocido como tipo catalítico.

El sistema de la Comisión de Enzimas (EC, del inglés Enzyme Commission) de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, utiliza un híbrido de estos dos sistemas para clasificar a las diferentes proteasas. En el sistema EC, las proteasas se clasifican en la clase 3 (hidrolasas), la subclase 4 (actúan en el enlace peptídico) y se agrupan en diferentes sub-subclases (11,13-18, 21-24 o 99) según la posición del enlace que cliven en el sustrato y su tipo catalítico. El cuarto dígito



se utiliza para individualizar y distinguir a cada proteasa dentro de la sub-subclase correspondiente.

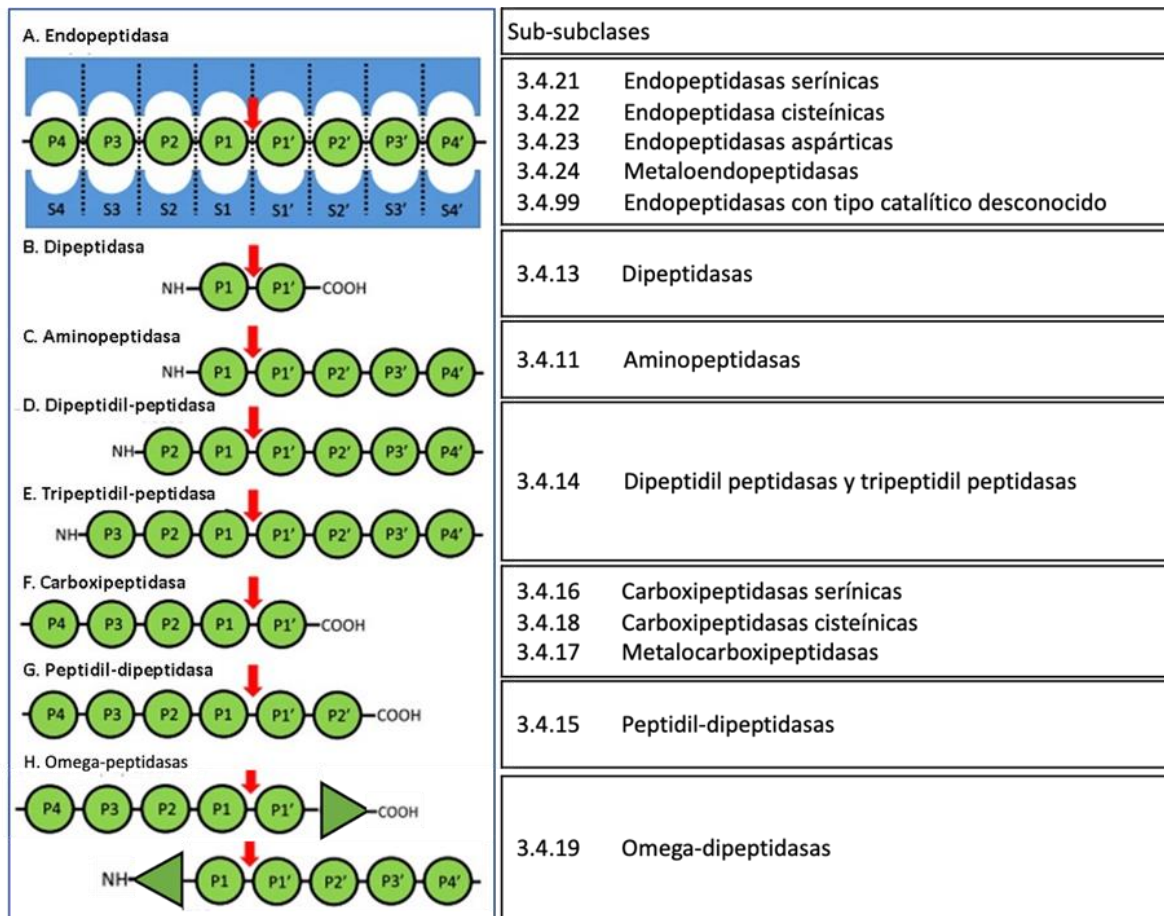
Sin embargo, esta clasificación presenta limitaciones debido a la gran diversidad estructural y la complejidad para definir la especificidad de las proteasas de una forma precisa. Para abordar estas limitaciones, hace 25 años, Barrett y Rawlings propusieron el sistema MEROPS, un sistema de clasificación de las peptidasas más preciso y eficiente, basado en la comparación de sus rasgos estructurales y secuencias, que reflejan su relación evolutiva (Rawlings, 2020). Este sistema está disponible en la base de datos MEROPS, accesible en el sitio web: <https://www.ebi.ac.uk/merops/>.

Las peptidasas generalmente se dividen en exopeptidasas y endopeptidasas. Se denominan exopeptidasas a las que actúan en los extremos amino o carboxilo, clivando el enlace peptídico entre alguno de los tres residuos terminales. Las exopeptidasas que liberan sólo el aminoácido amino o carboxílico terminal se denominan aminopeptidasas o carboxipeptidasas respectivamente. Las que liberan el dipéptido terminal se denominan dipeptidasas, siendo una dipeptidil-peptidasa si lo hace a partir del extremo amínico o peptidil-dipeptidasa si lo hace desde el carboxílico. Por último, una tripeptidil-peptidasa libera un tripéptido desde el extremo amino terminal.

Una endopeptidasa, en cambio, tiene la capacidad de romper un enlace alejado de los extremos. Aunque estas enzimas también pueden llegar a escindir un enlace cercano a los terminales, no requieren extremos libres como condición para su funcionamiento. En la figura 1 se esquematiza la acción de endo y exopeptidasas.

Las proteasas se agrupan en seis categorías según su tipo o mecanismo catalítico: proteasas serínicas, cisteínicas, treonínicas, aspárticas, metálicas y glutámicas. En los tres primeros tipos el nucleófilo en la reacción hidrolítica es un grupo de un residuo aminoacídico de la enzima: un hidroxilo en los casos de proteasas serínicas o treonínicas y un tiol en las cisteínicas, formándose un intermediario covalente. En los otros tres casos, el nucleófilo es una molécula de agua activada que se une a ácido aspártico, un ion metálico o a ácido glutámico respectivamente. Existe

también cierto número de peptidasas a las que, por no disponerse de información suficiente, no ha sido posible aun clasificarlas en alguna categoría determinada.

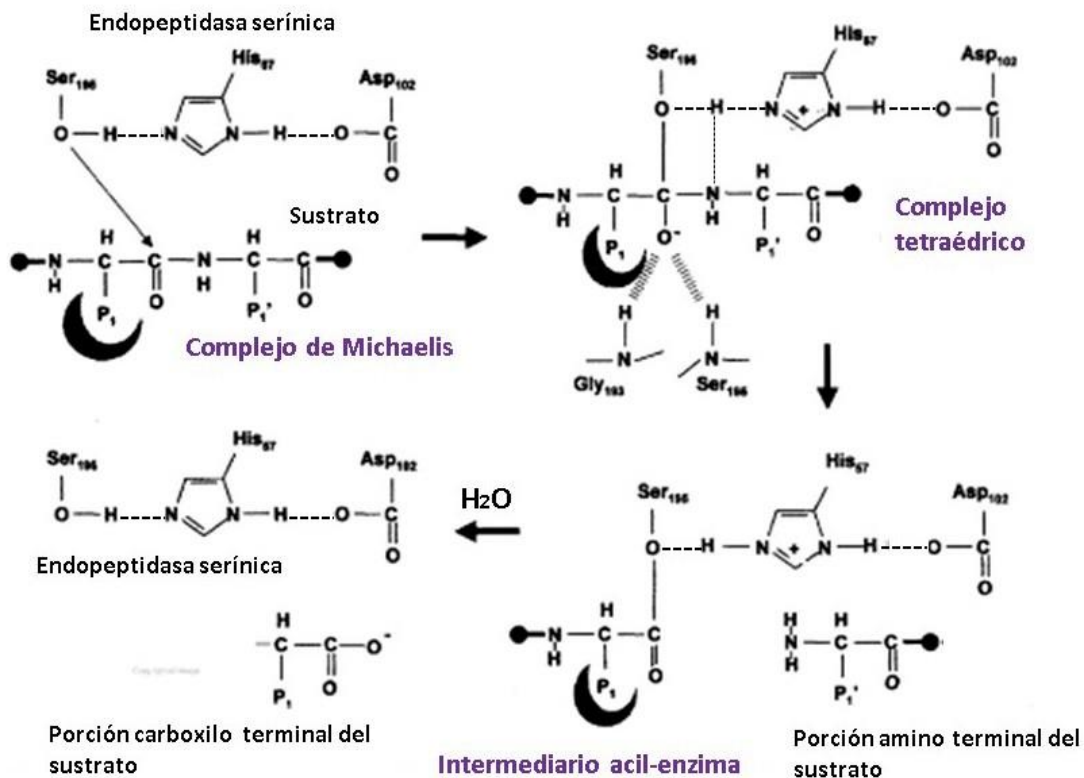


**Figura 1- Esquema de la acción de endopeptidasas y exopeptidasas.** Cada uno de los círculos verdes representa a un aminoácido y las líneas horizontales que los unen son los enlaces peptídicos. La flecha roja vertical señala el enlace a ser escindido. A. El rectángulo azul representa a una endopeptidasa y las líneas punteadas verticales delimitan los bolsillos de unión al sustrato llamados S4, S3...S4'. B., C., D., E., F. y G. muestran la acción de una dipeptidasa, aminopeptidasa, dipeptidil-peptidasa, tripeptidil-peptidasa, carboxipeptidasa y peptidil-dipeptidasa respectivamente. (Adaptado de Rawlings, N., 2020).

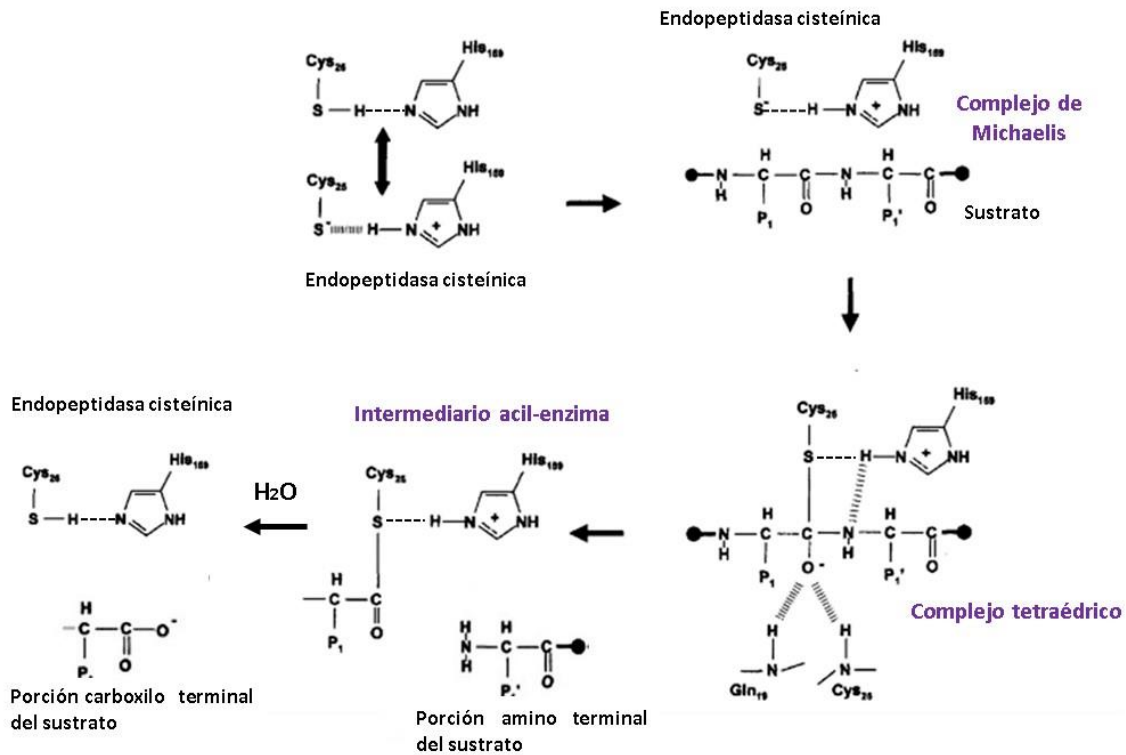
Además del nucleófilo que esté actuando directamente en el ataque hidrolítico, otros residuos aminoacídicos están involucrados en la catálisis y forman parte también del sitio activo de la enzima. En el caso de las enzimas con nucleófilo proteico, es muy común la existencia de una tríada catalítica. En estos casos, generalmente un

residuo de histidina actúa como base y un residuo de ácido aspártico contribuye a orientar y polarizar el anillo de histidina (Rawlings, N., 2020).

En la figura 2 se ilustra el mecanismo de reacción de endopeptidasas serínicas; ejemplos de este tipo de proteasas son la tripsina, quimiotripsina y subtilisina. La figura 3 muestra el mecanismo de reacción de endopeptidasas cisteínicas, ejemplos de las cuales son la papaína, bromelaína y calpaínas.

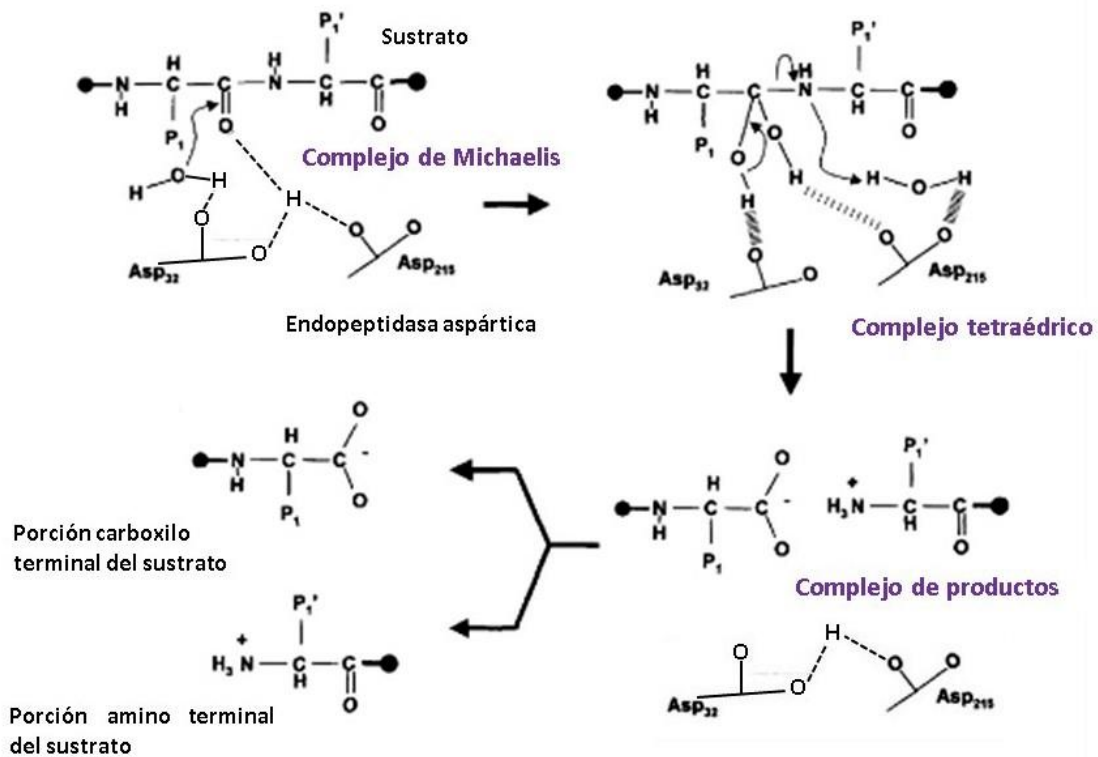


**Figura 2- Esquema del mecanismo de acción de las peptidasas serínicas.** La etapa de acilación consiste en dos pasos; en el primero se forma un éster entre el oxígeno de la serina y la porción acilo del sustrato, constituyéndose un intermediario tetraédrico con carga negativa. En el segundo paso se reconstituye el carbonilo y se libera la porción amino terminal como primer producto, quedando el resto del sustrato unido a la enzima formando un intermediario acil-enzima. En la etapa de desacilación, una molécula de agua actúa como segundo nucleófilo liberándose el producto carboxilo terminal y la enzima. (Adaptado de Dunn, B.M., 1989).



**Figura 3- Esquema del mecanismo de acción de las peptidasas cisteínicas.** El residuo de cisteína está formando parte de un equilibrio entre su forma no cargada y la switeriónica. En la etapa de acilación, es la forma switeriónica la que estabiliza al complejo de Michaelis, que, por ataque nucleofílico del sulfuro aniónico sobre el carbono carbonílico del sustrato, evoluciona hacia la formación del complejo tetraédrico. A continuación, se libera la porción amino terminal del sustrato formándose un intermediario acil-enzima., el cual, por acción de una molécula de agua que actúa como segundo nucleófilo, se descompone en la porción carboxilo terminal del sustrato y la endopeptidasa libre. (Adaptado de Dunn, B.M., 1989).

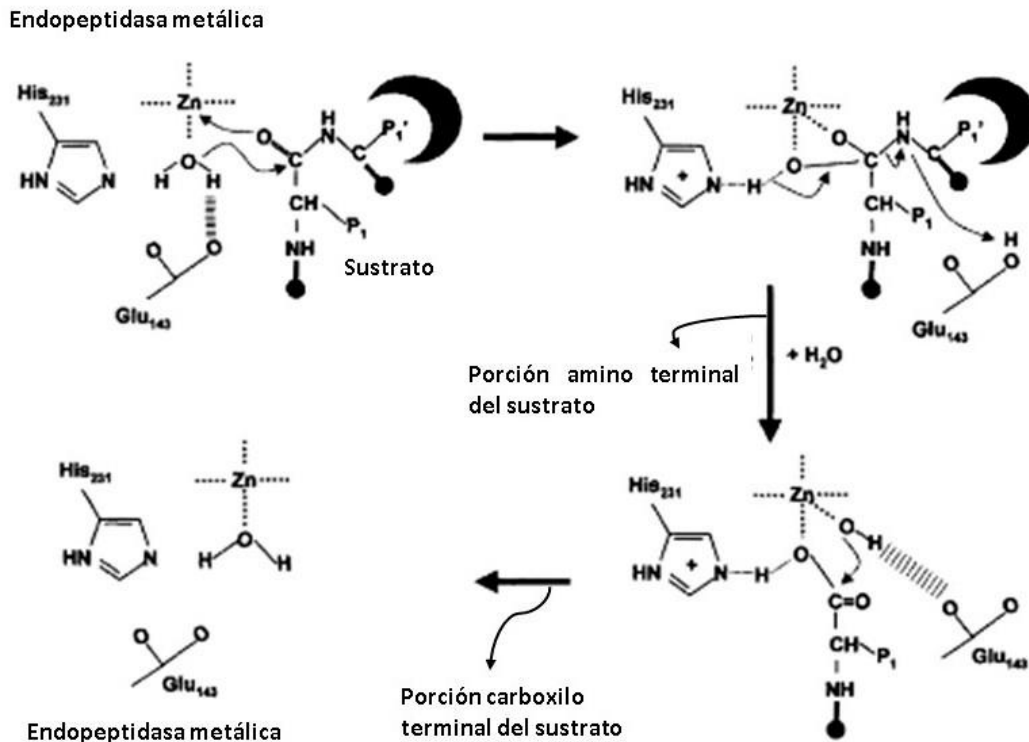
En los casos de las proteasas aspárticas y las metálicas, los intermediarios formados no son covalentes, sino que en el caso de las aspárticas se da una catálisis ácido-base y en el de las metálicas se produce una coordinación a un ion metálico. En la figura 4 puede apreciarse el mecanismo catalítico de proteasas aspárticas, entre cuyos ejemplos se encuentran la quimosina, la pepsina y las catepsinas D y E.



**Figura 4- Esquema del mecanismo de acción de las peptidasas aspárticas.** Los residuos catalíticos son dos cadenas laterales de ácido aspártico, cuyos grupos carboxilo están posicionados lo suficientemente cerca como para formar puentes de hidrógeno entre dos de sus oxígenos. Una molécula de agua se mantiene en estrecha relación con el sitio activo, unida por puentes de hidrógeno a los dos residuos aspárticos. El oxígeno de la molécula de agua ataca al carbonilo del sustrato, formándose el complejo tetraédrico. Los grupos carboxilatos de los aspárticos promueven la transferencia de protones que lleva a la ruptura de este intermediario, dando como resultado un complejo que contiene las dos partes del sustrato (amino y carboxilo terminal) y cuya posterior disociación da lugar a la liberación de los correspondientes productos finales. (Adaptado de Dunn, B.M., 1989).

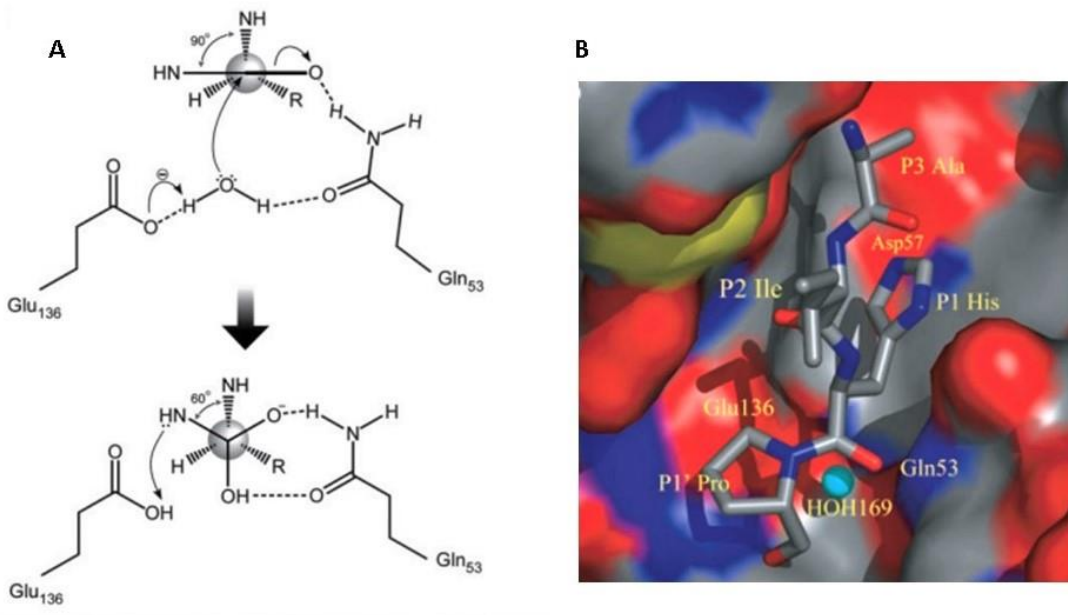
La figura 5 esquematiza la acción de peptidasas metálicas. Este tipo de proteínas requiere un ion metálico para su acción, el cual usualmente es zinc, como en el caso de las metaloproteinasas de la matriz extracelular, pero también puede utilizarse algún otro metal de transición, como el cobalto, níquel o manganeso. Si bien en la mayoría de las metaloproteinasas se requiere solamente un ion metálico, en algunos casos dos iones actúan cocatalíticamente. El ion metálico se coordina con la proteínasa por medio de tres residuos que pueden variar entre ácido glutámico,

ácido aspártico, histidina, arginina y lisina. La cuarta posición de coordinación es ocupada por una molécula de agua (Rawlings, N., 2020). Son ejemplos de este tipo de peptidasas la termolisina y carboxipeptidasa A.



**Figura 5- Esquema del mecanismo de acción de las peptidasas metálicas.** En el ejemplo (termolisina) el metal está coordinado tetraédricamente con dos residuos de histidina, uno de ácido glutámico y una molécula de agua presente en el sitio activo y asociada también por puente de hidrógeno al residuo de ácido glutámico. El grupo carbonilo del ácido glutámico atrae uno de los protones de la molécula de agua impulsando así el ataque nucleofílico del oxígeno de la misma al carbonilo del enlace peptídico del sustrato. Un protón, proveniente probablemente del ácido glutámico, es transferido al grupo amino saliente. Un segundo ataque nucleofílico de una molécula de agua provoca la liberación de la porción carboxilo terminal del sustrato. (Adaptado de Dunn, B.M., 1989).

Fujinaga y col. reportaron en 2004 su trabajo con una enzima proveniente de *Scytalidium lignicolum*, que les permitió dilucidar el mecanismo catalítico de las peptidasas glutámicas, en el cual está involucrada una díada catalítica única de un glutamato y una glutamina. En la figura 6 se detalla el mecanismo propuesto.



**Figura 6- Mecanismo propuesto para peptidasas glutámicas.** **A-**Una molécula de agua está unida a un residuo de ácido glutámico y a una glutamina. El grupo carboxilato del ácido glutámico actúa como base captando un protón del agua y activándola así para el ataque nucleofílico., de manera similar a lo que sucede con las proteasas metálicas, al mismo tiempo que la amida de la cadena lateral de la glutamina polariza el carbonilo del enlace a ser escindido, generándose así un intermediario tetraédrico. A continuación, un protón es donado al grupo saliente. Los autores sugieren que el donante es el ácido glutámico que activó en primer lugar a la molécula de agua, por analogía a lo que sucede con las proteasas aspárticas y metálicas. **B-** Un sustrato con secuencia Ala-Ile-His-Pro se encuentra en el sitio activo de la enzima. El hidroxilo que realiza el ataque nucleofílico está representado por la esfera azul claro. (Fujinaga y col., 2004).

Aunque la elucidación del mecanismo catalítico de una enzima proteolítica puede requerir numerosos métodos de análisis, en muchas ocasiones es posible catalogar una nueva peptidasa utilizando un set básico de inhibidores estándar para los diferentes tipos catalíticos, que actúan con cierta especificidad sobre cada uno de ellos. Ejemplos de ellos son el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF por su nombre en inglés: phenylmethanesulphonyl fluoride), trans- epoxisuccinil- L-leucilamida-(4-guanidino)-butano (E-64), pepstatina y 1,10-fenantrolina, cuyas proteasas blanco son las serínicas, cisteínicas, aspárticas y metálicas respectivamente (Dunn, B.M., 1989). Existe un gran número de inhibidores además de los recién mencionados,



de alto o bajo peso molecular y diferentes grados de especificidad, que pueden ser utilizados también para determinación de mecanismos catalíticos, titulación del sitio activo, inhibición de proteólisis no deseada, etc. Beynon y Salvesen (1989) publicaron un listado muy completo de inhibidores comerciales, indicando especificidades, tamaños moleculares, rangos de concentración efectiva, etc. En la tabla 1 se resumen las características de acción de algunos de los inhibidores más utilizados para la determinación del mecanismo catalítico de endopeptidasas.

**Tabla 1- Especificidades y rangos de concentración efectiva de algunos inhibidores de endopeptidasas.**

Inhibidor	Especificidad	Concentración efectiva
PMSF	Proteasas serínicas. También puede inhibir cisteínicas	0.1-1.0 mM
Aprotinina	Proteasas serínicas, excepto trombina y factor Xa	Equimolar con la peptidasa
E-64	Proteasas cisteínicas	1-10 $\mu$ M
Iodoacetamida	Proteasas cisteínicas, pero puede actuar también sobre otras proteinasas	10 -100 $\mu$ M
Pepstatina	Algunas proteasas aspárticas, como catepsina D, pepsina, renina y varias proteinasas aspárticas microbianas	1 $\mu$ M
1,10-Fenantrolina	Metaloproteasas y otras peptidasas activadas por metales	1.0-10.0 mM
EDTA*	Proteasas metálicas. Actúa como quelante del ion zinc del sitio activo. También puede inhibir otras enzimas dependientes de iones metálicos como peptidasas cisteínicas dependientes de calcio	1.0-10.0 mM

\* EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

### 1.1.3- Funciones fisiológicas

Las enzimas proteolíticas están ampliamente distribuidas en animales, vegetales y microorganismos, habiéndose reportado también varias familias de peptidasas virales (Rawlings y Bateman, 2021).



Los genes que expresan a estas enzimas representan aproximadamente el 2% del genoma humano y del 1 al 5 % del genoma de organismos infecciosos (D'Ipólito y col., 2018). Participan en los más importantes procesos fisiológicos tanto a nivel celular como de la totalidad del organismo. Estos procesos incluyen digestión, coagulación de la sangre, embriogénesis, respuesta inmune, etc., y están regulados a diferentes niveles como transcripción, traducción, activación de zimógenos, degradación específica de enzimas maduras, cambios de pH e inhibidores (Dunaevsky y col., 2014).

En particular las enzimas proteolíticas de origen vegetal han recibido especial atención debido a la propiedad de mantener su actividad en un amplio rango de temperatura y pH (Devaraj y col., 2007; Priolo y col., 2000 y 2001). Suelen clivar enlaces peptídicos en diversas secuencias de aminoácidos, lo que comúnmente se denomina como amplia especificidad de sustrato y son activas en presencia de compuestos orgánicos, así como de otros aditivos (Singh y col., 2008).

Los roles fisiológicos de las enzimas proteolíticas en los vegetales incluyen la hidrólisis de proteínas de almacenamiento durante la germinación de las semillas, activación de pro enzimas, degradación de proteínas defectuosas, etc. (Priolo y col., 2000). También intervienen en la respuesta al estrés, reconocimiento de patógenos, inducción de respuesta de defensa, iniciación de muerte celular, senescencia, etc. (Singh y col., 2008). Sin embargo, la causa de la presencia de niveles notoriamente elevados de enzimas proteolíticas en algunas especies, si bien no ha sido totalmente dilucidada, probablemente se deba al cumplimiento de roles de defensa contra patógenos y parásitos (Trejo y col., 2001).

#### **1.1.4- Enzimas proteolíticas en látex**

El látex es una secreción vegetal con aspecto de fluido generalmente lechoso, producida y secretada por células alargadas altamente especializadas denominadas laticíferas. Estas células forman un sistema secretor que suele tener estructura de red y se distribuye por toda la planta (Lahmar y col., 2022).

El látex contiene, en solución o suspensión, una mezcla de sustancias entre las cuales se encuentran alcaloides, terpenoides, furanocumarinas, saponinas y numerosas enzimas como glicosidasas, proteasas, fosfatasas, amilasas, quitinasas, glucanasas, etc., que, combinadas con gomas del citoplasma parietal, están involucradas en diferentes mecanismos de defensa de la planta contra patógenos e insectos y en la cicatrización de las heridas (Pereira y col., 1999; Lahmar y col., 2022).

Las especies laticíferas son numerosas y se encuentran principalmente distribuidas en las familias Euphorbiaceae, Caricaceae, Apocynaceae y Moraceae (Samrot y col., 2022).

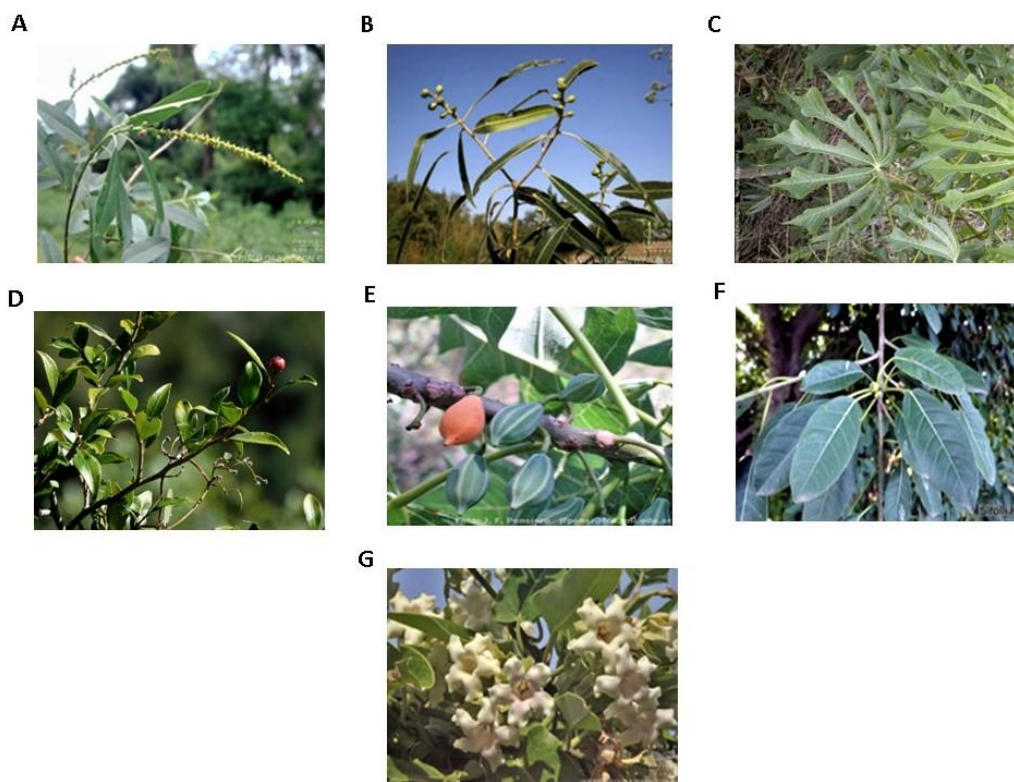
En látex obtenidos de plantas de diversas familias, las enzimas proteolíticas constituyen más del 50% del total de proteínas (Obregón y col., 2001). Ejemplo de esto es el látex de *Carica papaya*, cuyo contenido proteico está constituido en un 69-89% por proteasas cisteínicas (Samrot y col., 2022).

Las peptidasas más comunes en los fluidos laticíferos son cisteínicas y serínicas (Ramos y col., 2019; Samrot y col., 2022). Las proteasas cisteínicas se encuentran generalmente en látex de las familias Caricaceae, Apocynaceae y Moraceae, mientras que las serínicas son comunes en Euphorbiaceae, Convolvulaceae, Apocynaceae y Moraceae. Rara vez se encuentran proteasas metálicas o aspárticas y hasta el momento no se ha reportado la presencia de treonínicas o glutámicas (Samrot y col., 2022).

## 1.2- ESPECIES LATICÍFERAS NATIVAS

Se denomina especies nativas, indígenas o autóctonas a aquellas cuyo hábitat se corresponde con determinada región y cuya presencia allí es el resultado de fenómenos estrictamente naturales. Por lo general, estas regiones están determinadas por sus características climáticas y sus ecosistemas y no suelen corresponderse con las fronteras geográficas entre naciones.

Entre las plantas laticíferas nativas de nuestra región se encuentran varias especies pertenecientes principalmente a las familias Euphorbiaceae (figura 7 A-D), Caricaceae (figura 7 E), Moraceae (figura 7 F), y Apocinaceae (figura 7 G),



**Figura 7- Principales especies laticíferas nativas del Uruguay. A- *Sapium glandulosum* (L.) Morong (árbol de la leche) B- *Sapium haematospermum* Müll. Arg. (curupí) C- *Manihot grahamii* Hook (falsa mandioca) D- *Sebastiania brasiliensis* Spreng. (blanquillo) E- *Vasconcellea quercifolia* A. St.-Hil (higuera del monte) F- *Ficus luschnathiana* (Miq.) Miq. (higuerón) G- *Araujia sericifera* Brot. (taso o tasi).** Las imágenes fueron extraídas del Instituto de Botánica Darwinion y de iNaturalist, iniciativa conjunta de la Academia de Ciencias de California y la National Geographic Society: <https://www.inaturalist.org>

### 1.2.1- *Ficus luschnathiana*

El *Ficus luschnathiana* (Miq.) Miq. fue descrito en 1867 por el botánico holandés Friedrich Anton Wilhelm Miquel. Esta especie de *Ficus*, llamada comúnmente higuieron o agarrapalo, es propia del Brasil meridional, Paraguay, el nordeste argentino y Uruguay. Perteneciente a la familia Moraceae, es un árbol de amplia copa, laticífero, de 10-15 m de altura y follaje semipersistente de color verde oscuro.

Sus hojas son simples y alternas, de forma elíptica. Sus flores son apétalas, unisexuadas, dispuestas en gran número dentro de un receptáculo (sicono) con un diminuto orificio denominado ostiolo (Figura 8 A). La polinización es realizada por pequeñas avispas del género *Blastophaga*, que entran al sicono por el ostiolo. Las aves frugívoras esparcen las semillas con sus deposiciones. Estas semillas frecuentemente germinan sobre troncos de palmeras u otros árboles diversos, por lo que el *Ficus luschnathiana* se comporta muchas veces como epífita, como puede verse en la figura 8 B. (Ventoso, A., 2014).



**Figura 8- *Ficus luschnathiana*. A-** Rama con siconos. **B-** Crecimiento epífita.

Se ha usado el nombre ficinas para describir la actividad endoproteolítica del látex de árboles del género *Ficus*. Las ficinas aisladas de látex de diferentes *Ficus* poseen propiedades características distintivas y pueden exhibir diferentes mecanismos catalíticos. Por ejemplo, en látex de *Ficus glabrata*, *Ficus carica* y *Ficus anthelmintica* se han encontrado ficinas cisteínicas, mientras que la ficina E aislada de *Ficus elastica* es una endopeptidasa serínica (Devarajj y col., 2007).

No se han encontrado reportes previos a este trabajo, relacionados a la actividad proteolítica de ficinas provenientes de *F. luschnathiana*.

### 1.2.2- *Araujia sericífera*

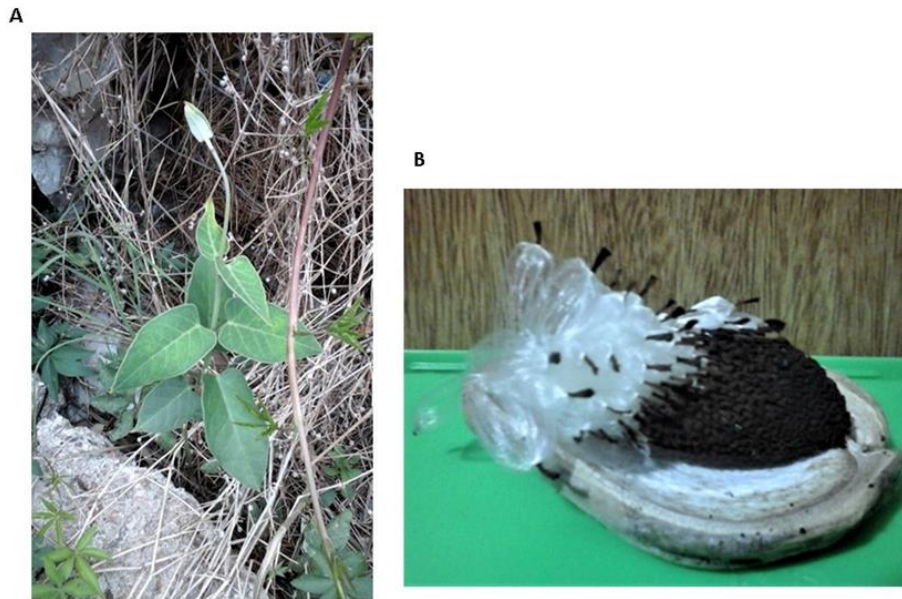
La *Araujia sericífera* Brot., fue descrita por Félix de Avelar Brotero en 1818. El género *Araujia* recibió su nombre en honor del botánico portugués António Araújo de Azevedo, 1º Conde de Barca (1754-1817). La palabra sericífera hace alusión a los filamentos sedosos que recubren sus semillas.

Esta especie, perteneciente a la familia Apocynaceae, subfamilia Asclepiadaceae, puede nombrarse también por medio de una larga lista de sinónimos, entre los que se incluyen *Araujia hortorum* (E. Fourn), *Araujia sericifera* var. *hortorum* (E. Fourn.), etc. En cuanto a su nombre común, se la conoce como jazmín de Tucumán, planta cruel, miraguano, taso o tasi. Su distribución natural incluye las zonas del sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y el este de Argentina, pero debido a que fue introducida como planta ornamental en varios lugares del mundo, actualmente se la encuentra también en el sur de Europa, Sudáfrica, América del Norte, Australia y Nueva Zelanda (Santa Cruz y Cordero, 2018).

Es una enredadera subarborescente perenne, que crece envolviendo troncos y ramas de árboles, tejidos de alambrados o apoyándose en muros. Posee hojas simples opuestas; oblongas o lanceoladas figura 9 A. La polinización es entomófila. Su fruto es un folículo de forma ovoide de entre 8 y 12 cm de largo, que contiene en su interior las semillas coronadas de filamentos sedosos (figura 9 B), los cuales



contribuyen a la dispersión aérea impulsada por el viento (Instituto de Botánica Darwinion, 2018).



**Figura 9- *Araujia sericifera*. A-** Planta en crecimiento. **B-** Fruto cortado, exhibiendo las semillas adheridas a los filamentos sedosos.

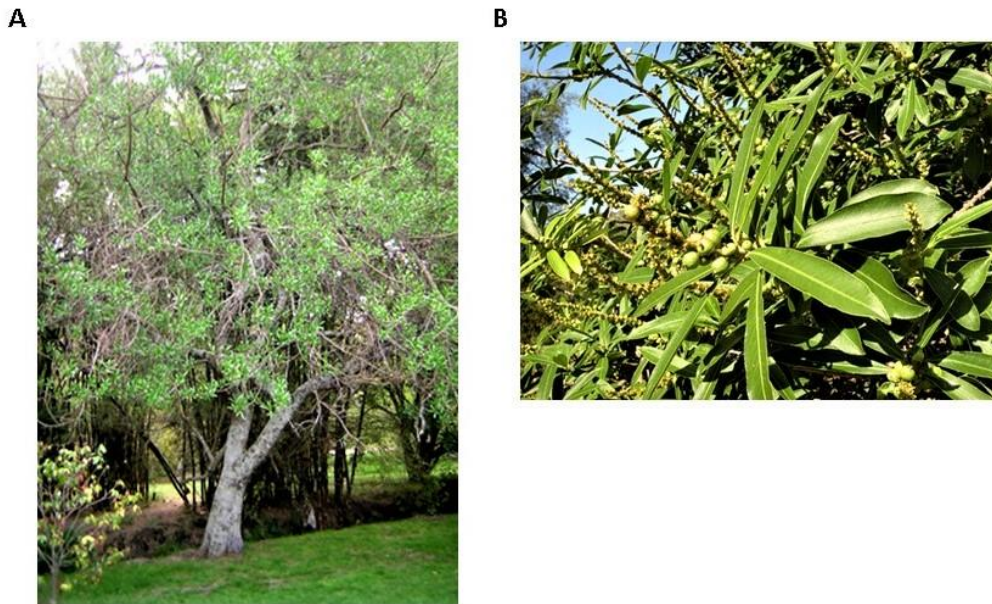
Se ha reportado el aislamiento y caracterización de tres endopeptidasas cisteínicas obtenidas a partir del látex de frutos de *Araujia sericifera*, denominadas araujiana h I, araujiana h II y araujiana h III (Priolo y col., 2000 y 2001; Obregón y col., 2001). Análisis por espectrometría de masas revelaron que estas tres peptidasas tienen pesos moleculares de 24.0, 23.7 y 23.5 kD, respectivamente. Sus puntos isoeléctricos son básicos: el de araujiana h-I es mayor que 9.3, el de araujiana h-II es 8.9 y el de araujiana h-III es mayor que 10.5 (Obregón y col., 2001; Priolo y col., 2000 y 2001).

### 1.2.3- *Sapium glandulosum*

El *Sapium glandulosum* (L.) Morong, denominado también árbol de la leche o curupí, es un árbol laticífero perteneciente a la familia Euphorbiaceae, que se distribuye en

extensas zonas de Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay (Instituto de Botánica Darwinion, 2018).

Es un árbol de 7 a 9 m de altura, pudiendo alcanzar los 20 m. Se encuentra en lugares bajos y húmedos, como orillas de ríos, arroyos, lagunas y bañados de todo el país. Sus hojas son simples, alternadas y lanceoladas, con bordes aserrados (figura 10).



**Figura 10- *Sapium glandulosum*. A- Árbol. B- Hojas y frutos.** Las imágenes fueron extraídas del material editado por RAP-AL Uruguay como calendario del año 2007 ([https://www.rapaluruquay.org/sitio\\_1/organicos/articulos/especies\\_alternativas.html](https://www.rapaluruquay.org/sitio_1/organicos/articulos/especies_alternativas.html)) y del blog Uruguay's wildlife & Natural sanctuaries - Santuarios naturales & flora y fauna indígena de Uruguay (<https://uruguay1.blogspot.com/2011/04/curupi-o-lecheron-sapium-montevideo.html>)

Sobottka y col. (2014) reportaron actividad proteolítica en extractos crudos preparados a partir de látex de esta especie, los cuales mostraron una fuerte inhibición con E-64 y una acción débil a partir del uso de inhibidores de peptidasas serínicas y aspárticas, evidenciándose así un marcado predominio de proteasas con un mecanismo catalítico cisteínico.

### 1.3- APLICACIONES DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Las aplicaciones biotecnológicas de las peptidasas se distribuyen en áreas muy diversas que incluyen a sectores tradicionales como el tratamiento del cuero y la producción de detergentes (Queiroga y col., 2012), así como a la industria alimentaria y farmacéutica, entre otras.

En la industria alimentaria, el procesamiento hidrolítico de los componentes proteicos de los alimentos puede cumplir varias finalidades, como la modificación de propiedades funcionales y/o sensoriales, aumento de la digestibilidad, tiernización de carnes (Singh. y col., 2019), producción de quesos (Mazorra-Manzano y col., 2018), reducción de alergenicidad (Villadóniga, y col., 2019), obtención de alimentos funcionales (Agyei y col., 2019), etc.

Con respecto a la industria farmacéutica, han sido reportadas numerosas aplicaciones biotecnológicas de las peptidasas, que incluyen acciones dermatológicas, anti-inflamatorias, trombolíticas, etc. (Salas y col., 2018).

Otra de las aplicaciones de las enzimas proteolíticas es su utilización para catalizar reacciones de formación de enlaces peptídicos. Debido a que las proteinasas suelen presentar un alto nivel de estereo y regioespecificidad, no requieren coenzimas, son activas en condiciones suaves de reacción y pueden encontrarse disponibles comercialmente, estas enzimas se han convertido en catalizadores muy prometedores para síntesis orgánica (Kumar y Bhalla, 2005).

También en el campo de la investigación propiamente dicha las peptidasas cubren un amplio campo de acción, como por ejemplo su uso en experimentos de cultivos celulares, producción de fragmentos de Klenow, digestión de proteínas no deseadas durante la purificación de ácidos nucleicos, obtención de fragmentos de anticuerpos recombinantes para investigación, diagnóstico y terapia, eliminación de etiquetas de afinidad de proteínas de fusión en técnicas de proteínas recombinantes, secuenciación de péptidos y digestión de proteínas en proteómica (Mótyán y col., 2013).



## 1.4- PÉPTIDOS BIOACTIVOS

En los últimos años ha aumentado en gran medida el interés científico en la obtención, aislamiento y caracterización de péptidos con actividades biológicas que puedan ser utilizados como ingredientes de gran valor en la industria alimenticia, farmacéutica o cosmética. Los péptidos bioactivos (PBAs) son fragmentos proteicos específicos que tienen la capacidad de causar un impacto positivo en funciones o condiciones corporales pudiendo, en última instancia, influir sobre la salud (Korhonen y Pihlanto, 2006).

Estas secuencias peptídicas, encriptadas en la estructura primaria de proteínas que generalmente no ejercen bioactividad en su forma nativa, pueden liberarse por efecto de fermentaciones, procesos digestivos en el tracto gastrointestinal o hidrólisis enzimática *in vitro* (Hartmann y Meisel, 2007).

Aunque la combinación de agentes químicos ácidos o alcalinos con altas temperaturas puede dar como resultado un alto grado de hidrólisis proteica implicando bajos costos, estos métodos no suelen ser utilizados para la generación de PBAs debido a que pueden producir alteraciones en los aminoácidos, que afecten su bioactividad.

Por otra parte, los métodos biológicos son comúnmente preferidos tanto por la naturaleza GRAS (generalmente reconocida como segura) de los péptidos generados, como por sus ventajas a nivel medioambiental. En este sentido, la atención está centrada en la hidrólisis de proteínas de origen alimentario por proteasas libres de células ya que es posible un mayor control sobre el proceso que cuando se utiliza fermentación microbiana, con la ventaja adicional de que no quedan residuos químicos indeseados en los productos finales (Feijó Corrêa y col., 2023).

Se han reportado secuencias bioactivas que influyen en los principales sistemas del cuerpo: cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso, lo cual se traduce en un gran potencial para promover la salud humana al reducir el riesgo de enfermedades crónicas o potenciar la protección inmunológica natural (Korhonen y Pihlanto, 2006).

Las funciones fisiológicas de los PBAs son de índole muy diversa, entre las que se cuentan efectos hormonales, actividad antihipertensiva, regulación de la función inmune, acción antiviral y/o antimicrobiana, actividad trombolítica, acción antitumoral, etc. (Kang y col., 2022).

En algunos casos, una sola secuencia peptídica exhibe más de una actividad biológica, denominándose péptido multifuncional. Ejemplos de este tipo de péptidos son la lactoferricina, proveniente de la lactoferrina, que tiene propiedades anticancerígenas, antitumorales, antiparasitarias y antimicrobianas y la lunasina, procedente de la proteína de soja, con actividad antiinflamatoria, antioxidante y antihipertensiva (Agyei y col., 2019).

#### 1.4.1- Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son moléculas que tienen la capacidad de interactuar con componentes de membrana y/o citoplasmáticos de los microorganismos alterando sus funciones celulares, provocando así la muerte celular o la inhibición del metabolismo. Estas moléculas pueden ser producidas naturalmente por plantas, animales y microorganismos o ser liberadas biotecnológicamente de las proteínas en las cuales están encriptadas, provenientes de estas mismas fuentes.

Los mecanismos por los que actúan los PAMs pueden estar mediados o no por receptores. Dentro de los primeros se encuentran las bacteriocinas, cuya acción se dirige hacia un objetivo específico presente en la membrana o hacia un componente intracelular como el ADN y los ribosomas (Feijó Corrêa y col., 2023).

Las bacteriocinas son PAMs sintetizados por bacterias en los ribosomas, que inhiben el crecimiento de bacterias similares o de cepas cercanas a las que las producen. Entre las bacteriocinas más importantes se encuentran las nisinas, producidas por la bacteria Gram-positiva *Lactococcus lactis*. Las nisinas están permitidas para su aplicación en alimentos por la Food and Drug Administration (FDA) y son ampliamente utilizadas como conservantes (código E234),

principalmente para la prevención de las posibles alteraciones de los quesos (Ucar y col., 2021).

Los casos en los que el mecanismo no está mediado por receptores son los más abundantes e incluyen la mayoría de las secuencias conocidas, las cuales tienen gran diversidad en su composición, lo que está asociado al hecho de que estos péptidos tienen un objetivo inespecífico y general que son las membranas celulares (Feijó Corrêa y col., 2023).

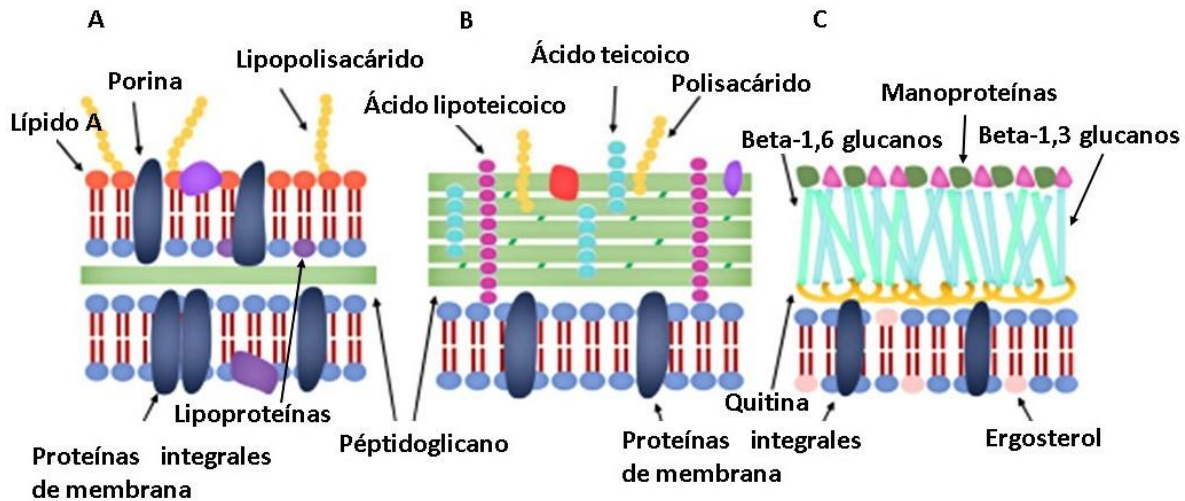
Los tamaños de los PAMs son bastante heterogéneos, estando comprendidos generalmente en el rango entre 12 y 50 aminoácidos, aunque se han reportado algunas secuencias de menos de 10 residuos aminoacídicos y otras de más de 100 (Schneider y col., 2005).

El efecto antimicrobiano de estos péptidos se basa fundamentalmente en su inserción en las bicapas lipídicas de la membrana microbiana con la consiguiente formación de poros y extravasación celular.

La hidrofobicidad del PAM está determinada por la proporción de residuos hidrofóbicos y es la responsable de su capacidad para escindir la bicapa lipídica de la membrana diana. La interacción péptido-membrana está determinada por un delicado equilibrio entre las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, siendo los PAMs moléculas de carácter anfipático (Dathe y col., 2001).

En particular, son la composición aminoacídica, anfipaticidad, y cargas eléctricas positivas a pH fisiológico, las cualidades que facilitan su inserción en la membrana de los microorganismos (Schneider y col., 2005).

La carga neta positiva de los PAMs es atraída por la carga negativa de las moléculas constituyentes de las paredes y/o membranas celulares, como los lipopolisacáridos en las bacterias Gram-negativas (figura 11 A) o los fosfolípidos y el ácido teicoico en las bacterias Gram-positivas (figura 11 B).



**Figura 11- Composición de las membranas celulares microbianas. A- Bacteria Gram negativa. B- Bacteria Gram positiva. C- Hongos.** (Adaptado de Huan y col., 2020).

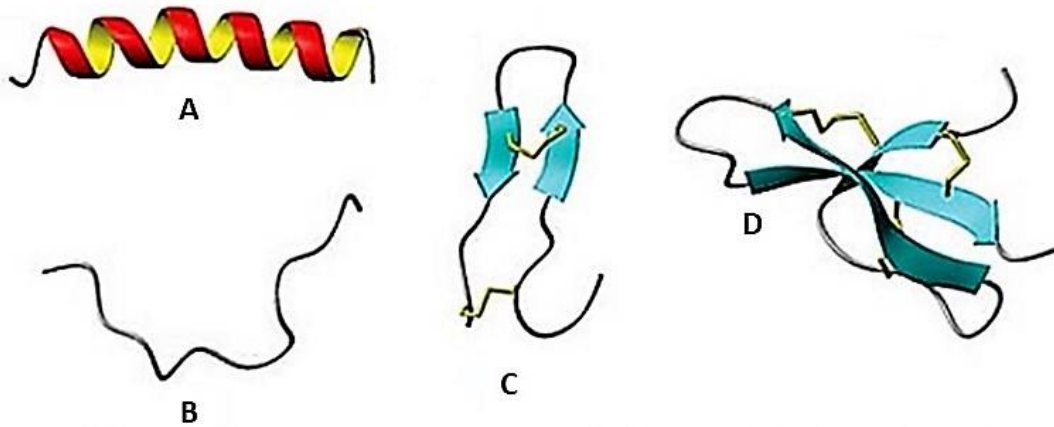
Este tipo de interacción hace que en algunos casos los PAMs exhiban adicionalmente una actividad citolítica contra células tumorales, que también presentan una carga negativa neta en la superficie, en contraposición con las células eucarióticas normales, cuya carga neta superficial se aproxima a la neutralidad debido a que la mayoría de los fosfolípidos componentes de sus membranas son zwitteriónicos (Feijó Corrêa y col., 2023).

Los PAMs también pueden interferir con la biosíntesis de componentes de las paredes celulares, como peptidoglicanos y ácido teicoico. Esta acción la ejercen uniéndose a sus lípidos precursores. En hongos (figura 11 C), algunos PAMs tienen la capacidad de inhibir la síntesis de glucanos, quitina y glicoproteínas. (Li y col., 2022).

En algunos casos los PAMs son capaces de ingresar a la célula e interactuar con diferentes organelos o moléculas, dando como resultado la interrupción de procesos tales como replicación, transcripción y/o traducción. Los modos de acción son diversos e incluyen la unión a los ácidos nucleicos destruyendo su conformación, la inhibición de enzimas como la topoisomerasa I o la ARN polimerasa, la obstrucción

de los mecanismos de reparación del ADN o la interacción con los ribosomas (Feijó Corrêa y col., 2019; Li y col.,2022).

Teniendo en cuenta su estructura secundaria, composición aminoacídica y número de enlaces disulfuro, los péptidos antimicrobianos se han dividido en cuatro grupos (figura 12). Existen también ciertos PAMs que pueden pertenecer a todos o a ninguno de estos grupos (Schneider y col., 2005; Li y col., 2022).



**Figura 12- Grupos estructurales de los PAMs.** A- Estructura de hélice  $\alpha$ . B- Estructura extendida. C- Estructura de bucle estabilizada por enlaces disulfuros intramoleculares D- Estructura de hoja  $\beta$ . En C y D los puentes disulfuro se muestran en color amarillo. (Adaptado de González García y col., 2017).

El primer grupo comprende péptidos lineales con una estructura helicoidal  $\alpha$ , que no contienen residuos de cisteína. Son los más ampliamente distribuidos y de los que más se conoce. Suelen tener un amplio espectro de acción, pocos efectos colaterales en células de mamíferos y son de gran interés a nivel industrial. Un ejemplo de este grupo es el péptido LL-37, único miembro de la familia de las catelicidinas que existe en el organismo humano.

Los péptidos antimicrobianos del segundo grupo tienen conformaciones extendidas sin estructura secundaria definida y también están libres de residuos de cisteína, pero son ricos en prolina y/o arginina, residuos de triptófano, glicina e histidina. Su actividad antimicrobiana se debe principalmente a puentes de hidrógeno o fuerzas

de Van der Waals con los lípidos de membrana. La mayoría de los PAMs de este grupo tienen blancos intracelulares. Ejemplo de este tipo de péptidos es la lactoferrina, especialmente rica en triptófano.

El tercer grupo de péptidos antimicrobianos está definido por estructuras de bucle estabilizadas por enlaces disulfuro intramoleculares o por ciclación de la cadena peptídica. Ejemplos de PAMs cíclicos son la polimixina B y las defensinas  $\theta$ .

El cuarto grupo de péptidos antimicrobianos se caracteriza por estructuras de hoja  $\beta$  antiparalelas estabilizadas por 2-4 enlaces disulfuro intramoleculares. Ejemplos de estos son las  $\alpha$  y  $\beta$  defensinas.

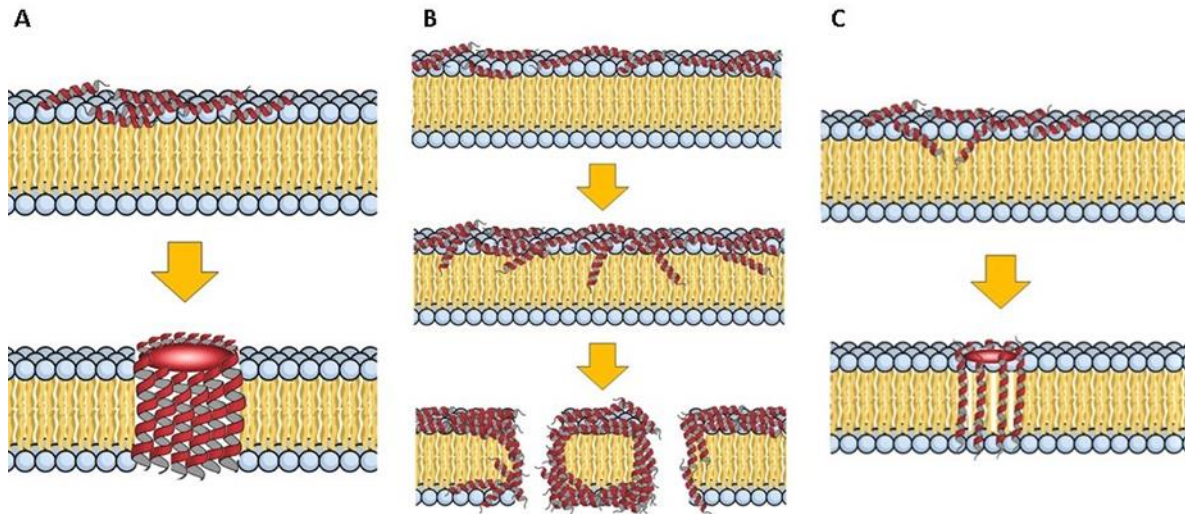
Los péptidos con estructura helicoidal  $\alpha$  presentan como principal modo de acción la formación de poros transmembrana, para lo cual se han postulado varios mecanismos, de los cuales los más aceptados por la comunidad científica son los denominados duela de barril, alfombra o carpeta y agujero de gusano (Feijó Corrêa y col., 2019; Li y col., 2022).

El mecanismo duela de barril (figura 13 A) consiste en la formación de poros transmembrana en forma de canal. Para esto, la zona hidrofóbica del PAM, que puede tener conformación de  $\alpha$ -hélice o de hoja  $\beta$ , interactúa con el interior de la membrana mientras que la región hidrófila se ubica hacia el exterior, formando así un poro acuoso. El tamaño del poro está relacionado con el número de péptidos insertados.

La primera etapa del mecanismo consiste en el posicionamiento de cierto número de péptidos en la superficie de la membrana. La agregación de estos provoca que sus regiones hidrófilas se enfrenten entre sí formando la luz del poro y facilitando energéticamente la inserción del complejo en la membrana.

El mecanismo alfombra o carpeta (figura 13 B) se trata de un proceso de permeabilización de membrana similar al modo de acción de los detergentes. A diferencia del mecanismo duela de barril, no hay inserción de los péptidos en la membrana, sino una acumulación en la superficie, formando una "alfombra". Debido a la alta densidad de péptidos se produce un número muy elevado de interacciones

electrostáticas que finalmente provocan la desestabilización de la membrana por cambios de fluidez, colapsando en varias micelas.



**Figura 13- Principales mecanismos postulados para la formación de poros transmembrana por la acción de PAMs. A- Mecanismo duela de barril. B- Mecanismo alfombra. C- Mecanismo de agujero de gusano. (Feijó Corrêa y col., 2019).**

El mecanismo de agujero de gusano, también llamado de poro toroidal (figura 13 C), tiene la particularidad de que los PAMs están intercalados en el poro con lípidos de membrana. Al igual que en los mecanismos duela de barril y alfombra, inicialmente los péptidos se acumulan en la superficie de la membrana. Sin embargo, en este caso los residuos de aminoácidos hidrofóbicos comienzan a desplazar las cabezas polares de los lípidos, provocando una tensión que conduce a la desestabilización de la superficie de la membrana con la consiguiente extravasación del contenido celular.

El ensamblado conjunto de PAMs y LPS tiene el efecto adicional de lograr una floculación de estos últimos suprimiendo su diseminación sistémica y, por ende, la respuesta inmune descontrolada que puede derivar en un shock séptico. De manera análoga, algunos PAMs causan agregación bacteriana, habiéndose reportado que

de esta manera desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de patógenos potencialmente peligrosos en un estado comensal (Malekkhaiat Häffner y Malmsten, 2018).

La relación péptido-lípido es un factor que influye en gran medida en la acción antimicrobiana. Cuando la relación péptido-lípido es baja, los PAMs son paralelos a la superficie de la membrana plasmática, pero a medida que dicha relación aumenta, los PAMs comienzan a insertarse en el centro hidrofóbico de esta (Li y col., 2022). Llegado cierto límite en la relación péptido-lípido, el efecto sobre la capacidad antimicrobiana se invierte, ya que si la interacción entre el péptido y la cabeza polar de los fosfolípidos se hace muy fuerte se dificultarán las posteriores interacciones con el interior de la célula.

Además de los efectos bactericidas directos, los PAMs pueden ejercer acciones indirectas al inhibir la formación de biofilms o actuar sobre el sistema inmunológico regulando respuestas proinflamatorias y antiinflamatorias, quimiotaxis, etc. (Li y col., 2022).

Aproximadamente el 15 % de los PAMs tienen también propiedades antivirales. Esta acción la pueden ejercer alterando la bicapa lipídica de la envoltura viral e impidiendo la infección de las células huésped. Otros mecanismos incluyen el bloqueo de la interacción con los receptores de la superficie celular, la inhibición de la expresión génica, inmunomodulación, etc. (Huan y col., 2020; Li y col., 2022).

Debido a la problemática creciente de la adquisición de resistencia microbiana a los antibióticos convencionales, en los últimos años los PAMs se han considerado como agentes terapéuticos alternativos. También es posible diseñar estrategias terapéuticas que combinen antibióticos tradicionales con PAMs, ya que se han evidenciado efectos sinérgicos entre estos (Li y col., 2022).

Adicionalmente, la bioactividad antimicrobiana ejercida por moléculas derivadas de proteínas alimentarias tiene aplicaciones prometedoras en las industrias agropecuaria y alimentaria. Esto se debe a su alta eficacia contra microorganismos patógenos y contaminantes sin los peligros asociados con los residuos de



antibióticos de uso animal. Esto, sumado a una creciente preocupación de los consumidores por el uso indiscriminado de compuestos químicos sintéticos, hace que exista un fuerte interés por encontrar alternativas seguras y efectivas para reemplazarlos, como en el caso de los antibióticos promotores del crecimiento para pollos de engorde (Mohammadrezaei y col., 2021), conservantes de alimentos (Singh y col., 2023), etc.

#### 1.4.2- Péptidos antioxidantes

Los péptidos antioxidantes (PAOs) tienen la capacidad de minimizar el daño que los radicales libres provocan en los organismos.

Los radicales libres son especies químicas de tipo atómico o molecular que contienen uno o más electrones desapareados en su orbital más externo y que son capaces de tener existencia independiente, estando siempre en forma inestable, lo que les confiere un gran poder como reactivo. Ejemplos de estos son las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés reactive oxygen species) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS, del inglés reactive nitrogen species) (Sen y col., 2010).

Las ROS incluyen especies como los radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), peróxido ( $RO_2^{\cdot}$ ), hidroperóxido ( $HO_2^{\cdot}$ ), alcoxilo ( $RO^{\cdot}$ ), etc. y son producidos principalmente por la cadena respiratoria mitocondrial.

Estos compuestos tienen la capacidad de dañar a diversas moléculas biológicas como proteínas, ADN, lípidos de membrana, etc. La acción de los radicales libres sobre las proteínas trae como consecuencia oxidación de aminoácidos, asociación de fragmentos proteicos a través de entrecruzamientos por puentes disulfuro, ruptura de enlaces peptídicos, pérdida de afinidad por metales y un aumento en la hidrofobicidad. Como resultante, las proteínas pierden sus funciones biológicas y se hacen más susceptibles a la degradación proteolítica (López-García y col., 2023).

La donación de electrones de los radicales libres a los ácidos grasos poliinsaturados conduce a la lipoperoxidación y formación de varios productos de descomposición. En consecuencia, se generan cambios en la estructura molecular de la membrana

celular y pérdida de permeabilidad debido a la formación de enlaces disulfuro entre proteínas de membrana. La inestabilidad resultante conduce a la muerte celular.

Los radicales libres son también capaces de atacar el ADN dañando diversos genes, afectando así la expresión de muchas proteínas y, por ende, las funciones de la célula. Se ha reportado que el radical hidroxilo es capaz de provocar modificaciones en la desoxirribosa que derivan en la liberación de bases nitrogenadas, la ruptura de una o ambas cadenas, etc. Las ROS pueden inducir errores en los procesos de transcripción y traducción (López-García y col., 2023).

El organismo tiene sistemas de defensa que le permiten depurar estas sustancias nocivas, ya sea mediante la utilización de enzimas como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa o por la acción de compuestos no enzimáticos. Estos últimos pueden ser moléculas peptídicas (ej., melatonina, glutatión y carnosina), vitaminas (tocoferol y ácido ascórbico), aminoácidos, etc. (Wen y col., 2020).

Si la acumulación de ROS excede la capacidad del sistema celular de depuración de estos radicales libres, se produce una alteración de la homeostasis redox. Este desequilibrio, denominado estrés oxidativo, está involucrado en el desarrollo de muchas enfermedades crónicas, como el cáncer, aterosclerosis y diabetes (Zhu y col., 2022).

Con el aumento de la edad el sistema antioxidante natural se vuelve menos eficiente y disminuye la capacidad de absorción de nutrientes, entre los que se encuentran las sustancias antioxidantes exógenas. Debido a esto, con el envejecimiento se incrementa el riesgo de estrés oxidativo.

Esta situación puede verse agravada por numerosos factores exógenos que favorecen la formación de radicales libres, como la exposición a rayos X, el tabaquismo, la contaminación del aire, ciertos productos industriales; algunos medicamentos y hábitos alimenticios inadecuados; ejemplos de esto último es el consumo de alimentos con alto contenido de grasa, productos que contienen muchos aditivos, bebidas con alto contenido de azúcar, etc. (López-García y col., 2023).

Actualmente, se considera de gran importancia llevar una dieta rica en alimentos con alto contenido de antioxidantes para ayudar a contrarrestar los efectos del estrés oxidativo y fortalecer el sistema inmunológico. El mercado de los suplementos dietéticos es cada vez mayor incluyendo antioxidantes como las vitaminas E y C, así como compuestos menos tradicionales derivados de plantas (fitoquímicos) como el licopeno, la luteína y los isoflavonoides (Xiong, Y.L., 2010).

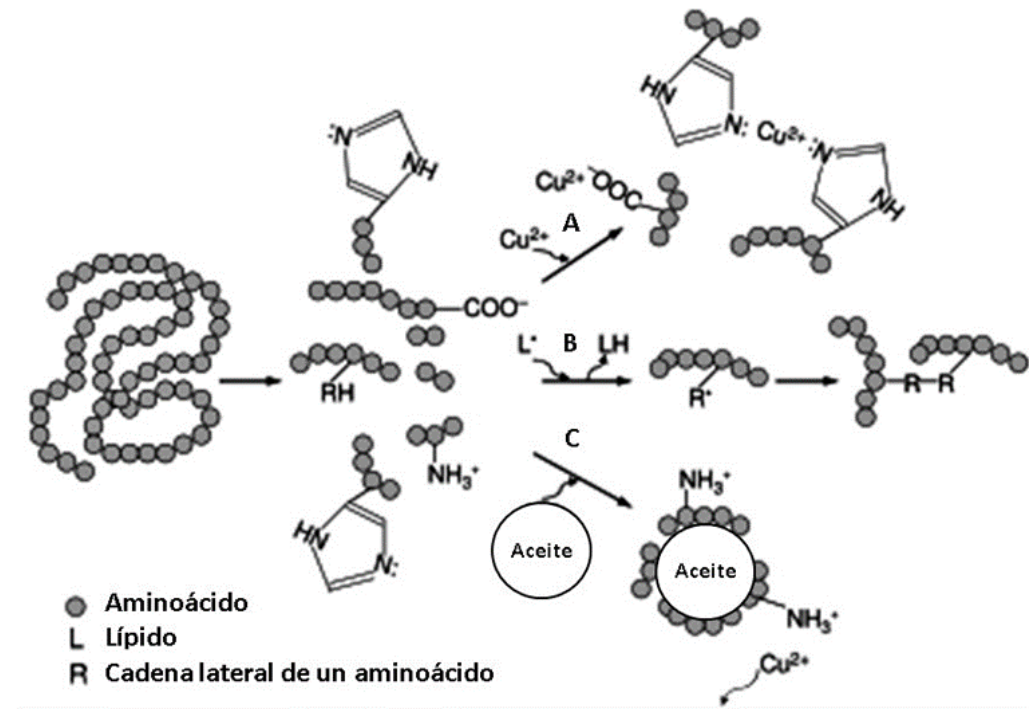
Algunas proteínas poseen actividad antioxidante, pero su eficacia es relativamente baja debido a que en general las regiones reactivas están ocluidas dentro de la estructura nativa, quedando inaccesible para las ROS. Debido a esto, es de gran interés la puesta a punto de procesos hidrolíticos capaces de liberar los péptidos antioxidantes encriptados.

Los PAOs están constituidos por secuencias de entre 2 y 20 residuos aminoacídicos, siendo los de mayor bioactividad los que tienen entre 5 y 9 aminoácidos, con pesos moleculares en el rango entre 500 y 1800 Da (Habinshuti y col., 2023).

Debido al pequeño tamaño que suelen tener estas moléculas, no poseen una estructura de orden superior a la secuencia peptídica o estructura primaria, teniendo efecto predominante en la actividad antioxidante la naturaleza y posición de ciertos aminoácidos constituyentes del péptido (Xiong, Y.L., 2010).

La figura 14 ilustra de manera esquemática los diferentes mecanismos de acción de los PAOs. Predominantemente, estos mecanismos involucran la captación de radicales, la donación de protones y la quelación de iones metálicos, aunque también pueden actuar conformando un blindaje físico.

Los PAOs más reactivos contienen residuos aromáticos (triptófano, tirosina, histidina y fenilalanina) y aminoácidos que contienen azufre, como la metionina y la cisteína. Los derivados de fuentes alimenticias a menudo incluyen residuos hidrófobos como valina o leucina en el extremo amino terminal, así como prolina, histidina, triptófano, tirosina, metionina y cisteína en sus secuencias (Samaranayaka y col., 2011).



**Figura 14- Esquema de los mecanismos de acción antioxidante de los PAOs. A- Quelación de metales. B- Captación de radicales libres. C- Bloqueo físico protector y repulsión. (Adaptado de Xiong, Y.L., 2010).**

Los residuos aminoacídicos hidrofóbicos facilitan la solubilidad de los péptidos en fases lipídicas y las interacciones con los radicales libres, mejorando así la capacidad de inhibir la peroxidación. Por ejemplo, el hidroxilo fenólico de la tirosina y el grupo indol del triptófano pueden actuar directamente para capturar radicales libres (Wen y col., 2020).

Los péptidos estabilizan los radicales donando electrones y manteniendo su propia estabilidad a través de la resonancia de su estructura (López-García y col., 2023). En un ambiente oxidante, los PAOs son más propensos a donar electrones que los lípidos insaturados que también puedan estar presentes, teniendo además mayor capacidad de formar radicales estables o polímeros no reactivos (Xiong, Y.L., 2010).

Metales como el hierro y el cobre tienen la potencialidad de producir especies reactivas de oxígeno actuando como iniciadores de reacción y son capaces de catalizar la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) favoreciendo la aterogénesis (Burkitt, 2001). Los grupos carboxilo y amino de las cadenas laterales de los aminoácidos tienen una función quelante de los iones metálicos debido a su capacidad para disociarse y ser donantes de protones (López-García y col., 2023).

La histidina, además de poder eliminar radicales hidroxilo e inhibir la peroxidación de lípidos, posee una gran capacidad para quelar iones metálicos debido a la influencia de su grupo imidazol. Los aminoácidos triptófano, tirosina y fenilalanina también tienen capacidad de quelación de iones metálicos (Wen y col., 2020).

En cuanto al aporte de los aminoácidos azufrados, el grupo tiol de la cadena lateral de la cisteína puede proporcionar átomos de hidrógeno pudiendo así eliminar radicales libres, mientras que el átomo de azufre de la metionina puede ser oxidado a sulfóxido por el suministro de electrones. Por último, los aminoácidos ácidos y básicos también tienen un importante rol en la capacidad antioxidante de los péptidos, ya que pueden actuar como quelantes debido a la capacidad de sus grupos cargados para formar complejos con iones metálicos. (Wen y col., 2020).

Los PAOs también pueden exhibir un modo de acción que involucra una protección por bloqueo físico. Debido a sus propiedades tensoactivas, en los sistemas de emulsión los péptidos podrían inhibir la peroxidación de los lípidos formando una barrera en la interfase aceite - agua alrededor de las gotas de lípidos, evitando así el contacto de estos con los agentes oxidantes (Xiong, Y.L., 2010).

Si bien los antioxidantes sintéticos como butil hidroxil tolueno (BHT), butil hidroxianisol (BHA), t-butil hidroquinona (TBHQ), galato de propilo, etc., tienen la capacidad de controlar eficazmente la oxidación de los nutrientes de los alimentos y pueden reducir el riesgo de enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo, tienen las desventajas de sus altos costos y de riesgo potencial de toxicidad (Wen y col., 2020). Por este motivo, en las últimas décadas ha aumentado en gran medida el interés por la identificación y aplicación de péptidos antioxidantes en la prevención y tratamiento de varias patologías.

## **1.5- PROTEÍNAS DE ORIGEN LÁCTEO COMO FUENTES DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS**

El hecho de que ciertos componentes de los alimentos tengan la potencialidad de disminuir el riesgo de desarrollar enfermedades o evitar el agravamiento de condiciones patológicas ya establecidas ha tenido como consecuencia una tendencia creciente a la utilización de alimentos funcionales y nutracéuticos como alternativa o complemento a la medicación tradicional (Korhonen y Pihlanto, 2006).

Frente a los fármacos tradicionales, los péptidos bioactivos derivados de alimentos tienen las ventajas de presentar una alta actividad biológica con bajos niveles de toxicidad y fácil metabolismo en el cuerpo humano, careciendo de efectos secundarios. (Kang y col., 2022).

En la actualidad, el interés en la búsqueda de nuevos péptidos bioactivos está enfocado principalmente a los derivados de proteínas lácteas. Esto está motivado por el hecho de que la leche bovina es una fuente de proteínas de alto valor biológico, que se caracterizan por tener un perfil equilibrado de sus aminoácidos constitutivos y excelente digestibilidad. Los péptidos derivados de estas proteínas tienen muy buena solubilidad y son de fácil absorción (Szwajkowska y col., 2011; Kang y col., 2022).

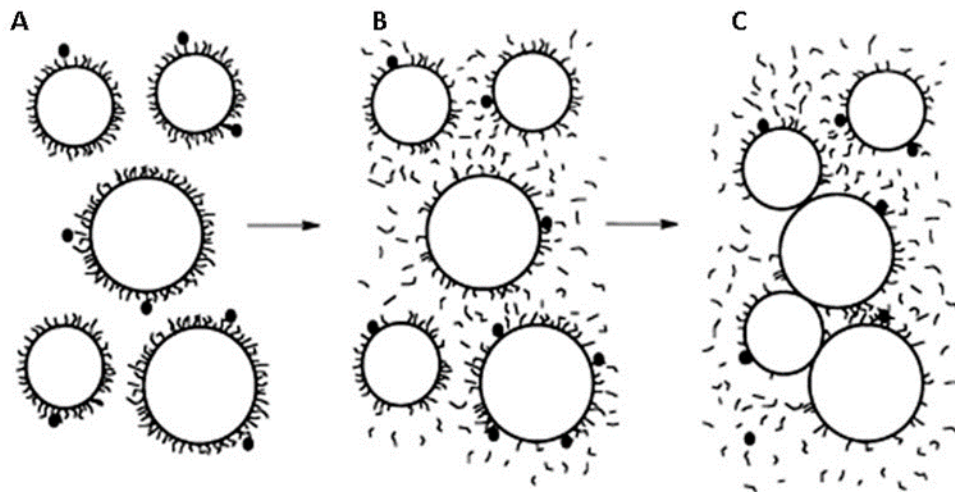
### **1.5.1- Lactosuero**

El lactosuero es un coproducto líquido obtenido después de la precipitación de la caseína durante la elaboración del queso, manteca o producción de caseinato. Se estima que por cada kg de queso se producen 9 kg de lactosuero, representando esto entre el 85 y 90% del volumen de la leche y conteniendo aproximadamente el 55% de sus nutrientes (Parra Huertas, 2009).

La coagulación enzimática de la caseína de la leche es un evento fundamental en el proceso de elaboración de quesos. Las micelas de caseína bovina son partículas esféricas compuestas por las caseínas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ , además de fosfato de calcio coloidal. La  $\kappa$ -caseína tiene una posición superficial en la micela y expone hacia el

solvente su región C-terminal hidrofílica denominada glicomacropéptido (segmento 106-169), La región N-terminal (segmento 1-105), denominada  $\kappa$ -paracaseína, es hidrofóbica y permanece asociada a la micela al clivarse el enlace peptídico fenilalanina105-metionina106.

El proceso de coagulación, esquematizado en la figura 15, comienza con la ruptura de este enlace peptídico de la  $\kappa$ -caseína. Luego de la escisión, el glicomacropéptido difunde hacia el lactosuero, lo que provoca la desestabilización de las micelas de caseína, dando lugar a una agregación cooperativa debido al carácter hidrofóbico de las mismas, formándose una matriz proteica tridimensional (Dagleish, 1993).



**Figura 15- Esquema de la coagulación enzimática de la caseína.** Los círculos blancos con las pequeñas líneas en su periferia representan las micelas de caseína con el glicomacropéptido en contacto con el solvente. Los pequeños círculos negros representan las enzimas proteolíticas, posicionadas en sus sitios de corte. **A-** Micelas de caseína intactas y moléculas de peptidasa que fueron recientemente agregadas **B-**Comienzo de la proteólisis con liberación del glicomacropéptido. Aunque parte de él ya está en solución, aún queda suficiente en la superficie de las micelas para evitar su agregación. **C-** La mayor parte de la  $\kappa$ -caseína fue hidrolizada, comenzando la agregación de las micelas por interacciones hidrofóbicas. (Dagleish, 1993).

Dependiendo de las técnicas empleadas para el procesamiento de la leche durante la obtención de los quesos, varía el tipo y composición del lactosuero obtenido. En

los casos en que el proceso se basa en la coagulación enzimática de la caseína por acción del cuajo, es decir, una preparación industrial que contiene quimosina u otras enzimas de acción similar, el lactosuero producido tiene un pH de aproximadamente 6.5 y se denomina suero dulce. Si, en cambio, en el proceso se utiliza fermentación láctica o adición de ácidos orgánicos o minerales para coagular la caseína, se obtiene un lactosuero de pH de aproximadamente 4.5, denominado suero ácido.

Los principales componentes de los sueros tanto dulces como ácidos son la lactosa, proteínas, lípidos y minerales, constituyendo estos aproximadamente el 70-72%, 8-10%, 8 % y 12–15% del total de sólidos, respectivamente (Panesar y col., 2007). El potasio es el elemento más abundante del lactosuero, seguido por el calcio, fósforo, sodio y magnesio (Motta-Correa y Mosquera, 2015).

Una de las diferencias principales entre la composición de los sueros ácido y dulce radica en la composición de minerales. Por ejemplo, un pH bajo favorece la solubilización del calcio coloidal contenido en las micelas de caseína, lo que hace que se distribuya más fácilmente en el suero. Las concentraciones de este mineral en suero dulce y ácido son de 0.4-0.6 y 1.2-1.6 g/L, respectivamente (Panesar y col., 2007).

Los lactosueros contienen además vitaminas del grupo B (tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico y cobalamina) y ácido ascórbico. El ácido pantoténico y el ácido ascórbico son las vitaminas más abundantes, con concentraciones de 3,4 y 2,2 mg/ml respectivamente (Motta-Correa y Mosquera, 2015).

Las proteínas presentes en el lactosuero bovino representan alrededor del 20 % de las proteínas totales de la leche. Entre estas, las más abundantes son la  $\beta$ -lactoglobulina (BLG) y la  $\alpha$ -lactalbúmina (ALA), que representan el 10 % y el 4 % del total de proteínas lácteas respectivamente. En menores concentraciones se encuentran otros componentes proteicos o peptídicos como la seroalbúmina bovina (BSA), lactoferrina, inmunoglobulinas, lactoperoxidasa y glicomacropéptido (Baró y col., 2001, Hinrichs y col., 2004). Este último componente constituye



aproximadamente el 20% de la fracción peptídica del suero de leche dulce, pero no está presente en sueros ácidos.

Las proteínas de lactosuero tienen un alto valor nutricional debido principalmente a su buena digestibilidad y alto contenido de aminoácidos esenciales. Entre ellos, tienen especial importancia los que contienen azufre. La leucina, isoleucina y valina cumplen roles fundamentales en el metabolismo y la hemostasis de la glucosa en sangre en el cuerpo humano (Soltani y col., 2017). La leucina, además, se ha identificado como una molécula clave para el inicio de la síntesis de proteínas musculares, ya que participa en la fosforilación reversible de proteínas que controlan la unión del ARNm a la subunidad ribosomal 40S (Ha y Zemel, 2003).

Debido al crecimiento continuo de la industria láctea y la producción anual de grandes volúmenes de suero, el aprovechamiento actual de este coproducto es insuficiente. En caso de no gestionarse adecuadamente, este excedente representa un alto riesgo para el medio ambiente, ya que se trata de un efluente orgánico con alto poder contaminante. La demanda química de oxígeno (DQO) del lactosuero puede variar entre 50 a 80 g/L, mientras que la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) está en el rango de 40 a 60 g/L (Zandona et al., 2021).

Este hecho, sumado al excelente potencial de sus proteínas, tanto desde el punto de vista de la calidad nutricional como de la capacidad de generar péptidos bioactivos, hace que sea relevante buscar formas alternativas de uso que generen productos con alto valor agregado.

Se han reportado péptidos derivados de lactosuero por hidrólisis enzimática, con diferentes bioactividades: antioxidantes, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, antimicrobianos, antitumorales, etc. (Dullius y col., 2018).

## 2- OBJETIVOS

El presente trabajo se planteó los siguientes objetivos generales y específicos:

### **2-1-OBJETIVO GENERAL:**

- Contribuir al conocimiento de la actividad proteolítica del látex de especies de la flora nativa y utilizar su potencial para la generación de péptidos bioactivos.

### **2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Preparación de extractos crudos a partir de látex de *Ficus luschnathiana* (Miq.) Miq. y de *Araujia sericifera* var. hortorum (E. Fourn.).
- Caracterización bioquímica de la actividad proteolítica de los extractos crudos y obtención de datos moleculares de los componentes proteicos del extracto crudo de *Ficus luschnathiana*.
- Obtención de hidrolizados por acción de los extractos crudos sobre proteínas de lactosuero.
- Evaluación de actividades antimicrobianas o antioxidantes en diferentes fracciones de los hidrolizados.
- Caracterización molecular de los péptidos componentes de las fracciones antioxidantes.

## **3- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1- MATERIALES**

Todos los reactivos utilizados se adquirieron a Sigma-Aldrich.

El látex de *Sapium glandulosum* (L.) Morong y de *Ficus luschnathiana* (Miq.) Miq. se recolectó de árboles pertenecientes al Jardín Botánico Atilio Lombardo (Montevideo, Uruguay). El ejemplar de *F. luschnathiana* figura en el herbario de dicho Museo con el número MVJB 28429.

El látex de *Araujia sericifera* var. hortorum (E. Fourn.) fue recolectado de plantas con frutos maduros en Montevideo, Uruguay. Estos ejemplares fueron registrados en Facultad de Química con el código de herbario MVFQ N° 4436.

El lactosuero (LS) proveniente de la producción de Mozzarella (LSM) y la leche descremada utilizada para la preparación del lactosuero de caseinería (LSC) y para la determinación de la capacidad de coagulación de la leche provinieron de la industria nacional CONAPROLE.

### **3.2- MÉTODOS**

#### **3.2.1- Preparación del lactosuero de caseinería**

El LSC se preparó acidificando leche descremada hasta pH 4.5, por agregado de ácido clorhídrico (HCl) 2 M. Posteriormente se removió la caseína precipitada, por centrifugación a 7012 g durante 20 minutos y 4 ° C. El sobrenadante se alicuotó y se mantuvo a -20 °C hasta su uso.

#### **3.2.2- Obtención de los extractos crudos**

- ❖ El látex del *Ficus luschnathiana* y de *Sapium glandulosum* se recogió por incisiones en las ramas y se volcó en buffer fosfato de sodio 0.2 M pH 7.5.
- ❖ El látex de *Araujia sericifera* se recogió a partir de la herida generada al separar los frutos de la planta y se volcó en buffer fosfato de sodio 0.2 M pH

7.5 suplementado con EDTA 5.0 mM. También se recolectó látex en buffer fosfato de sodio 0.2 M pH 6.0 y en buffer borato de sodio 0.2 M pH 9.0 (ambos suplementados con EDTA 5.0 mM) para realizar estudios de estabilidad y determinar las condiciones de hidrólisis más adecuadas.

Las suspensiones obtenidas en todos los casos se centrifugaron a 15493 g durante 1 h, a 10 °C, con la finalidad de descartar mucílago y otros materiales insolubles. Los sobrenadantes se centrifugaron nuevamente a 15493 x g durante 30 min a 10 °C y luego se filtraron con papel filtro nº 41. Los extractos crudos (EC) obtenidos a partir de látex de *Ficus luschnathiana* (EC<sub>(Ficus)</sub>) y de *Araujia sericífera* (EC<sub>(Araujia)</sub>) se almacenaron a 7 y -20 °C respectivamente, hasta su uso.

### 3.2.3- Determinación de concentraciones de proteínas y péptidos

- ❖ La concentración proteica se determinó utilizando el método de Lowry o Biuret (Layne, 1957) utilizando seroalbúmina bovina como estándar, en el rango de concentraciones 0.1- 0.6 y 1.0-6.0 mg/mL respectivamente.
- ❖ Durante los pasos de purificaciones cromatográficas, la concentración de proteína de cada fracción se estimó midiendo la absorbancia a 280 nm ( $A_{280}$ ). Cuando se trabajó con *Ficus luschnathiana*, a las fracciones cromatográficas con actividad proteolítica se les cuantificó la concentración proteica por el método de Lowry.
- ❖ Las concentraciones peptídicas se determinaron usando o-ftalaldehído como describen Church y col. (1983). Se realizó una curva de calibración utilizando valina como estándar, en el rango de concentración de 50.0-400.0 µg/mL.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### 3.2.4- Determinación de la actividad proteolítica

- ❖ La cuantificación de la actividad proteolítica se realizó mediante el método modificado de Andrews-Asenjo (1986), utilizando azocaseína como sustrato. 0.34 mL de buffer fosfato de sodio 0.2 M pH 7.5 y 0.34 mL de solución de

azocaseína 1.0% (m/v) en agua destilada se incubaron a 37 °C durante 5 min. A continuación, se agregó 0,34 mL de EC y se incubó a 37 °C hasta el tiempo final del ensayo. La detención de la reacción se realizó por agregado de 0.34 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10 % (m/v). Se incubó 10 min más a 37 °C y se centrifugó durante 30 min a 11627 g. La absorbancia de los azopéptidos liberados se midió en el sobrenadante a 337 nm. El tiempo de ensayo se determinó realizando la reacción enzimática durante diferentes intervalos de tiempo en el rango de 5-20 min.

- ❖ Para el EC<sub>(Araujia)</sub> se evaluó el efecto de agentes reductores en la actividad enzimática. El efecto del β-mercaptoetanol sobre la actividad proteolítica se evaluó incubando el EC con β-mercaptoetanol 20.0 mM (concentración final en la mezcla reactiva) durante 30 minutos a 25 °C. Luego se realizó el ensayo de actividad como se describió anteriormente y se comparó el resultado con el correspondiente a la actividad del EC sin pre tratamiento con el agente reductor. Para determinar la concentración óptima de cisteína en el ensayo, se suplementó el buffer de actividad con concentraciones de este reductor de 0.0, 3.0, 6.0, 9.0, 12.0 y 15.0 mM, que correspondieron a concentraciones finales de 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mM, respectivamente, en la mezcla de reacción. A partir de estos estudios, los ensayos de actividad del EC<sub>(Araujia)</sub> se realizaron en presencia de la concentración óptima de cisteína determinada.

La unidad enzimática (UE) se definió como la cantidad de enzima que se requiere para aumentar una unidad por minuto la  $A_{337}$  en las condiciones del ensayo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### **3.2.5- Determinación de la capacidad de coagulación de la leche**

La evaluación de la capacidad de coagulación de la caseína se llevó a cabo según el método reportado por Castro y Cantera (1995). En un tubo de vidrio se incubaron 3.0 mL de leche descremada a 30 °C durante 10 min. A continuación, se agregaron 2.0 mL de buffer acetato de sodio 1.0 M pH 5.0 suplementado con cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) 40 mM, previamente termostatzado a 30 °C. Por último, se agregó 1.0 mL

de una dilución adecuada de preparado enzimático:  $EC_{(Ficus)}$ ,  $EC_{(Araujia)}$ , solución de tripsina bovina en buffer fosfato de sodio 0.2 M pH 7.5 o quimosina comercial (Ha-La; Brasil). Con el tubo tapado y rotándolo en posición horizontal mientras se mantuvo sumergido en el baño a 30 °C, se midió el tiempo en que se visualizó el primer indicio de coagulación.

La unidad de coagulación de la leche (UCL) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para formar en un minuto el primer coágulo detectable visualmente, bajo las condiciones experimentales. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### 3.2.6- Parado térmico y efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la actividad proteolítica

- ❖ Para evaluar el tiempo necesario para inactivar la actividad proteolítica mediante tratamiento térmico (parado térmico), los ECs se incubaron en un baño de agua a ebullición durante 1 y 5 min.
- ❖ Los estudios de estabilidad térmica se realizaron preincubando los ECs a diferentes temperaturas, tomando alícuotas a intervalos de tiempo específicos y determinando la actividad proteolítica como se describe en 3.2.4. Las temperaturas ensayadas para el  $EC_{(Ficus)}$  fueron -20, 7, 22, 37, 50 y 60 °C, mientras que para el  $EC_{(Araujia)}$  fueron -20, 7, 37 y 50 °C. Para calcular el porcentaje de actividad remanente (AR), se utilizó la ecuación:

$$AR (\%) = 100 (A_f / A_i)$$

donde  $A_i$  y  $A_f$  son la actividad antes y después de la incubación a las temperaturas correspondientes, respectivamente.

### 3.2.7- Efecto del pH sobre la estabilidad de la actividad proteolítica

Se prepararon ECs a diferentes valores de pH (5.2, 6.5, 7.5 y 9.9) y se incubaron en baño de agua a 60 ° C. Los pH 5.2 y 6.5 se obtuvieron por agregado al extracto crudo de ácido acético glacial y el pH 9.9 por agregado de hidróxido de sodio (NaOH) 2.0 M. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de incubación y se les

determinó la actividad proteolítica a pH 7.5, como en 3.2.4. Para calcular el porcentaje de actividad remanente (AR), se utilizó la ecuación expresada en 3.2.6, siendo  $A_i$  y  $A_f$  la actividad antes y después de la incubación a los pH correspondientes, respectivamente.

### 3.2.8- Efecto del pH y la temperatura en la actividad proteolítica de los extractos

Para evaluar el efecto del pH de reacción en la actividad proteolítica, el ensayo de actividad descrito en 3.2.4 se realizó a diferentes valores de pH: 5.2, 6.0, 6.4, 6.7, 7.1, 7.6, 7.9, 8.8 y 9.2, manteniendo una temperatura de 37 °C. Se utilizaron las siguientes soluciones tampón: buffer acetato de sodio 0.5 M (pH 5.0 y 5.5), buffer fosfato de sodio 0.5 M (pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0) y buffer tris(hidroximetil)aminometano- HCl (Tris-HCl) 0.5 M (pH 8.5 y 9.0). Para determinar el efecto de la temperatura se ensayó la actividad proteolítica a 8, 24, 30, 37, 50, 60, 70, 75, 80, 85 y 90 °C, manteniendo en todos los casos el pH = 7.5.

### 3.2.9- Efecto de inhibidores en la actividad proteolítica

El EC<sub>(Ficus)</sub> se incubó durante 1 h a 25 °C con cada una de las soluciones de inhibidores de proteasas a ser ensayadas y se determinó la actividad proteolítica como en 3.2.4, al principio y al final de la incubación. Los inhibidores utilizados y sus concentraciones finales en la mezcla fueron: E-64 (5.0 y 10.0 µM), pepstatina A (1.0 µM), PMSF (0.5 y 1.0 mM), iodoacetamida (100.0 µM) y EDTA (5.0 y 10.0 mM). Se trabajó a pH 7.5, excepto cuando se utilizó pepstatina A. En este caso el pH del EC fue ajustado a 6.0 con ácido acético glacial. Para calcular el porcentaje de actividad remanente (AR), se utilizó la ecuación expresada en 3.2.6, siendo  $A_i$  y  $A_f$  la actividad antes y después de la incubación con los inhibidores, respectivamente.

### 3.2.10- Cromatografías de exclusión molecular

- ❖ Para separar los componentes del EC<sub>(Ficus)</sub> se utilizó una columna empaquetada con Sephadex G-75 (10.0 x 1.5 cm) y equilibrada con buffer

fosfato de sodio 50.0 mM pH 6.4. Se aplicó a la columna 0.3 mL de muestra y la elución se llevó a cabo a presión atmosférica con el mismo buffer utilizado para equilibrarla, recogiéndose fracciones de 1.5 mL. A cada fracción se le midió  $A_{280}$  y se determinó la actividad proteolítica según el método descrito en 3.2.4.

- ❖ Para estudiar los estados oligoméricos dependientes del pH, de las proteínas del EC, se realizó una separación preliminar con Sephadex G-75 como se detalla en el punto anterior, pero equilibrando la columna con buffer acetato de sodio 50.0 mM pH 5.5, o buffer Tris-HCl 50.0 mM pH 8.4. Para cada corrida a diferente pH, las fracciones con mayor actividad proteolítica se mezclaron formando un pool, que se liofilizó y luego disolvió en 0.30 mL de agua destilada. Las muestras así obtenidas se aplicaron en una columna HiLoad 16/600 Superdex 200 grado preparativo (GE Healthcare) con rango de fraccionamiento 10-600 kDa, equilibrada respectivamente con buffer acetato de sodio 50 mM pH 5.5 o con buffer Tris-HCl 50 mM pH 8.4. Se utilizó un flujo de  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$  y se recogieron fracciones de 1.5 mL. La columna fue calibrada con estándares de diferentes pesos moleculares (PM): tiroglobulina (670 kDa), aldolasa (158 kDa), albúmina bovina (67 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), quimotripsinógeno A (25 kDa), mioglobina (17 kDa) y ribonucleasa A (13.7 kDa).

### 3.2.11- Intercambio iónico del EC<sub>(Ficus)</sub>

Se realizó un intercambio aniónico en batch, con dietilaminoetil (DEAE) Sephadex A-50 equilibrado en buffer fosfato 50.0 mM pH 6.4. Se mezclaron 5.0 mL de intercambiador con 10.0 mL de EC<sub>(Ficus)</sub>. La elución se realizó en columna utilizando un gradiente de fuerza iónica escalonado, con buffer fosfato 50.0 mM pH 6.4 suplementado con cloruro de sodio (NaCl) 0.2, 0.3, 0.4 y 1.0 M. Se recogieron fracciones de 1.5 mL, cambiando la concentración de NaCl cada 15 fracciones. Las fracciones de mayor actividad de cada pico se mezclaron formando pools que se desalaron empleando columnas PD-10 (Sephadex G-25). Los pools desalados se



lioofilizaron y disolvieron en 0.25 mL de agua destilada, obteniendo las muestras denominadas pool 1, pool 2, pool 3 y pool 4 respectivamente.

### 3.2.12- Determinación de puntos isoeléctricos

Fueron determinados por enfocado isoeléctrico usando un equipo Phast System (Farmacia, Uppsala, Suecia) IEF 3-9. Los geles fueron revelados por tinción con plata, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### 3.2.13- Hidrólisis de las proteínas del lactosuero

Se emplearon LSC y LSM a los que previamente se normalizó la concentración proteica a 6.0 mg/mL por adición de agua destilada. Los LSs fueron hidrolizados con EC (*Ficus*) y con EC (*Araujia*). Para este último caso el LS se suplementó con cisteína hasta una concentración final de 4.0 mM. Las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo a diferentes pH y relaciones enzima/sustrato (E/S), manteniendo la temperatura constante a 50 °C. Las condiciones utilizadas para los hidrolizados con EC (*Ficus*) fueron E/S de 0.01 y 0.02 UE mg<sup>-1</sup> y pH 6.0, 7.2 y 9.0. Para los hidrolizados con EC (*Araujia*) se usaron E/S de 0.1, 0.2 y 0.3 UE mg<sup>-1</sup> y pH 6.0, 7.5 y 9.0. Los valores de pH se obtuvieron en todos los casos por agregado de NaOH 2.0 M al lactosuero. Se tomaron alícuotas de hidrolizado a diferentes tiempos entre 0 y 120 min, se colocaron en un baño de agua a ebullición durante 5 min para detener la reacción y luego se centrifugaron a 7155 g durante 20 min a 10 °C, descartando el material insoluble. En el caso de la alícuota a tiempo cero se inactivó térmicamente al EC antes de ponerlo en contacto con el lactosuero, con la finalidad de evitar cualquier posibilidad de hidrólisis enzimática durante el tiempo requerido para la extracción y el posterior sometimiento a temperatura de ebullición.

El mismo procedimiento se siguió para hidrolizar una solución de BLG y una solución de ALA de concentraciones 3,0 y 1.5 mg/mL respectivamente, preparadas en buffer fosfato de sodio 0,2 M pH 7.5, suplementado con cisteína 4.0 mM.

Para determinar el grado de hidrólisis (GH) se realizaron hidrólisis en paralelo a las mismas temperaturas y pH descritos, pero para detener la reacción las alícuotas obtenidas (0.1 mL) se volcaron sobre 0.2 mL de TCA 10.0 % (m/v). Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 7155 g y los sobrenadantes se utilizaron para cuantificar la concentración de grupos amino primarios generados (equivalentes de hidrólisis) utilizando una solución de ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico (TNBS), de acuerdo con lo reportado por Spadaro y col. (1979). A 0.1 mL de sobrenadante se le agregó 1.0 mL de buffer borato de sodio 0.1 M pH 9.2 y 0.4 mL de TNBS 5.0 mM. La mezcla resultante se incubó al abrigo de la luz, a temperatura ambiente, durante 30 min. Por último, se agregó 0.4 mL de solución de fosfato monobásico de potasio 1.0 M conteniendo sulfito de sodio 18.0 mM y se midió la absorbancia a 420 nm. El grado de hidrólisis se definió como el porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados, según la ecuación:

$$GH = h (h_{tot})^{-1} \times 100$$

siendo h los equivalentes de hidrólisis formados durante la acción enzimática y  $h_{tot}$  los equivalentes de hidrólisis totales obtenidos luego de someter al lactosuero a una hidrólisis ácida utilizando ácido clorhídrico (HCl) 6.0 M a 110 °C durante 24 h en ampollas selladas. Los equivalentes de hidrólisis se calcularon utilizando una curva de calibración realizada con valina en el rango de concentración de 0.5 a 2.0  $\mu\text{mol/mL}$ .

### 3.2.14- Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

- ❖ Se realizó electroforesis en condiciones nativas en geles de poliacrilamida de 11.0 % de entrecruzamiento, con un equipo Hoefer SE 250 Mighty Small II. El buffer de corrida fue una solución de Tris 25.0 mM y glicina 0.2 M, a pH 8.6. La corriente se mantuvo constante a 50 mA. La muestra de siembra (Ms) se obtuvo realizando un pool con las tres fracciones de interés (fracciones 4, 5 y 6) resultantes de la cromatografía de exclusión molecular con Sephadex G-75 realizada a  $EC_{(Ficus)}$ , el cual se liofilizó y disolvió en 0.25 mL de agua destilada. Ms se preparó para la siembra adicionándole glicerol y azul de

bromofenol en concentraciones finales de 10.0 % y 0.25 % (m/v) respectivamente.

- ❖ El análisis del perfil de los tamaños moleculares de las proteínas presentes en el EC<sub>(Ficus)</sub> se realizó mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Se utilizó el mismo equipo que para la electroforesis nativa, pero la separación se realizó en un gel de 12.0 % de entrecruzamiento. A dos partes de la muestra Ms se agregó una parte de buffer de muestra reductor: buffer Tris-fosfato 0.19 M, β- mercaptoetanol 0.4 M, SDS 6.0 % (m/v), glicerol 30.0 % (v/v) y azul de bromofenol 0.4 % (m/v). Las soluciones resultantes se colocaron en un baño de agua a ebullición durante 5 min. La corrida se realizó a corriente constante de 50 mA. Como estándares de alto peso molecular (53 – 212 kDa) se usó miosina, α<sub>2</sub>-macroglobulina, β-galactosidasa, transferrina y glutámato deshidrogenasa. Como estándares de bajo peso molecular (14.4 – 97 kDa) se utilizó fosforilasa b, seroalbúmina bovina, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina y α-lactalbúmina.
- ❖ Los hidrolizados obtenidos por acción del EC<sub>(Araujia)</sub> se analizaron mediante electroforesis desnaturizante en geles con tricina, de acuerdo a lo reportado por Schagger (2006), en un equipo Mini-Protean Tetra Cell (BioRad Laboratories Inc). Para esto, 75 μL de lactosuero, ALA o BLG a concentraciones de 6.0, 1.5 y 3.0 mg/mL respectivamente, se mezclaron con 25.0 μL de buffer de muestra reductor, llevando luego la mezcla a baño de agua a ebullición durante 5 min. Se sembraron 10.0 μl de cada muestra en un sistema compuesto por un gel concentrador (4.0 % de entrecruzamiento), un gel espaciador (10.0 % de entrecruzamiento) y un gel separador (entrecruzamiento de 16.5 %, conteniendo urea 6.0 M). La fuente de alimentación se fijó inicialmente en 30 V para el ingreso de las muestras al gel concentrador y luego se mantuvo a 90 V hasta finalizar la corrida. Como marcador de peso molecular se utilizó M3546 (Sigma).

En todos los casos anteriores el revelado de las bandas se realizó con solución de Coomassie Brilliant Blue R 250 en metanol/ ácido acético/ agua (1:1:8).

- ❖ A las muestras denominadas pool 1, pool 2, pool 3 y pool 4 obtenidas a partir del intercambio iónico del EC<sub>(Ficus)</sub> tal como se detalla en el ítem 3.2.11, se realizó una SDS-PAGE en un sistema Phast System (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Las muestras se corrieron en un gel homogéneo de 12.5 % de entrecruzamiento. A 25.0 µL de cada muestra se le agregó 27.0 µL de buffer de muestra reductor, llevando luego la mezcla a baño de agua a ebulición durante 5 min. Se usaron estándares de 14.4, 21, 30, 43, 67 y 94 kDa. Los geles fueron revelados por tinción con plata, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### 3.2.15- Zimogramas

- ❖ Las proteínas separadas en un gel de PAGE nativo (corrido como se describió en 3.12.14) se dejaron difundir, por contacto, hacia un gel indicador de agarosa que contenía caseína. El gel de agarosa 1.0 % (m/v) en buffer Tris-HCl 0.05 M pH 8.0 (preparado sobre un film GelBond) fue embebido previamente en una solución de caseína 1.0 % (m/v) en agua destilada. Los geles se mantuvieron en contacto durante 10 min a 50 °C y posteriormente el gel de agarosa se sumergió en solución fijadora (ácido acético 10.0 % y metanol 45 %). A continuación, fue deshidratado por aplicación de presión entre papeles de filtro durante 1 h y posterior secado con pistola de aire. Las zonas de lisis, donde las bandas con actividad proteolítica digirieron el sustrato, se visualizaron como bandas claras sobre un fondo azul oscuro, después de la tinción del gel de agarosa con solución de Coomassie Brilliant Blue R 250 en metanol/ ácido acético/ agua (1:1:8).
- ❖ Para detectar proteasas activas en presencia de SDS y agente reductor, se llevó a cabo una SDS-PAGE como se describe en 3.2.14. en el ítem correspondiente a la determinación de tamaños moleculares, pero omitiendo el calentamiento de las muestras en baño a ebullición y usando el gel de poliacrilamida de 12.0 % de entrecruzamiento copolimerizado con caseína 0.2 % (m/v). Luego de la electroforesis estos geles fueron incubados durante 2 h a 22 °C en la solución de Coomassie Brilliant Blue R 250.

En todos los casos las bandas sin teñir sobre fondo azul evidenciaron zonas de actividad proteolítica.

### 3.2.16- Fraccionamiento de los productos de hidrólisis

Los productos de hidrólisis se fraccionaron en función de su tamaño molecular con filtros de centrifuga AMICON Ultra 4 con cortes de masa de 3 y 10 kDa, durante 1 h a 10 °C. Los filtros fueron usados secuencialmente (el filtrado obtenido con el filtro de corte en 10 kDa fue aplicado al de corte en 3 kDa), de manera de obtener fracciones de tres rangos de tamaño: menores a 3 kDa, entre 3 y 10 kDa y mayores a 10 kDa. Los retentatos y permeatos se almacenaron a -20 o a 7 °C hasta su uso.

### 3.2.17- Evaluación de la actividad antimicrobiana

- ❖ Con los filtrados provenientes de las hidrólisis realizadas con EC<sub>(Ficus)</sub> y EC<sub>(Araujia)</sub> obtenidos como se describe en 3.2.16, se realizaron bioautografías utilizando cepas de colección, de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Las muestras (50.0 µL) se aplicaron sobre placas finas de alúmina y se cubrieron con una fina capa de agar Müller-Hinton con el inóculo correspondiente incorporado. Para preparar el inóculo se partió de un precultivo de 24 h a 37 °C en agar Müller-Hinton. Se extrajeron colonias de ese pre-cultivo y se colocaron en suero fisiológico estéril hasta llegar al 1 de la escala de Mc Farland (correspondiente a  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL). A 1.0 mL de esta suspensión celular se le agregaron 100.0 mL de agar Müller-Hinton fundido, se homogeneizó y se volcó sobre las placas de alúmina con las muestras aplicadas. Luego de 24 h a 37 °C, se visualizaron las bacterias viables por tinción con cloruro de 2,3,5- trifenil tetrazolio (TTZ). La capacidad antimicrobiana fue evaluada comparando los tamaños de los halos de inhibición, visualizados como círculos blancos sobre fondo rojo.
- ❖ La cuantificación de la inhibición del crecimiento bacteriano se realizó en placas de microtitulación, tal como es reportado por Hadacek y Greger (2000). Se partió de un precultivo de 24 h a 37 °C en caldo Müller-Hinton, a

partir del cual se preparó el inóculo en el mismo medio, conteniendo  $10^6$  unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ mL). Se aplicaron 50.0  $\mu$ L de inóculo a 50.0  $\mu$ L de la muestra a testear y se midió la turbidez a 560 nm luego de incubación durante 24 h a 37 °C. Como control positivo se utilizó bacitracina (1.5 mg/mL). Los resultados se informaron como porcentaje de inhibición del crecimiento, tomando como 100 % la turbidez alcanzada por el crecimiento del inóculo sin la presencia de ningún agente inhibidor. En este caso, en lugar de los 50.0  $\mu$ L de muestra a testear se aplicaron 50.0  $\mu$ L de suero fisiológico.

### **3.2.18- Cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC)**

Los filtrados provenientes de las hidrólisis realizadas con EC<sub>(Araujia)</sub> y obtenidos como se describe en la sección 3.2.16 se liofilizaron y disolvieron en ácido trifluoroacético (TFA) 0.1% en agua ultrapura (fase móvil A). La cromatografía se realizó en sistema Prominence UFLC con detector UV-visible de arreglo de fotodiodos (SPD M20A) utilizando el software LCsolution (Shimadzu Corporation, Kioto, Japón). Se inyectaron 50.0  $\mu$ L de muestra en una columna Viva C18 (5  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm, poro de 300 Å, Restek, EE. UU.) equilibrada con la fase móvil A, con un flujo de 1.0 mL/min. La elución se realizó con un gradiente binario lineal de fase móvil A y fase móvil B (0.1 % de TFA en acetonitrilo) de 0 a 60% de fase móvil B en 60 min y de 60 a 2 % de fase móvil B en 10 min. Se recogieron fracciones de 0.5 mL, siguiendo la elución a 220 y 280 nm. Todas las corridas se realizaron por triplicado. Las fracciones obtenidas se secaron con Speed Vac (Thermo Scientific Savant 1010) a 45 °C y 6.7 Torr y se disolvieron en 300.0  $\mu$ L de buffer fosfato de sodio 0.2 M (pH 7.5).

### **3.2.19- Evaluación de la actividad antioxidante**

La actividad antioxidante de las fracciones de la RP-HPLC, de hidrolizados obtenidos con el EC<sub>(Araujia)</sub> y el EC<sub>(Ficus)</sub> se evaluó con el método de la reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y por la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC).

- ❖ El ensayo del DPPH se realizó según Zhang y col. (2013). A 50.0 µL de solución a testear se le agregaron 2.0 mL de solución de DPPH 120.0 µM en metanol. A continuación, se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 515 nm. Para el control se procedió de la misma manera, pero en lugar de solución a testear se colocaron 50.0 µL de metanol. El porcentaje de depuración de radicales DPPH ( $DR_{DPPH}\%$ ) se calculó con la ecuación.

$$DR_{DPPH}\% = 100 (A_{control} - A_{muestra}) / A_{control}$$

donde  $A_{control}$  y  $A_{muestra}$  son respectivamente la absorbancia a 515 nm del control y la obtenida para cada muestra individual. Se definió la concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) como la concentración peptídica necesaria para eliminar el 50% de radicales DPPH.

- ❖ El ensayo ORAC se realizó según Zulueta y col. (2009) con diclorhidrato de 2,20-azobis 2-amidinopropano (AAPH) como inductor del decaimiento de la emisión de fluoresceína sódica y Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) como estándar, usando agua destilada como blanco. Se utilizó un lector de microplacas Infinite M200 Pro (Tecan, Salzburg, Austria) con longitudes de excitación y emisión de 485 y 535 nm respectivamente. A 50.0 µL de fluoresceína sódica 0.78 µM se le agregaron 50.0 µL de Trolox 50 µM, muestra o blanco. Se incubó a 37 °C durante 15 min, con agitación. A continuación, se agregaron 25.0 µL de AAPH 220 mM, comenzando a medir la fluorescencia inmediatamente a partir de este agregado. Se registraron los valores de fluorescencia a 37 °C, con agitación, cada 5 min durante 2 h. Los valores ORAC se expresaron como equivalentes Trolox (ET) y calculados por:

$$ET(\mu M) = C_{Trolox} (ABC_{Muestra} - ABC_{Blanco}) FD / (ABC_{Trolox} - ABC_{Blanco})$$

donde  $C_{Trolox}$  es la concentración de Trolox (50 µM), ABC es el área debajo de la curva de disminución de la fluorescencia y FD es el factor de dilución de la muestra. En algunos casos, los valores de ORAC también se expresaron como µmol de equivalente Trolox/µmol de péptido.

### 3.2.20- Espectrometría de masas

- ❖ El perfil de las proteínas presentes en los EC(*Ficus*) fue analizado por Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) y Time of Fly (TOF) en un equipo Voyager DE-Pro, AbiSciex.
- ❖ Los péptidos obtenidos por acción del EC(*Araujia*) sobre lactosuero, presentes en las fracciones recolectadas de la RP-HPLC con actividad antioxidante, fueron identificados por RP-HPLC MS/MS. El mismo procedimiento se siguió con los péptidos obtenidos por hidrólisis de BLG con EC(*Araujia*), presentes en una muestra constituida por las fracciones con mayor actividad antioxidante recolectadas de la RP-HPLC. Las fracciones peptídicas se separaron utilizando un nano-HPLC (Ultimate 3000, Thermo Scientific) junto con un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo-Orbitrap (Q-Exactive Plus, Thermo Scientific). Tanto la columna como la precolumna fueron de Thermo Fisher Scientific. El flujo fue de 0,2  $\mu$ L/min. Los péptidos se eluyeron con gradiente lineal de solvente B: acetonitrilo y TFA 1000:0,8 (v/v) en solvente A: agua y TFA 1000:1 (v/v) de 0 a 35% durante 90 min, seguido de un gradiente de 20 min del solvente B en A de 35 a 100%. Se usó el programa PatternLab-for Proteomic. Se definieron los siguientes parámetros de búsqueda: base de datos: SwissProt.2017.11.01; enzima: sin enzima; especies: Bos taurus; tolerancia de masa peptídica: 40 ppm; tolerancia de masa del fragmento: 0,8 Da. Las masas peptídicas fueron descritas como monoisotópicas.<sup>3</sup>

Estos análisis fueron realizados por el Servicio de Espectrometría de Masas, Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur de Montevideo.

### 3.2.21- Análisis estadístico

Los resultados se informaron como promedios  $\pm$  desviación estándar de ensayos por triplicado. La existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los resultados se evaluó mediante análisis de varianza (ANOVA).



## 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1- CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LOS EXTRACTOS

#### 4.1.1- Actividad proteolítica de los extractos crudos, efecto de inhibidores y agentes reductores.

Se recolectó látex de tres especies pertenecientes a la flora nativa del Uruguay: *Sapium glandulosum* (árbol de la leche), *Ficus luschnatiana* (higuerón) y *Araujia sericifera* (taso), preparándose los correspondientes extractos crudos.

Los tejidos vegetales suelen contener un amplio espectro de compuestos fenólicos que son oxidados a quinonas por la acción de fenoloxidasas. Estas quinonas y los pigmentos pardos formados a partir de ellas por reacciones de polimerización inhiben a muchas enzimas, entre ellas a varias peptidasas (Anderson, 1968). Debido a que las fenoloxidasas contienen iones cobre en su sitio activo, una manera de inhibir su acción es la utilización de agentes quelantes (Morcelle.y col., 2004).

Se evaluó para los tres casos la influencia de la suplementación del buffer fosfato de sodio 0.2 M pH 7.5 con EDTA 50 mM, obteniéndose que solamente en el caso del EC<sub>(Araujia)</sub> este agregado produjo un efecto significativo en la actividad proteolítica (datos no mostrados).

Los estudios de inhibición realizados en EC<sub>(Ficus)</sub> mostraron una total inhibición de la actividad con PMSF (tabla2), a diferencia de lo reportado para las dos especies vegetales antes mencionadas.

Los valores obtenidos fueron los mismos para todas las concentraciones ensayadas de cada inhibidor (datos no mostrados). El alto porcentaje de inhibición obtenido con PMSF y la falta de efecto del E-64, sugiere un mecanismo catalítico de naturaleza serínica de las proteasas presentes en el EC, descartándose un modelo cisteínico. La acción de la iodoacetamida puede explicarse por la capacidad de este agente de inhibir proteasas serínicas (Salvesen y Nagase, 2001).

**Tabla 2- Porcentajes de inhibición obtenidos con EC<sub>(Ficus)</sub>, luego de incubación durante 1 h a 25 ° C.** Los datos son la media de tres experimentos independientes  $\pm$  desviaciones estándar.

Inhibidor	Porcentaje de inhibición (%)
PMSF	99.4 $\pm$ 1.6
E-64	0.0
Iodoacetamida	11.0 $\pm$ 2.3
Pepstatina	0.0
EDTA	0.0

Se decidió enfocar los estudios subsiguientes en dos de las tres especies nativas utilizadas hasta el momento, utilizando como criterios de selección el interés de trabajar con extractos crudos de diferente naturaleza catalítica y amplio espectro de aplicaciones a nivel popular. Con respecto a esto último, las plantas del género *Araujia*, además de ser usadas con fines alimenticios por sus frutos y ornamentales por sus flores, son utilizadas con fines medicinales debido a sus propiedades galactógenicas, como tratamiento para indigestiones y para favorecer la dentición (Bucciarelli y col., 2008).

Estas condicionantes, sumadas al hecho de que los EC<sub>(Sapium)</sub> evidenciaron una notoria inactivación luego de cortos períodos de almacenamiento en condiciones variadas (datos no mostrados) condujeron a la elección del *F. luschnathiana* y la *A. sericífera* para el posterior desarrollo de las investigaciones.

Teniendo en cuenta la naturaleza cisteínica de las enzimas presentes en el EC<sub>(Araujia)</sub>, se procedió a estudiar el efecto de agentes reductores en su actividad. Debido al mecanismo catalítico de estas enzimas, es esencial que la cisteína se encuentre en estado reducido para estar completamente activa. Para prevenir su oxidación se suelen utilizar agentes reductores como los tioles de bajo peso

molecular. Ejemplos de estos son el tioglicolato, ditioneitol,  $\beta$ -mercaptoetanol o cisteína.

La presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol en concentración 6.7 mM en la mezcla de reacción dio como resultado una actividad 4 veces mayor que la del control (mezcla reactiva sin agente reductor).

Este estudio también se realizó en el EC(*Ficus*). El efecto nulo de los mercaptanos en la actividad contribuyó a confirmar los resultados obtenidos referentes a la ausencia de enzimas cisteínicas.

El efecto positivo del  $\beta$ -mercaptoetanol sobre la actividad del EC(*Araujia*) llevó a considerar la utilización de cisteína como alternativa adecuada para la utilización en procesos relacionados a la producción de alimentos. En la tabla 3 se muestra la actividad de este EC en presencia de diferentes concentraciones de cisteína.

**Tabla 3- Efecto de la concentración de cisteína sobre la actividad proteolítica del EC(*Araujia*) a pH 7,5.** Los datos son la media de tres experimentos independientes  $\pm$  desviaciones estándar.

<b>Concentración de cisteína (mM)</b>	<b>Actividad (UE/mL)</b>
0.0	0.05 $\pm$ 0.04
1.0	0.33 $\pm$ 0.05
2.0	0.45 $\pm$ 0.01
3.0	0.54 $\pm$ 0.04
4.0	0.64 $\pm$ 0.04
5.0	0.61 $\pm$ 0.03

Puede apreciarse que a medida que la concentración de cisteína fue aumentando hasta un valor de 4.0 mM, también lo hizo el valor de actividad, llegando a 0.64  $\pm$  0.04 UE/mL, aproximadamente 12 veces más que el control (sin agregado de cisteína). Este valor máximo de actividad se mantuvo cuando la concentración de

cisteína aumentó a 5.0 mM. Debido a estos resultados, el buffer de actividad a usarse con EC<sub>(Araujia)</sub> se suplementó con cisteína 12.0 mM, lo cual resulta en una concentración efectiva de 4.0 mM en la mezcla de reacción.

Resultados similares fueron reportados por diferentes investigadores que estudiaron el efecto de la activación con agentes reductores, de proteasas presentes en látex de plantas pertenecientes a la subfamilia Asclepiadaceae. Dependiendo de la especie, las activaciones máximas se obtuvieron en el rango de concentraciones de cisteína entre 10 y 20 mM (Winnick y col., 1940; Dubey y Jagannadham, 2003).

Para la papaína, una cisteín proteasa proveniente del látex de *Carica papaya* (familia Caricaceae), se reportó que el máximo de actividad se obtuvo en presencia de cisteína 10 mM. En este caso, a pesar del requerimiento de una mayor concentración de reductor, el aumento relativo de la actividad respecto al control (ausencia de cisteína) es mucho menos marcado que para el EC<sub>(Araujia)</sub>, siendo de aproximadamente 35-36 % (Homaei y col., 2010).

Para los ensayos de actividad realizados de forma preliminar, se utilizó un tiempo de reacción de 10 minutos. Una vez que fueron fijadas las composiciones finales de los respectivos buffers a ser usados en los ensayos, se procedió a determinar el rango lineal de las curvas de absorbancia a 337 nm versus el tiempo de reacción en esas condiciones, observándose que tanto para el EC<sub>(Araujia)</sub> como para el EC<sub>(Ficus)</sub> la relación entre ambos parámetros se mantuvo lineal hasta los 15 y 20 minutos respectivamente, por lo que se continuó utilizando un tiempo de 10 minutos para los ensayos de actividad posteriores.

Como método de detención de la reacción hidrolítica sin adición de reactivos químicos se evaluó el tratamiento térmico de la mezcla reactiva, en baño de agua a 100 ° C. Luego de 1 min en estas condiciones la actividad proteolítica del EC<sub>(Ficus)</sub> fue suprimida totalmente pero el EC<sub>(Araujia)</sub> conservaba aun el 2.0 % de actividad remanente. En este último caso, se necesitaron 5 min de tratamiento para asegurar la inactivación total de la actividad proteolítica.

#### 4.1.2- Determinación de la capacidad de coagulación de la leche

Se evaluó la capacidad de coagulación de la leche del EC<sub>(Ficus)</sub> y el EC<sub>(Araujia)</sub>, comparándolas con la de una solución de tripsina y una de quimosina, como se explica en 3.2.5. A partir de los tiempos de coagulación obtenidos se calculó para cada caso la relación UCL/UE, lo cual se detalla en la tabla 4.

**Tabla 4- Valores de actividad proteolítica determinados con azocaseína (UE/mL), de UCL /mL y del cociente UCL/UE, obtenidos con EC<sub>(Ficus)</sub>, EC<sub>(Araujia)</sub>, tripsina y quimosina.** Los datos son la media de tres experimentos independientes  $\pm$  desviaciones estándar.

Solución enzimática	Actividad (UE/mL)	UCL/mL	UCL/UE
EC <sub>(Ficus)</sub>	4.4 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.1	0.16 $\pm$ 0.02
EC <sub>(Araujia)</sub>	4.4 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 0.4	0.68 $\pm$ 0.03
Tripsina	4.4 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.02
Quimosina	0.02 $\pm$ 0.01	30.0 $\pm$ 1.5	1666.7 $\pm$ 40.2

Una de las limitantes para la formación y estabilidad del coágulo de caseína es la hidrólisis excesiva, motivo por el cual la tripsina no es una proteasa adecuada para su uso en la fabricación de quesos y debido a esto es considerada en este trabajo como un control negativo del proceso.

Por el contrario, el uso de quimosina, proveniente del cuajo de ternera, tradicionalmente es el procedimiento más utilizado, pero el constante aumento de la producción de queso a nivel mundial, el aumento de los precios del cuajo de ternera por la marcada disminución de la oferta y la consideración de aspectos religiosos y de las opciones de vegetarianismo de los consumidores, ha llevado a la búsqueda de enzimas alternativas, preferentemente de fuentes vegetales (Amira y col., 2018).

Los dos ECs ensayados mostraron capacidad de coagulación de la leche, con una mayor eficiencia para este propósito que la tripsina, especialmente el EC<sub>(Araujia)</sub>. En

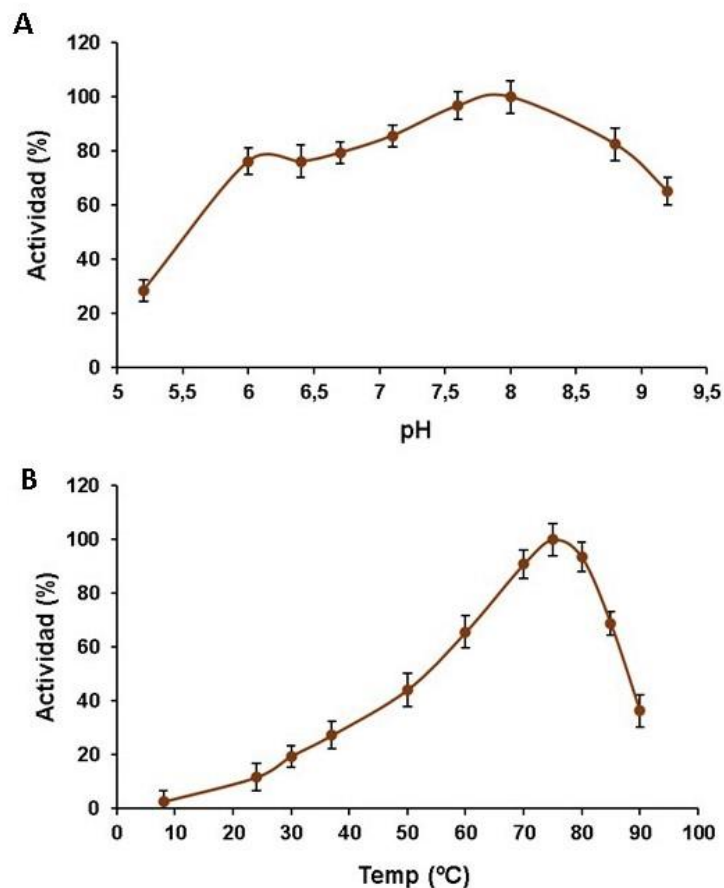
cambio, para ambos EC los valores de UCL/UE estuvieron muy por debajo de los logrados con quimosina. Estudios adicionales deben ser realizados para determinar la efectividad de estas enzimas para la producción de quesos, como el control de la aparición de sabores amargos indeseados o defectos en la textura del producto durante el almacenamiento y/o la maduración.

Los extractos de flores de *Cynara cardunculus* se han utilizado durante mucho tiempo como coagulantes de la leche. La capacidad de estos extractos para cumplir dicha función se debe a varias proteasas aspárticas: cardosinas A, B, E, F, G y H y ciproquinas 1, 2 y 3. Las cardosinas A y B son las más estudiadas y mejor caracterizadas; ambas son heterodímeros de 46 y 48 KDa respectivamente (Ghribi y col., 2022; Zikiou y Zidoune, 2019).

#### **4.1.3- Efecto del pH y la temperatura en la actividad proteolítica de los extractos**

Los ensayos de actividad del EC<sub>(Ficus)</sub> a diferentes pH entre 5.2 y 9.2 dieron como resultado un máximo en el rango de pH 7.6 - 8.0 (figura 16 A). El valor más bajo se registró a pH 5.2, evidenciándose una marcada disminución de la actividad a pH ácido, respecto a los neutros y alcalinos. En el rango entre pH 6.0 y 9.2 el extracto mostró en todos los casos una actividad de al menos el 65 % del valor máximo alcanzado a pH 8.0. Los estudios realizados a diferentes temperaturas, entre 8 y 90 °C, se visualizan en la figura 16 B, en la cual se aprecia un máximo de actividad a 75 °C.

El látex de *Ficus carica* contiene una gran cantidad de componentes proteolíticos que pertenecen en su gran mayoría al grupo de proteasas cisteínicas de la familia de la papaína. Se ha reportado que el pH óptimo para la actividad proteolítica de estas peptidasas se encuentra en el rango de pH 5.0 – 8.0 y la temperatura óptima entre 45 y 55 °C (Aider, M., 2021). La información disponible referente a ficinas serínicas es muy limitada. Para la ficina E, extraída del látex de *Ficus elástica*, se ha reportado un pH óptimo de 6.0 (Lynn y Clevette-Radford, 1986).



**Figura 16- Influencia del pH y la temperatura sobre la actividad proteolítica del EC(*Ficus*).** **A-** Curva de actividad a 37 °C y diferentes pH. **B-** Curva de actividad a pH 7.5 y diferentes temperaturas.

Comparando estos datos con lo obtenido con *F. luschnathiana*, puede verse que existe bastante concordancia con el rango de pH al cual la actividad es máxima, con la excepción de que en este último caso el valor mínimo del rango es más alto (pH 6.0). Con respecto a la temperatura, en cambio, el EC(*Ficus*) presenta un notorio corrimiento hacia temperaturas más altas, teniendo a 75 °C valores de actividad que superan en más de un 100 % las obtenidas a 50 °C.

Estos resultados tienen mayor coincidencia con lo reportado para la indicaína, una proteasa serínica proveniente del látex de *Morus indica*, la cual tiene un pH óptimo de 8.5 y una temperatura óptima de 80 °C (Singh y col., 2008).

Priolo y col. (2000) y Obregón y col. (2001) reportaron las condiciones óptimas para la actividad de un EC<sub>(Araujia)</sub> y de las enzimas aisladas a partir de este, utilizando caseína como sustrato. El extracto crudo presentó un rango de pH óptimo de 7.5-8.5. Para la enzima aislada araujaína h-I el pH óptimo estuvo comprendido en el rango 8.0-9.5. Las peptidasas araujaína h-II y h-III mostraron un comportamiento muy similar entre sí, teniendo ambas un pH óptimo entre 8.0 y 9.0.

Para la determinación del efecto de la temperatura, los mencionados investigadores realizaron estudios en el rango entre 37 y 70 °C, encontrando que para el EC y las enzimas araujaína h-II y h-III, los valores de actividad fueron máximos a 70 °C, existiendo la posibilidad de que a temperaturas mayores pudiera darse un incremento aún mayor. En el caso de araujaína h-I, el máximo se alcanzó a 60 °C.

#### **4.1.4- Efecto del pH y la temperatura sobre la estabilidad de la actividad proteolítica de los extractos.**

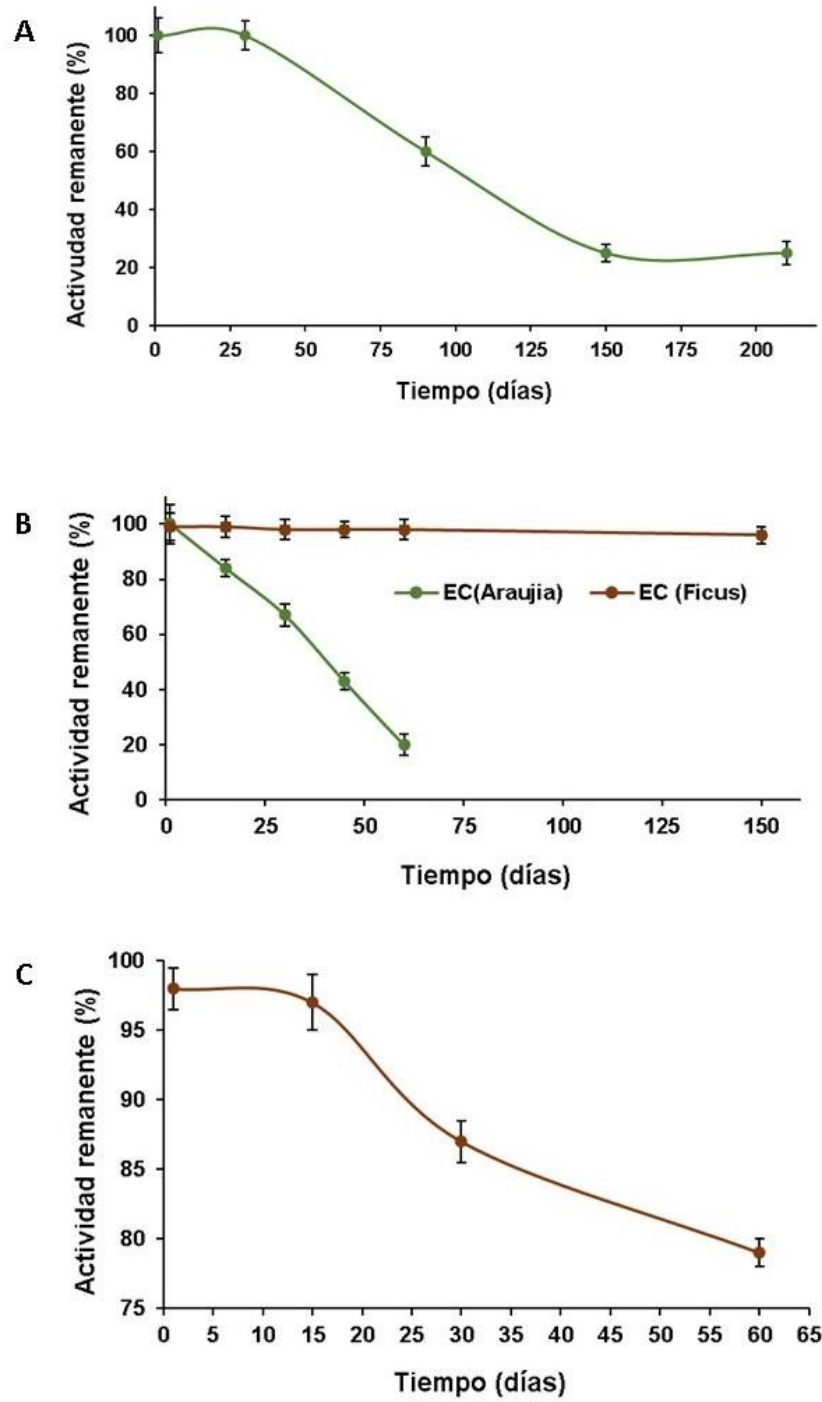
Se evaluaron los efectos de diferentes condiciones de pH y temperatura sobre la estabilidad del EC<sub>(Ficus)</sub> y el EC<sub>(Araujia)</sub>. Los resultados obtenidos con temperaturas de almacenamiento de -20, 7 y 22 °C se muestran en la figura 17.

Luego de 24 h de almacenamiento a -20 °C, la actividad remanente del EC<sub>(Ficus)</sub> decayó a un 15 ±1 % respecto de la inicial (datos no mostrados), a diferencia del EC<sub>(Araujia)</sub>, cuya actividad se mantuvo invariante durante los primeros 30 días, exhibiendo una vida media a esas condiciones de 105 días (figura 17 A).

A 7 °C, el comportamiento de los extractos se invirtió. EC<sub>(Ficus)</sub> mantuvo el 96 % de su actividad inicial luego de 5 meses. El EC<sub>(Araujia)</sub> perdió el 80 % de su actividad luego de 2 meses de almacenamiento, teniendo una vida media de 40 días (figura 17 B).

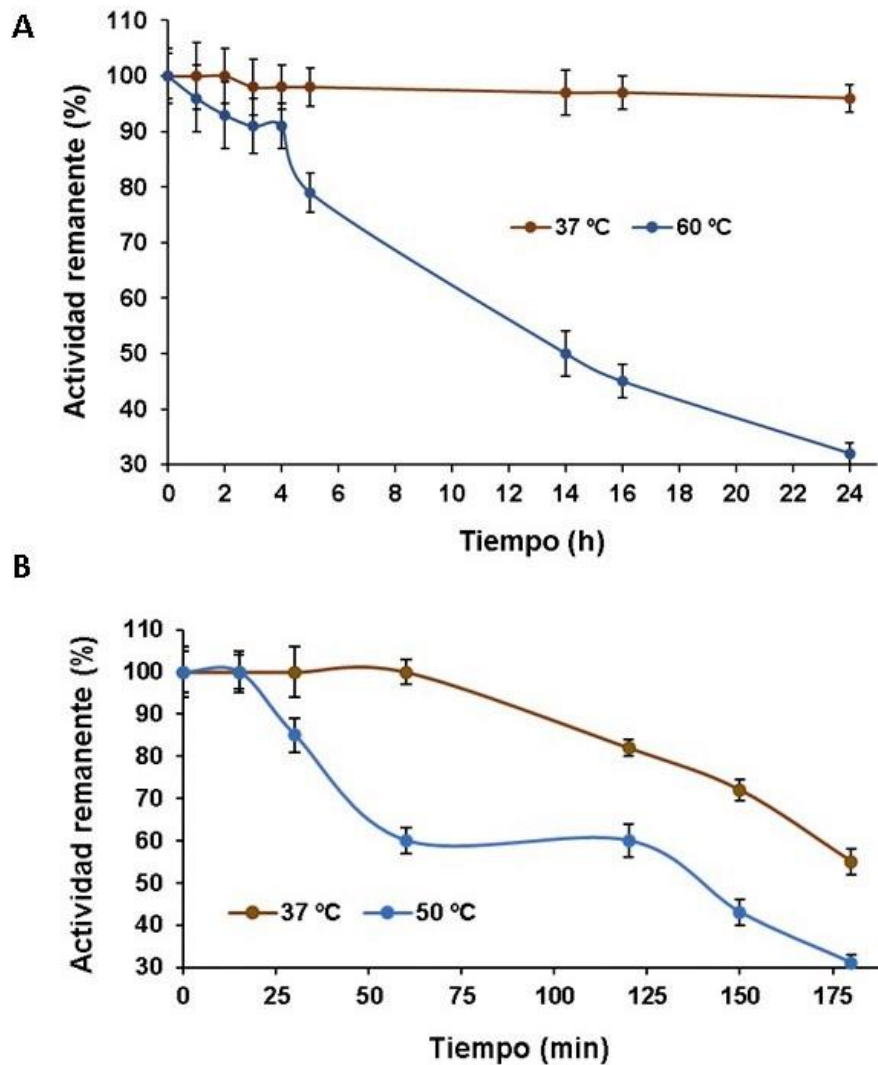
La termoestabilidad del EC<sub>(Ficus)</sub> se evidenció también a temperaturas más altas. A 22 °C, durante los primeros 15 días de almacenamiento la actividad no mostró diferencias significativas con la inicial y al cabo de 2 meses aún mantenía el 79 % de la misma (figura 17 C).





**Figura 17- Estabilidad de los ECs a diferentes temperaturas de almacenamiento, pH 7.5. A-** Cinética de inactivación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para el  $\text{EC}_{(\text{Araujia})}$ . **B-** Cinética de inactivación a  $7\text{ }^{\circ}\text{C}$  para el  $\text{EC}_{(\text{Araujia})}$  y  $\text{EC}_{(\text{Ficus})}$ . **C-** Cinética de inactivación a  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  para el  $\text{EC}_{(\text{Ficus})}$ .

Contemplando potenciales aplicaciones que requieran un tiempo de uso a temperaturas más elevadas, se realizaron estudios de estabilidad a 37, 50 y 60 °C (figura 18).



**Figura 18- Estabilidad de los ECs a diferentes temperaturas de uso, pH 7.5. A-** Cinética de inactivación a 37 y 60 °C del EC (*Ficus*). **B-** Cinética de inactivación a 37 y 50 °C del EC (*Araujia*).

Para el EC(*Ficus*), a la temperatura del ensayo de actividad (37 °C), la actividad remanente no mostró diferencias significativas con la inicial, dentro de un período de 24 h. A 60 °C se mantuvo el 96 % al cabo de la primera hora de estudio,

alcanzando un 79 % a las 5 h de incubación. Luego de 24 h la actividad remanente fue de un 32 %. La vida media en estas condiciones fue de 14 h (figura 18 A).

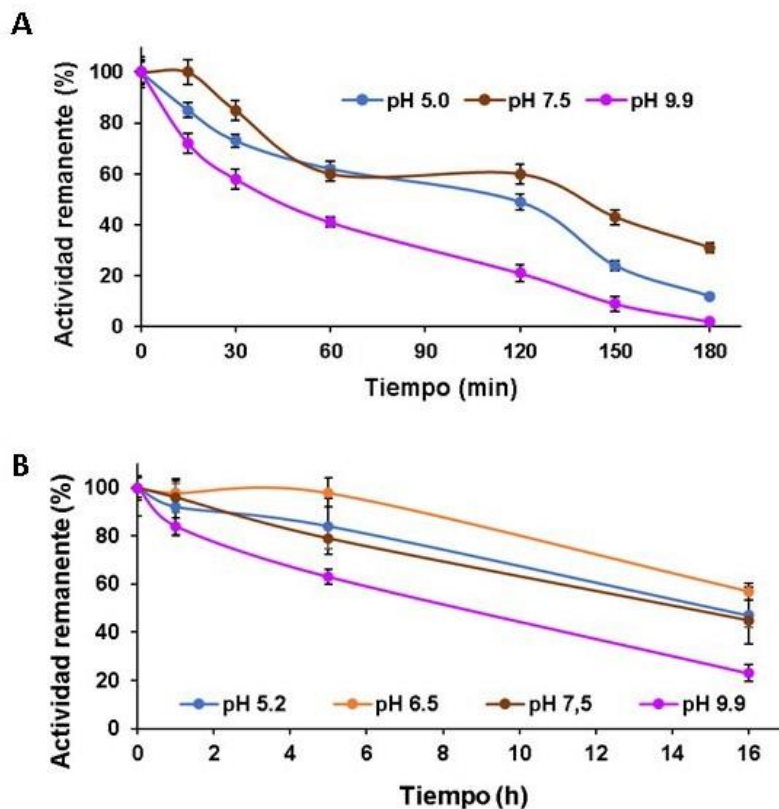
La estabilidad del  $EC_{(Araujia)}$  a 37 y 50 °C se estudió durante un período de 3 h (figura 18 B). La actividad remanente se mantuvo incambiada durante 1 h a 37 °C, comenzando luego un descenso hasta llegar a un valor de 55 %. A 50°C no se evidenció ningún cambio luego de los primeros 15 min, y a las 2 h de incubación se conservó aun el 60 % de actividad remanente, siendo su vida media de 140 min.

A 60 °C la inactivación del  $EC_{(Araujia)}$  se dio de manera mucho más abrupta que la observada a 50 °C, perdiéndose la actividad casi completamente al cabo de la primera hora de incubación (datos no mostrados). Priolo y col. (2000) reportaron una muy pobre estabilidad térmica para araujiaina I a 60 ° y pH 8.5, la cual perdió más del 80 % de su actividad remanente luego de menos de 5 min de incubación.

Los estudios a 50 y 60 °C realizados para  $EC_{(Araujia)}$  y  $EC_{(Ficus)}$  respectivamente evidenciaron la capacidad de estos de mantener altas actividades remanentes a temperaturas que no implican costos elevados para una potencial aplicación industrial, pero a la vez que son favorables para su actividad, teniendo en cuenta las altas temperaturas óptimas de ambos, generando a la vez condiciones desfavorables para el crecimiento microbiano durante los procesos.

El efecto de diferentes pH sobre la estabilidad de los  $EC_{(Araujia)}$  y  $EC_{(Ficus)}$  se determinó a 50 y 60 °C respectivamente. En el caso del  $EC_{(Araujia)}$  no hubo diferencias significativas en los resultados obtenidos a pH 6.0, 7.5 y 9.0. A pH 5.0 y 9.9 se observaron valores menores de actividad remanente, determinándose vidas medias de 120 y 40 min respectivamente (figura 19 A).

El comportamiento del  $EC_{(Ficus)}$  frente a diferentes pH se muestra en la figura 19 B. Para los dos extractos la estabilidad a pH 7.5 fue muy similar a la observada para un medio ácido, siendo esta similitud mucho más evidente en el caso del  $EC_{(Ficus)}$ . Para este último los valores más altos se obtuvieron a pH levemente ácido (pH 6.5) y para el  $EC_{(Araujia)}$  en el rango 6.0 - 9.0. En ambos casos un medio fuertemente alcalino (pH 9.9) fue el menos favorable.



**Figura 19- Efecto de diferentes pH sobre la estabilidad de la actividad de los extractos. A-** Cinéticas de inactivación del EC(*Araujia*) a 50 °C. **B-** Cinéticas de inactivación del EC(*Ficus*) a 60 °C

En la tabla 5 se presenta un cuadro comparativo que integra los resultados obtenidos en este trabajo o reportados por otros autores, respecto a la caracterización de las actividades proteolíticas del EC(*Ficus*) y el EC(*Araujia*).

**Tabla 5- Cuadro comparativo de las características de la actividad proteolítica del EC<sub>(Ficus)</sub> y EC<sub>(Araujia)</sub>.** Los datos señalizados con (\*) fueron extraídos de Priolo y col. (2000).

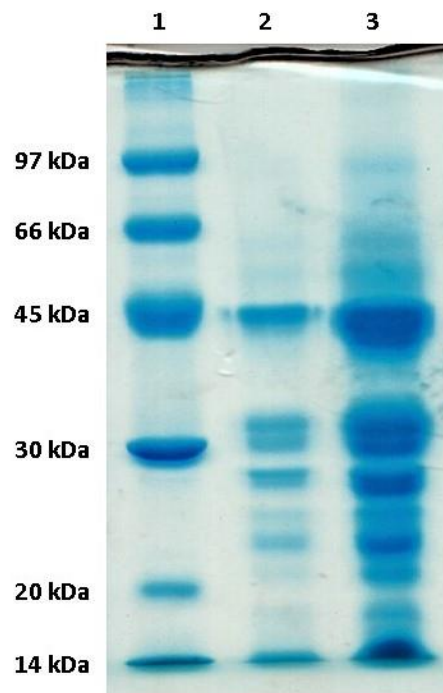
Características	EC <sub>(Ficus)</sub> .	EC <sub>(Araujia)</sub>
Influencia de la presencia de EDTA 50 mM en el buffer de extracción	Nula	Positiva (aumento de un 10 % aprox.)
Mecanismo catalítico	Serínico	Cisteínico *
Efecto de tioles de bajo peso molecular	Nulo	El β-mercaptoetanol 6.7 mM y la cisteína 4.0 mM aumentaron la actividad en un factor de 4 y 12 respectivamente
Capacidad de coagulación de la leche de extractos con 4.4 UE/mL (UCL)	0.71	3.0
pH óptimo	7.6-8.0	7.5-8.5 *
T óptima (°C)	75	Mayor o igual a 70*
Estabilidad a -20 °C	Pérdida del 85 % de la actividad remanente luego de 24 h	t ½ = 105 días
Estabilidad a 7 °C	Mantiene el 96 % de su actividad inicial luego de 5 meses	t ½ = 40 días
Estabilidad a 22 °C	Durante 15 días mantuvo la totalidad de la actividad y luego de 2 meses conservó el 79 %	No de determinó
Estabilidad a 37 °C	Mantiene el 100 % de su actividad inicial luego de 24 h	t ½ = 3 h aprox.
Estabilidad a 50 °C	No se determinó	t ½ = 140 min
Estabilidad a 60 °C	t ½ = 14 h	Inactivación completa luego de 1 h
Tiempo de inactivación a 100 °C	1 min	5 min
pH más favorable para conservación de la actividad	6.5	6.0-9.0
pH más desfavorable para conservación de la actividad	9.9	9.9

## 4.2- CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DEL EXTRACTO CRUDO DE *Ficus luschnathiana*

### 4.2.1- Evaluación de la ocurrencia de autólisis de las peptidasas del EC(*Ficus*)

Los extractos proteolíticos pueden sufrir autólisis, es decir, las peptidasas podrían utilizar como sustrato otras moléculas de igual naturaleza presentes en el medio. Realizando la extracción del látex en presencia de un agente bloqueante del sitio activo o de un inhibidor de la actividad proteolítica, es posible evitar la autólisis.

Se prepararon EC(*Ficus*) en presencia y ausencia de PMSF 1 mM y luego de 48 h de almacenamiento a 7 °C se compararon electroforéticamente (figura 20). Ambos extractos fueron liofilizados y disueltos en la mínima cantidad necesaria de agua destilada, previo a la corrida electroforética.



**Figura 20- Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida del EC(*Ficus*).** Carril 1: Estándares de tamaño molecular; carril 2: EC(*Ficus*) sin PMSF; carril 3: EC(*Ficus*) en presencia de PMSF 1.0 mM.

Puede apreciarse un gran número de componentes proteicos en el extracto, distribuidos en más de 13 bandas de diferentes intensidades relativas,

principalmente en el rango entre 14 y 45 kDa, aunque están presentes componentes de tamaños mayores. El perfil de bandas obtenido para el EC con y sin PMSF es cualitativamente muy similar en ambos casos, por lo que se descarta un efecto significativo de autólisis en las primeras 48 h a partir del proceso de extracción.

#### 4.2.2- Fraccionamiento del EC<sub>(Ficus)</sub> por cromatografía de exclusión molecular

Se realizó un fraccionamiento en base a diferencias de tamaño de los constituyentes del EC<sub>(Ficus)</sub>, mediante cromatografía de exclusión molecular con Sephadex G-75, obteniéndose el perfil de elución que se muestra en la figura 21. Con este procedimiento se lograron tres fracciones enriquecidas en peptidasas (fracciones 4-6) de las cuales lograron removerse componentes de escasa o nula capacidad proteolítica, con significativa absorbancia a 280 nm (posiblemente polifenoles, polipéptidos de bajo peso molecular, etc.).

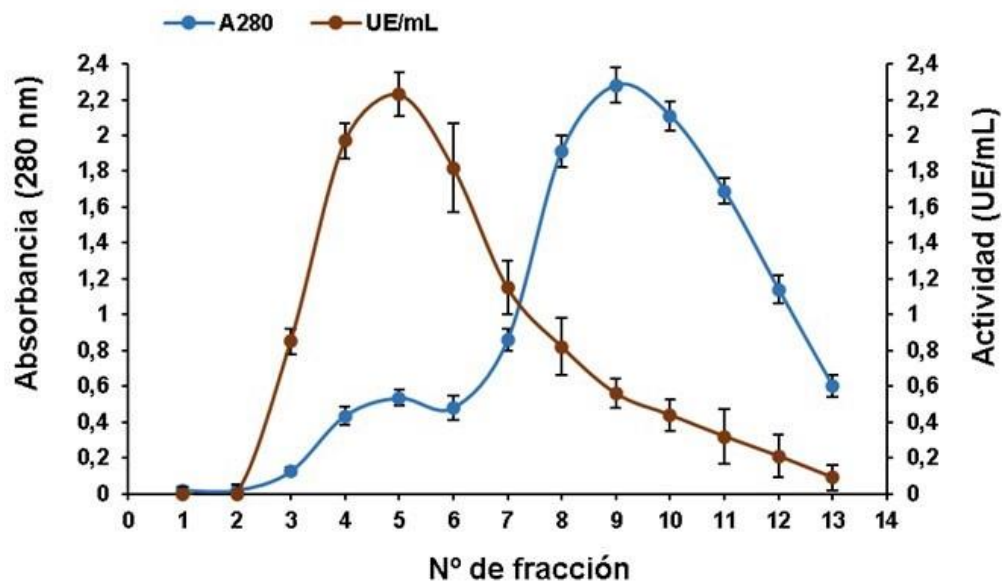


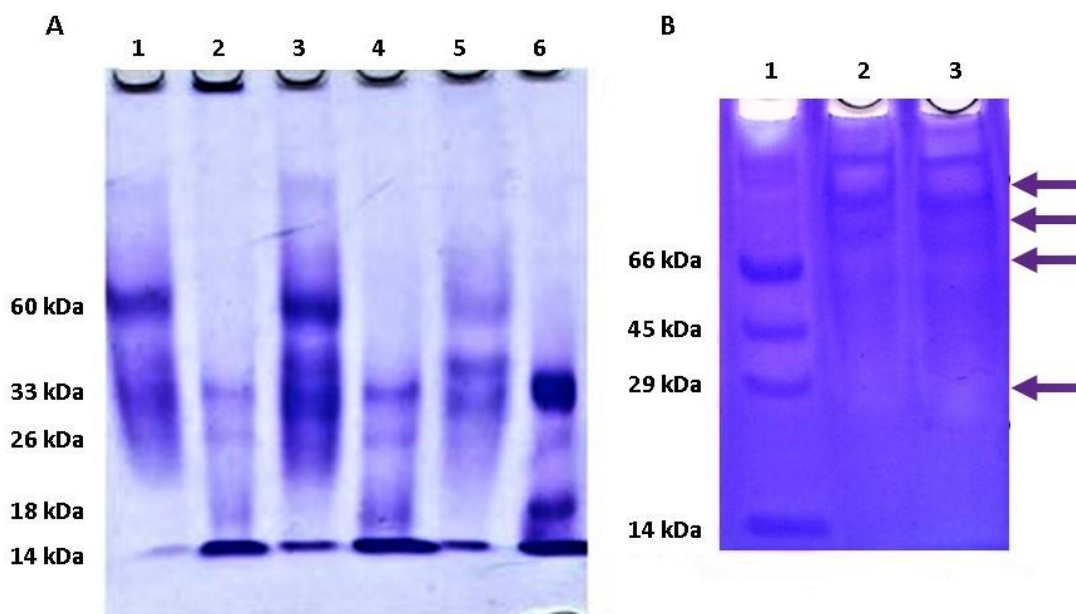
Figura 21- Perfil de elución obtenido de la cromatografía de exclusión molecular realizada al EC<sub>(Ficus)</sub> con Sephadex G-75, a pH 6.4.  $V_0 = 4.5$  mL

En las fracciones 4-6 quedó concentrada el 60 % de la actividad aplicada a la columna. A estas fracciones se les realizó una electroforesis desnaturalizante. Los

perfiles obtenidos para las muestras preparadas con y sin tratamiento térmico se muestran en la figura 22 A.

Comparando el perfil de bandas de las tres muestras preparadas con tratamiento térmico (carriles 2, 4 y 6), no se observan diferencias apreciables entre sí en cuanto al número y tamaño de sus componentes. Las tres fracciones presentan cuatro bandas definidas de 14, 18, 26 y 33 kDa. En la fracción 6 se aprecia un mayor enriquecimiento en las especies de mayor tamaño, pertenecientes a un rango de 30-39 kDa.

La diversidad de tamaños apreciada en cada carril daría la pauta de que en las fracciones estudiadas podrían existir proteínas con estructura cuaternaria.



**Figura 22- Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida de las fracciones 4, 5 y 6 obtenidas a partir de la cromatografía de exclusión molecular con Sephadex G-75. A-** Carriles 1, 3 y 5: fracción 4, 5 y 6 respectivamente, sin tratamiento térmico; carriles 2, 4 y 6: fracción 4, 5 y 6 respectivamente, con tratamiento térmico. A la izquierda del gel se indican los tamaños moleculares correspondientes a las bandas más relevantes. **B-** Gel de poliacrilamida suplementado con 0.2 % de caseína. Carril 1: estándares de tamaño molecular; carriles 2 y 3: fracción 5 y 6 respectivamente, sin tratamiento térmico. Las flechas horizontales a la derecha del gel muestran la posición de las bandas con significativa actividad proteolítica.



En los casos que no se realizó el calentamiento a alta temperatura (carriles impares) se visualizan bandas correspondientes a tamaños moleculares notoriamente mayores, especialmente una banda de aproximadamente 60 kDa, que no aparece cuando la muestra recibió el tratamiento completo (carriles pares). Esto puede explicarse por el hecho de que el calentamiento en baño a ebullición produce la rotura de agregados meta-estables de las proteínas desnaturalizadas, promoviendo así la liberación de unidades independientes.

Con las fracciones 5 y 6 que no recibieron tratamiento térmico se realizó un zimograma en un gel de poliacrilamida conteniendo caseína 0.2 % como sustrato copolimerizado (figura 22 B). Para ambas fracciones se obtuvieron dos bandas principales con actividad proteolítica, visualizadas como zonas claras sobre fondo azul, debido a la hidrólisis de la caseína, una de ellas con tamaño molecular superior a 80 kDa y otras, menos nítidas, en el entorno de los 70, 66 y 20-25 kDa.

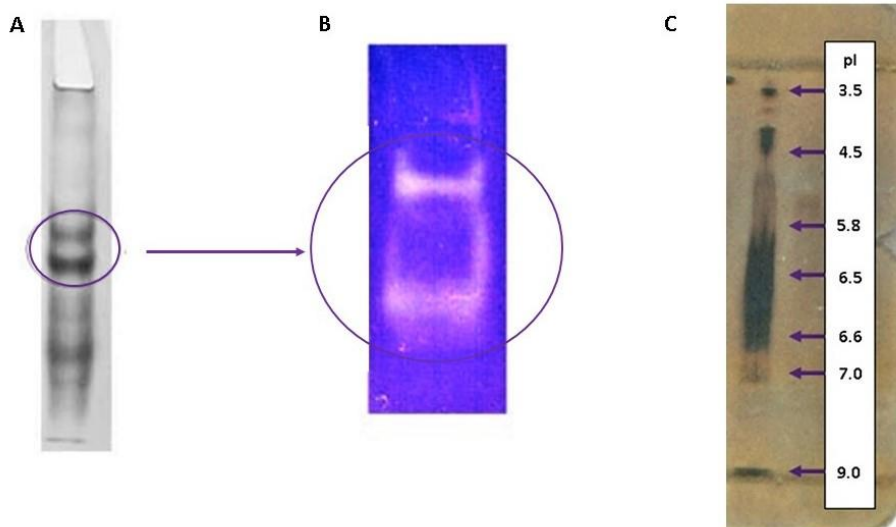
Si bien la ausencia de tratamiento térmico no permite extrapolar con exactitud los tamaños moleculares de subunidades o proteínas monoméricas individuales, sí fue posible detectar la presencia en el EC(*Ficus*) de peptidasas capaces de mantener su actividad en presencia de SDS y agentes reductores.

Se preparó una muestra de siembra (Ms) a partir de un pool compuesto por las fracciones 4-6. Este pool fue liofilizado y luego disuelto como se indica en 3.2.10., analizándose luego por electroforesis en condiciones nativas, zimograma, isoelectroenfoque y espectrometría de masa (MALDI-TOF).

La electroforesis nativa (figura 23 A) mostró un perfil de al menos 11 componentes proteicos, de los cuales los de menor relación carga/radio dieron en el zimograma (figura 23 B) dos bandas muy nítidas sin teñir, evidenciando significativa actividad proteolítica sobre caseína.

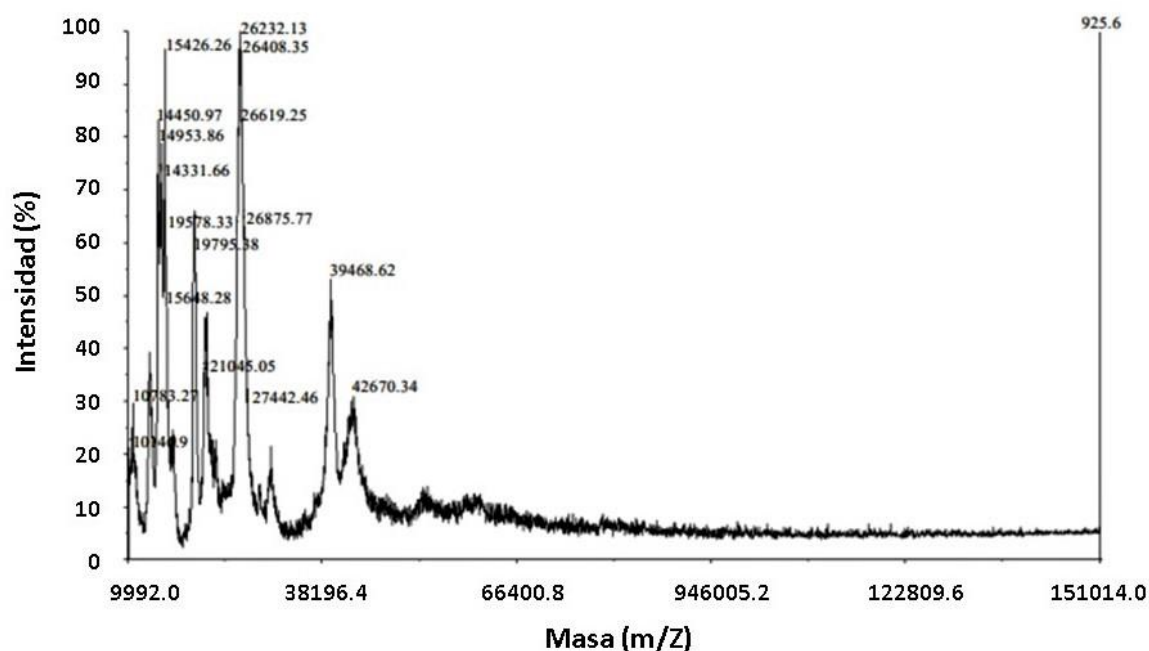
En el isoelectroenfoque (figura 23 C) se obtuvieron al menos 16 bandas, algunas muy próximas entre sí, con una zona de tinción continua extendida entre los pI 5.8 y 6.6 aproximadamente. La mayoría son moléculas de pI ácido, pero también se

aprecia una banda a  $pI=9$  y otra muy tenue a  $pI = 7$ , aunque esta última podría deberse a un artefacto debido a que en ese punto fue realizada la siembra.



**Figura 23- Estudios electroforéticos realizados a Ms.** **A-** Electroforesis en condiciones nativas, a pH 8.6. Las bandas de la electroforesis nativa rodeadas por un círculo son las correspondientes a las que se muestran ampliadas en el zimograma, también circuladas. **B-** Zimograma realizado a partir de la electroforesis en condiciones nativas. **C-** Isoelectroenfoque. Las flechas indican la posición en el gel de los pH correspondientes a los diferentes puntos isoeléctricos.

Los resultados obtenidos con MALDI-TOF (figura 24) revelaron una mezcla de componentes comprendidos en el rango de pesos moleculares entre 10 y 43 kDa, con un pico predominante correspondiente a 26 kDa aproximadamente. La presencia de los componentes de pesos moleculares menores a 20 kDa podría deberse a procesos relacionados al mecanismo de defensa de la planta. Se han reportado proteínas con pesos moleculares inferiores a 14 kDa en extractos de *Carica papaya*, habiéndose comprobado que estas son abundantes en frutos constantemente estresados y en árboles productores (Zare y col., 2013).



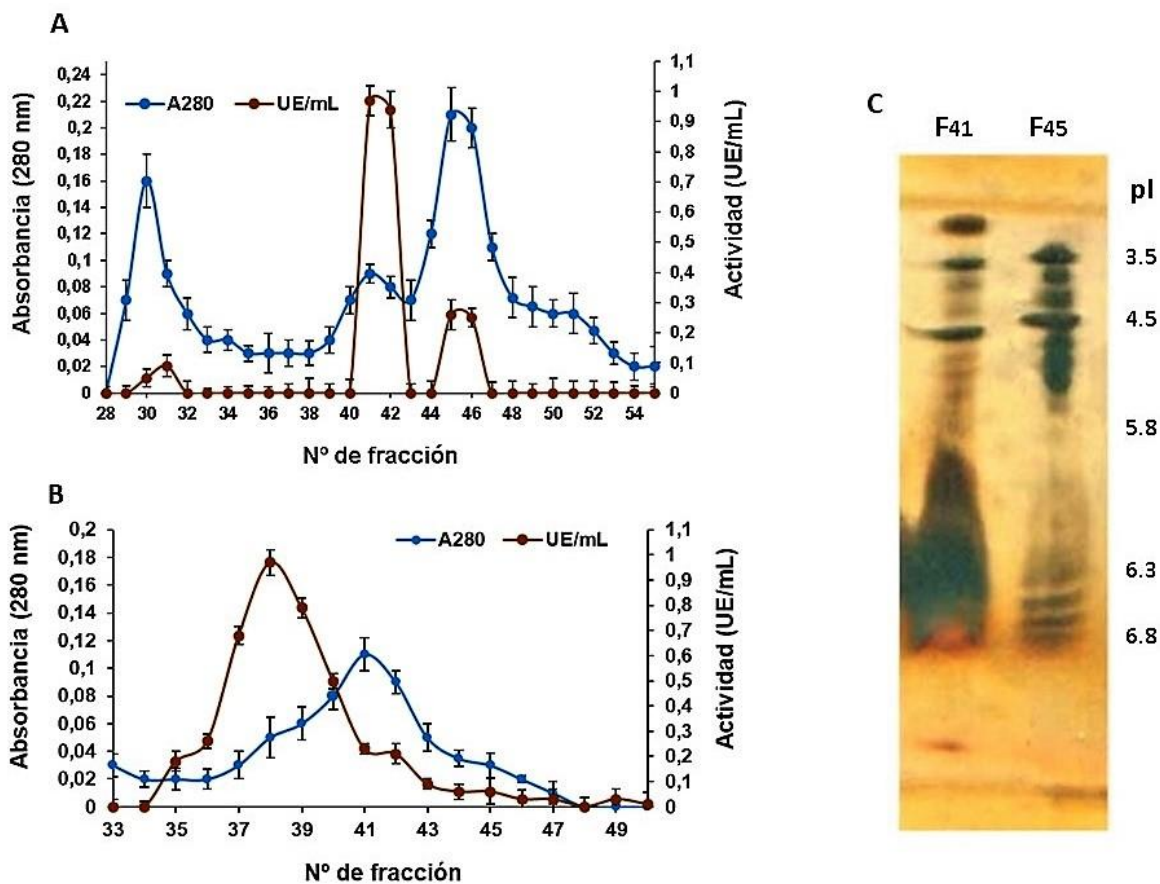
**Figura 24- Espectro correspondiente a la espectrometría de masa (MALDI-TOF) de Ms**

#### 4.2.3- Evaluación de la formación de agregados moleculares dependientes del pH del medio

El amplio rango de pesos moleculares evidenciados con el MALDI-TOF no se corresponde con el hecho de que las tres muestras constituyentes de Ms provienen del mismo pico de una cromatografía de exclusión molecular, por lo que se sugiere la posibilidad de que las especies presentes en las muestras tengan tendencia a la formación de agregados moleculares cuya composición sea dependiente de las condiciones del medio, como, por ejemplo, el pH, lo cual tendría correspondencia con las menores distancias de migración electroforética observadas en la SDS-PAGE para las muestras que no fueron sometidas a tratamiento térmico.

Con la finalidad de comprobar la formación de agregados moleculares de diferente composición según el pH del medio, se realizó al EC(*Ficus*) dos nuevas cromatografías de exclusión molecular a pH 5.5 y 8.4 respectivamente, en una columna HiLoad Superdex 200 grado preparativo, calibrada con estándares de

diferentes tamaños moleculares. Previamente, al extracto se le realizó una separación preliminar con Sephadex G-75, con la finalidad de eliminar en cierto grado algunas impurezas, seguida de una liofilización y posterior disolución de las fracciones con máxima actividad proteolítica, como se detalla en 3.2.10 (resultados no mostrados). Los perfiles de elución obtenidos se muestran en la figura 25 A y B.



**Figura 25- Perfiles de elución del EC(*Ficus*) (previa separación de componentes no deseados), obtenidos en columna HiLoad 16/60 Superdex 200 grado preparativo e isoelectroenfoco de dos fracciones seleccionadas. A- Cromatografía de exclusión molecular realizada a pH 5.5. B- Cromatografía de exclusión molecular realizada a pH 8.4. C- Isoelectroenfoco de las fracciones 41 (F<sub>41</sub>) y 45 (F<sub>45</sub>) obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular a pH 5.5.**

A pH 5.5 se apreciaron tres picos, el primero de los cuales no se correspondió con un nivel significativo de actividad proteolítica y tuvo un volumen de elución correspondiente a 100 kDa, aproximadamente. Las especies activas quedaron

concentradas en los siguientes dos picos, que presentaron volúmenes de elución correspondientes a 67 y 44 kDa respectivamente.

En medio básico se obtuvo una menor resolución de la muestra, observándose un pico de actividad proteolítica de gran amplitud, cuyo punto máximo correspondió a un tamaño molecular de 80 kDa. El perfil de elución fue muy semejante al obtenido con la gel filtración realizada a pH 6.4 (figura 21).

A pH 8.4 los máximos de actividad sufrieron un corrimiento hacia tamaños moleculares mayores, comparado con los obtenidos a pH 5.5. Los valores de actividad alcanzados en la fracción 38 a pH 8.4 fueron los mismos que los obtenidos en la fracción 41 a pH 5.5 ( $0.97 \pm 0.05$  UE/mL).

Similarmente, las fracciones 41 y 42 a pH 8.4, ( $0.23 \pm 0.02$  y  $0.21 \pm 0.05$  UE/mL respectivamente) que forman una especie de hombro o pequeño pico solapado al principal, parecerían corresponderse con las fracciones 45 y 46 a pH 5.5 ( $0.26 \pm 0.05$  y  $0.25 \pm 0.03$  UE/mL respectivamente). De todas maneras, sin estudios adicionales, no es posible asegurar ninguna similitud entre las composiciones de las diferentes fracciones.

Los aumentos de tamaño se encontraron en el orden de los 13-23 kDa, por lo que es probable que las proteínas más pequeñas de la muestra sean las responsables de formar agregados con las especies predominantemente activas. Esto explicaría también el hecho de que las especies de aproximadamente 20 kDa que mostraron actividad proteolítica en el zimograma de la figura 22 no se vean representadas en ningún pico de las cromatografías y abre la posibilidad de que algunos de los agregados estén formados por componentes diferentes, ambos con actividad proteolítica.

En el caso de la cromatografía de exclusión realizada a pH 5.5, al estar inhibida la agregación, probablemente estas especies de menor tamaño quedaron excluidas de las muestras analizadas durante el proceso de depuración preliminar realizado con Sephadex G-75 a ese mismo pH.

A las fracciones 41 y 45 obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular a pH 5.5 se les realizó una SDS-PAGE (con y sin tratamiento térmico) y un zimograma (datos no mostrados). La fracción 41 ( $F_{41}$ ), correspondiente por la gel filtración a un tamaño de 67 kDa, dio como resultado una banda muy definida de 39 kDa cuando se le realizó tratamiento térmico, además de otras muy finas de tamaños menores en el rango de 30-35 kDa.

Debido a que estas últimas no se encontraron representadas en el espectro obtenido con MALDI-TOF, se sugiere que pueden haberse generado por procesos autolíticos a partir de la especie de 39 kDa, en un tiempo posterior a las 48 h de almacenamiento a 7 °C, quedando de algún modo asociadas entre sí y con la proteína original de 39 kDa, generando un tamaño de 67 kDa a pH 5.5. El hecho de que las proteínas de 30-35 y la de 39 kDa sean subunidades constituyentes de una proteína dimerica no tendría sustento por la ausencia de picos en el MALDI correspondientes a las primeras.

Cuando a  $F_{41}$  se la sembró sin haber recibido tratamiento térmico, dio una amplia banda de tamaño mayor a 100 kDa y otras dos bandas más finas de aproximadamente 100 y 39 kDa respectivamente. La banda mayor a 100 kDa mostró en el zimograma intensa actividad proteolítica.

La fracción 45 ( $F_{45}$ ), correspondiente por la gel filtración a un tamaño de 44 kDa, al aplicarse luego del tratamiento térmico exhibió un conjunto de finas bandas en el rango de 42-49 kDa. Debido a la coincidencia entre los tamaños moleculares obtenidos por ambos métodos (gel filtración y SDS-PAGE) se puede inferir que los componentes de esta fracción serían sustancias monoméricas que no sufrieron ningún tipo de agregación a pH 5.5. El hecho de que estas especies, a pesar de estar representadas en un pico del MALDI-TOF, no se hayan visualizado en la PAGE-SDS mostrada en la figura 22 puede deberse a una baja abundancia en las muestras en las fracciones analizadas, lo cual explicaría también la altura del pico de actividad a pH 5.5.

Sin tratamiento térmico se obtuvieron dos bandas de 100 y 80 kDa respectivamente, con actividad proteolítica en el zimograma.

A estas mismas fracciones se les realizó un isoelectroenfoque (figura 25 C). Puede observarse que ambas fracciones presentan un enriquecimiento diferencial en cuanto al punto isoeléctrico de sus componentes, ya que en F<sub>41</sub> hay una predominancia de componentes de pI mayor a 5.8 y en F<sub>45</sub>, por el contrario, están más concentradas las especies de pI menores a este valor. En ambos casos el perfil de bandas denota una muestra de múltiples componentes, con una zona especialmente compleja a la altura de los mayores puntos isoeléctricos de F<sub>41</sub>, de aspecto similar a lo obtenido en el isoelectroenfoque de Ms (figura 23 C).

El hecho de que una muestra presente diferentes perfiles de elución al ser aplicada a una misma columna equilibrada con distintos pH da idea de que el medio es determinante en buen grado de los tamaños de sus componentes, promoviendo en algunos casos la formación de agregados de diversa constitución, lo cual estaría relacionado con la carga de las especies. El pH ácido (5.5) fue el menos favorable para la formación de agrupamientos moleculares, mientras que a pH alcalino (8.4) los diversos componentes de la muestra tendieron a asociarse eluyendo en un solo pico.

Esto se corresponde además con el gran número de bandas apreciables en los isoelectroenfoces y SDS-PAGE realizadas a fracciones específicas obtenidas de las cromatografías de exclusión molecular. En el caso de las electroforesis desnaturalizantes que se muestran en la figura 22, es altamente improbable que la gran multiplicidad de bandas sea explicable solamente por la presencia en las muestras de proteínas con estructura cuaternaria.

Otro aspecto a tener en cuenta para explicar la compleja composición de las muestras es la posible presencia simultánea de varias isoformas de una misma enzima, lo cual ha sido reportado para extractos de diferentes especies de *Ficus.*, como *F. carica* y *F. glabrata* (Lynn y Clevette-Radford, 1986). Milošević y col. (2020) explicaron las dificultades que a lo largo de décadas ha habido para la separación e identificación de ficinas de *Ficus carica*, debido a las múltiples formas que estas presentan. Estudios transcriptómicos han sugerido la existencia de al menos 11 isoformas de esta enzima.

Los datos reportados de isoformas de *Ficus carica* que han podido aislarse muestran que estas pueden tener tamaños moleculares muy diferentes. Por ejemplo, las isoformas A y B tienen 47.2 y 48.6 kDa respectivamente, mientras que las C y D 25.1 y 24.5 kDa respectivamente (Aider. M., 2021). Si a este hecho se suma la posibilidad de formación de agregados constituidos por diferentes cantidades y combinaciones de estas moléculas, incluyendo tal vez otras proteínas no enzimáticas presentes también en los extractos, aumenta considerablemente la dificultad para resolver las muestras.

#### 4.2.4- Fraccionamiento del EC<sub>(Ficus)</sub> por intercambio iónico

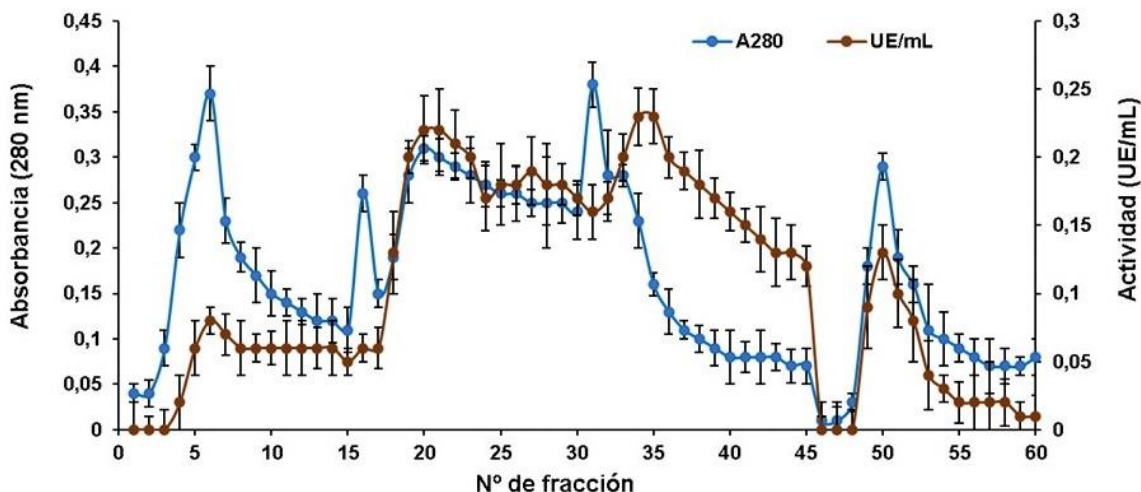
El EC<sub>(Ficus)</sub> (1.6 UE/mL y actividad específica de 0.15 UE/mg) se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico utilizando DEAE Sephadex A-50 a pH 6.4, como se describe en la sección 3.2.15. El perfil de elución obtenido se muestra en la figura 26. El percolado contuvo el 55 % de las proteínas aplicadas y no presentó actividad proteolítica, por lo que se pudo deducir que las peptidasas del extracto tendrían puntos isoeléctricos ácidos.

Se calcularon las UE presentes en cada fracción, que sumadas dieron un total de 9.6, lo cual corresponde a una recuperación global del 60 % de las aplicadas al intercambiador.

En las primeras fracciones, eluidas en presencia de NaCl 0.2 M, puede apreciarse un pico con baja actividad proteolítica, que no retorna a los niveles basales antes del comienzo de la elución del segundo, el cual es seguido por una zona de muy baja resolución integrada por las fracciones que presentan los valores más altos de actividad. Esta región, constituida por el solapamiento de varios picos, probablemente se corresponde con la elución de las especies de la zona de puntos isoeléctricos mayores a 5.8 que se visualiza en los isoelectroenfocos de Ms (figura 23 C) y de F<sub>41</sub> (figura 25 C).

Por último, se aprecia un pico bien definido que eluyó cuando la concentración de NaCl fue 1.0 M y que se correspondería con los componentes de menor pI del extracto.





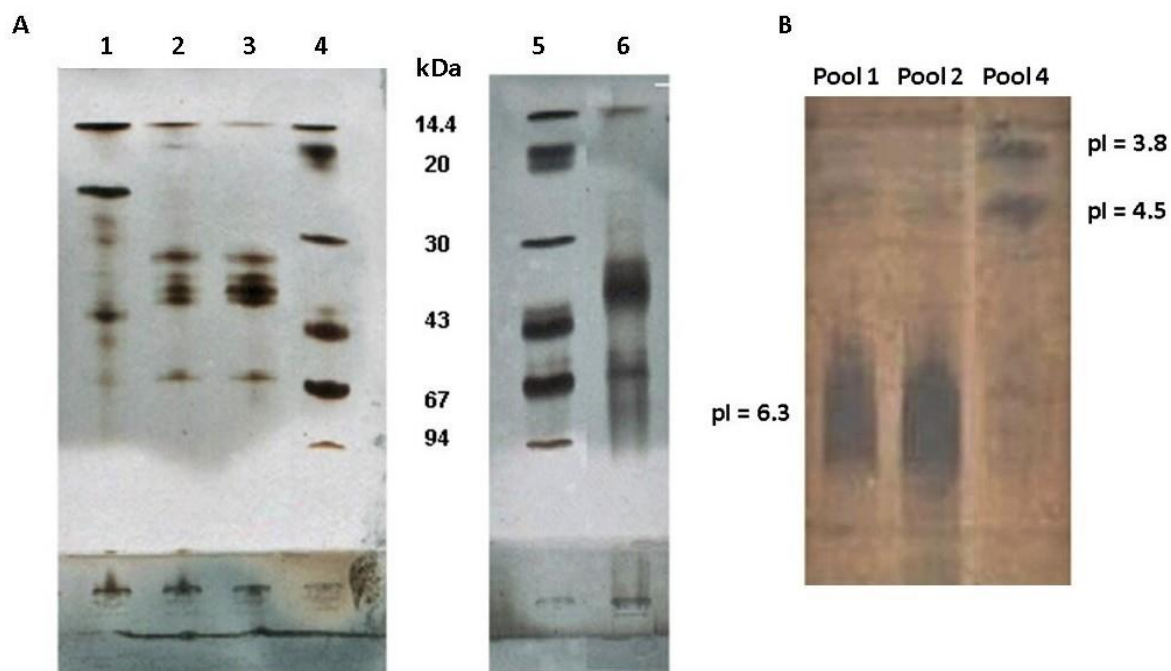
**Figura 26- Diagrama de elución correspondiente a un intercambio iónico del EC(*Ficus*), realizado aplicando 10.0 mL de extracto (1.6 UE/mL, AE = 0.15 UE/mg) a 5.0 mL de DEAE Sephadex A-50, a pH 6.4. Se eluyó con buffer fosfato 50.0 mM pH 6.4 suplementado con NaCl 0.2 M (fracciones 1-15), 0.3 M (fracciones 16- 30), 0.4 M (fracciones 31- 45) y 1.0 M (fracciones 46- 60).**

Con las fracciones 5-8, 19-22, 33-36 y 49-52 se realizaron cuatro pools, conteniendo cada uno el 2.6, 8.0, 8.0 y 3.7 % de las UE totales aplicadas, respectivamente. Los cuatro pools fueron desalados, liofilizados y disueltos, tal como se detalla en 3.2.11. A las muestras resultantes, denominadas pool 1, 2, 3 y 4 respectivamente, se les realizó PAGE-SDS e isoelectroenfoque. Los resultados se muestran en la figura 27.

Tal como sucedió en anteriores electroforesis, se observaron numerosas bandas en cada carril del gel (figura 27 A). En todos los casos se apreció una banda de 14 y otra de 60 kDa, pero en el pool 1 se observaron componentes de aproximadamente 22, 25, 29, 43 y 49 kDa, que no fueron visibles en los otros carriles.

Los resultados del pool 2 y 3 revelaron una distribución de tamaños moleculares que no presentó diferencias apreciables entre ambos, con excepción de una fina banda de PM 17.3, que aparece solamente en el pool 2. Este hecho sugiere que se dio una elución dificultosa de estos componentes, de tamaños entre 17 y 40 kDa, que comenzó a concentraciones de NaCl de 0.3 M y continuó a 0.4 M, abarcando un total de al menos 18 fracciones (19-36). Destacan aquí especies de 32-40 kDa,

lo cual es concordante con los estudios anteriores, en los cuales las proteínas de aproximadamente 39 kDa se encontraron siempre en las fracciones de mayor actividad proteolítica.



**Figura 27- Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida e isoelectroenfoque de muestras obtenidas a partir de las fracciones de mayor actividad proteolítica de cada pico resultante del intercambio iónico del EC(*Ficus*). A- PAGE-SDS. Carriles 1, 2, 3 y 6: pool 1, 2, 3 y 4 respectivamente; carriles 4 y 5: estándares de tamaño molecular. B- Isoelectroenfoque de pool 1, 2 y 4.**

El resultado del isoelectroenfoque (figura 27 B) para el pool 2 fue concordante con lo que se obtuvo a partir de los perfiles de elución diferenciales en función del pH obtenidos por cromatografía de exclusión molecular, en los cuales F<sub>41</sub>, que exhibió los mayores niveles de actividad, fue la fracción en la que quedaron concentrados los componentes de mayor pI del extracto.

El pool 4, además de las bandas de 14 y 60 kDa en común con los otros, presentó una ancha banda que abarcó tamaños entre 32 y 42 kDa. Estas especies, a pesar de poseer, en conjunto, tamaños similares a las presentes en los pooles 2 y 3, los

resultados del isoelectroenfoque (figura 26 B) marcaron una gran diferencia, ya que si bien los pooles 1 y 2 aparecieron constituidos por una compleja zona de pI en el entorno de 6.3, en el pool 4 se visualizaron solamente componentes de pI 3.8 y 4.5.

El hecho de que las fracciones que constituyeron los pooles 2 y 3 fueron las que rindieron mayores valores de actividad proteolítica y a la vez las que presentaron los perfiles de más difícil resolución, tanto en el diagrama de elución del intercambio iónico como en el isoelectroenfoque, permitió suponer que están constituidas por especies activas con tendencia a formar asociaciones que dificultan la resolución por diferencia de cargas.

La zona extensa y continua que se reveló en el isoelectroenfoque de estos pooles abarcó un rango de puntos isoeléctricos que llegó, en el límite superior, hasta un valor cercano a 6.7. El que en un intercambio iónico aniónico a pH 6.4 se adsorban especies con puntos isoeléctricos iguales y superiores al pH del medio, con fuerza tal que su desorción involucró un gran volumen de buffer, en lugar de obtenerse en los primeras fracciones de eluido, como sería de esperar por la proximidad del valor del pI con el del pH del medio, reafirmaría la idea de que estos componentes están ligados de alguna manera con otros de pI menor, de manera que, en lugar de encontrarse en el percolado, fueron retenidos en la matriz por arrastre conjunto.

La agregación de especies proteicas también puede contribuir a su estabilidad, debido a un efecto de amortiguamiento frente a choques, torsiones y movimientos vibracionales que pueden destruir la estructura terciaria provocando la inactivación de las enzimas. Esto podría explicar la alta termoestabilidad exhibida por el EC<sub>(Ficus)</sub>, especialmente a pH 6.5. Cabe destacar que los pools 1-4 mantuvieron el 100 % de su actividad luego de 5 días de almacenamiento a 7 °C.

Integrando la información obtenida del MALDI-TOF y de los experimentos de cromatografía de exclusión molecular, intercambio iónico, PAGE-SDS e isoelectroenfoque, se puede proponer que las especies de mayor incidencia en la actividad proteolítica del EC<sub>(Ficus)</sub> tienen tamaños moleculares de aproximadamente 39 kDa, son monoméricas y tienen tendencia a formar asociaciones con componentes no proteolíticos de bajo peso molecular. Sus puntos isoeléctricos

estarían en el entorno de 6.3, con la posibilidad de existencia de algunas peptidasas también de aproximadamente 39 kDa con pI menores o iguales a 4.5, que podrían estar presentes en el pool 4 del intercambio iónico.

Existirían en el extracto, además, peptidasas con pesos moleculares en el entorno de los 42 kDa, monoméricas, de puntos isoeléctricos menores a 5, también con tendencia a formar agregados, pero que podrían encontrarse en forma libre a pH 5.5.

Por último, especies de 20-25 kDa, exhibieron también actividad proteolítica y pI en el entorno de 6.3 (en el intercambio iónico eluyeron en las fracciones constituyentes del pool 1). De todas maneras, son necesarios estudios adicionales para poder confirmar todas estas hipótesis.

### 4.3- HIDRÓLISIS DE SUEROS LÁCTEOS

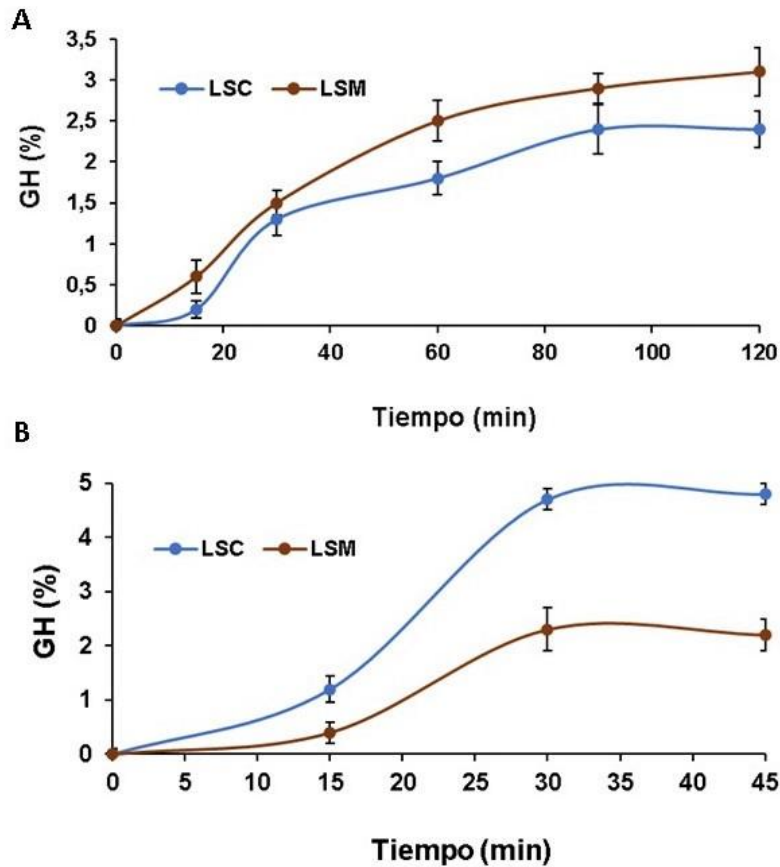
Se evaluó la capacidad de los extractos para hidrolizar el contenido proteico de sueros lácteos. Para esto se trabajó con lactosuero derivado de la producción de queso Mozzarella (LSM), y con el suero resultante de la precipitación de la caseína a pH ácido (LSC). Las condiciones iniciales de pH y concentración proteica de estos lactosueros fueron pH 6.7 y 7.4 mg/mL para LSM y pH 4.5 y 6.2 mg/mL para LSC. Previo a su utilización, la concentración de ambos fue normalizada a 6.0 mg/mL y los pH a los valores requeridos para los diferentes ensayos, tal como se describe en 3.2.13.

Un mayor procesamiento del sustrato posibilita la obtención de productos de menor tamaño, lo cual es uno de los determinantes en la búsqueda de bioactividad, especialmente en el caso de actividad antioxidante. Teniendo en cuenta los resultados de los estudios de estabilidad en función de la temperatura, se trabajó a 50 °C, ensayándose varios pH y relaciones enzima /sustrato (E/S) para cada lactosuero, de manera de encontrar el set de condiciones más favorable para la obtención de los mayores grados de hidrólisis.

La figura 28 muestra las curvas de hidrólisis obtenidas por acción de cada extracto sobre ambos lactosueros. A pesar de que la curva del LSM por acción del  $EC_{(Ficus)}$  se aprecia por encima de la obtenida con LSC, la diferencia de valores entre ambas no es significativa. Cuando se trabajó con  $EC_{(Araujia)}$ , en cambio, el avance de reacción fue notoriamente mayor sobre LSC que sobre LSM.

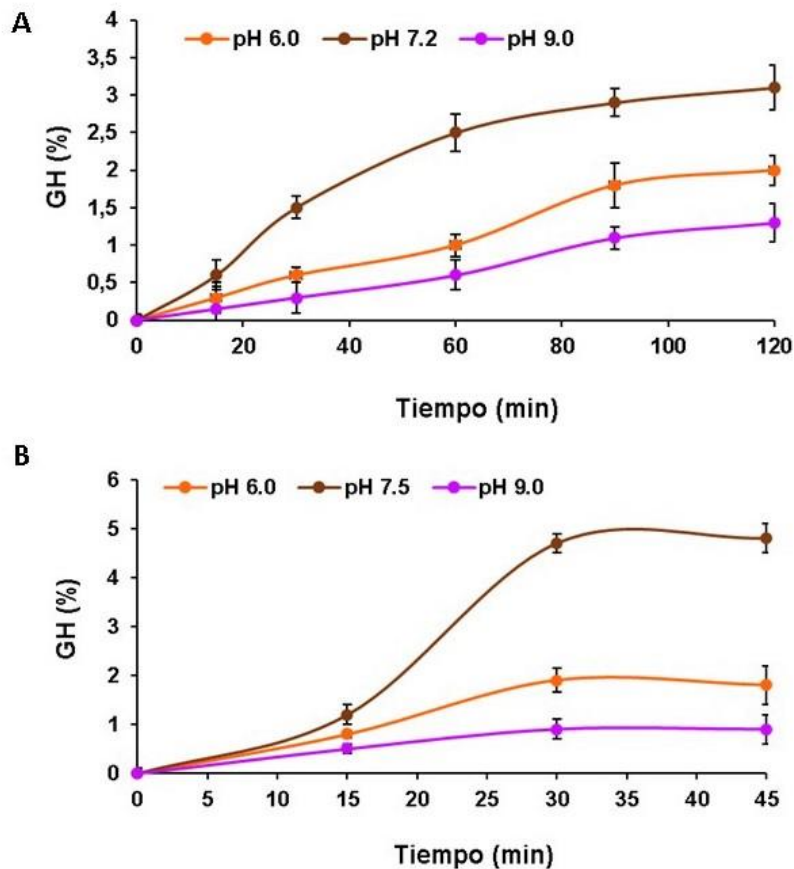
En el caso del  $EC_{(Ficus)}$ , al cabo de 120 min se alcanzaron grados de hidrólisis de  $3.1 \pm 0.3$  y  $2.4 \pm 0.2$  % sobre LSM y LSC respectivamente, utilizando una E/S de 0.01 UE/mg a pH 7.2 (figura 28 A). Cuando se trabajó con  $EC_{(Araujia)}$  fueron necesarias E/S considerablemente mayores para obtener GH del orden de los obtenidos con  $EC_{(Ficus)}$ . A pH 7.5 y E/S = 0.2, a los 30 min de reacción se obtuvieron GH de  $2.3 \pm 0.4$  y  $4.7 \pm 0.2$  % sobre LSM y LSC respectivamente (figura 28 B). No se alcanzaron valores significativamente más altos de GH para esos mismos tiempos de reacción, cuando se utilizó una E/S de 0.02 UE/mg en el caso de  $EC_{(Ficus)}$  y de 0.3 UE/mg en el caso de  $EC_{(Araujia)}$ . Para este último extracto, con una E/S de 0.1 UE/mg se

lograron GH máximos de  $1,5 \pm 0,2$  y  $2,8 \pm 0,3$  utilizando LSM y LSC respectivamente (datos no mostrados).



**Figura 28- Curvas de hidrólisis a 50 °C de lactosueros de Mozzarella y caseinería con una concentración de proteínas de 6.0 mg/mL. A- Hidrólisis con EC(Ficus) a pH 7.2 y E/S 0.01 UE/mg. B- Hidrólisis con EC(Araujia) a pH 7.5 y E/S 0.2 UE/mg.**

Se estudió la influencia del pH sobre la reacción hidrolítica, tomando como referencia las curvas obtenidas con EC(Ficus) sobre LSM y con EC(Araujia) sobre LSC. En la figura 29 se aprecia que para ambos extractos un medio neutro resultó el más favorable para la hidrólisis, comparado con las reacciones a pH 6.0 y 9.0, siendo esto consistente con los valores de pH óptimo obtenidos para el EC(Ficus) y los reportados para el EC(Araujia) por Priolo y col. (2001), utilizando azocaseína o caseína como sustrato, respectivamente, y detallados en el ítem 4.1.3.



**Figura 29- Curvas de hidrólisis a 50 °C y diferentes pH de lactosueros de Mozzarella y caseinería con una concentración de proteínas de 6.0 mg/mL. A- Hidrólisis de LSM con  $EC_{(Ficus)}$  (E/S = 0.01 UE/mg). B- Hidrólisis de LSC con  $EC_{(Araujia)}$  (E/S= 0.2 UE/mg).**

También es de considerar que, como se observó en los estudios detallados en 4.1.4., la actividad remanente de los ECs fue decreciendo paulatinamente durante los intervalos de tiempo en que transcurrieron los procesos hidrolíticos sobre los lactosueros (120 min cuando se utilizó  $EC_{(Ficus)}$  y 45 min con  $EC_{(Araujia)}$ ). Esto fue más marcado en el caso del  $EC_{(Ficus)}$ . Para ambos extractos, la actividad se mantuvo más estable a pH neutro y sufrió un mayor descenso a pH básico (figura 19). De todas maneras, las diferencias entre los entornos moleculares en que se hallaban los extractos en los estudios mencionados y los del proceso hidrolítico pueden hacer que las respectivas estabilidades también se vean modificadas.

De acuerdo con los resultados obtenidos, las condiciones de hidrólisis seleccionadas para la generación de péptidos bioactivos fueron pH 7.2 y E/S = 0.01 UE/mg en el caso del EC<sub>(Ficus)</sub> y pH 7.5 y E/S = 0.2 UE/mg cuando se utilizó EC<sub>(Araujia)</sub>. Para ambos la temperatura fue 50 °C.

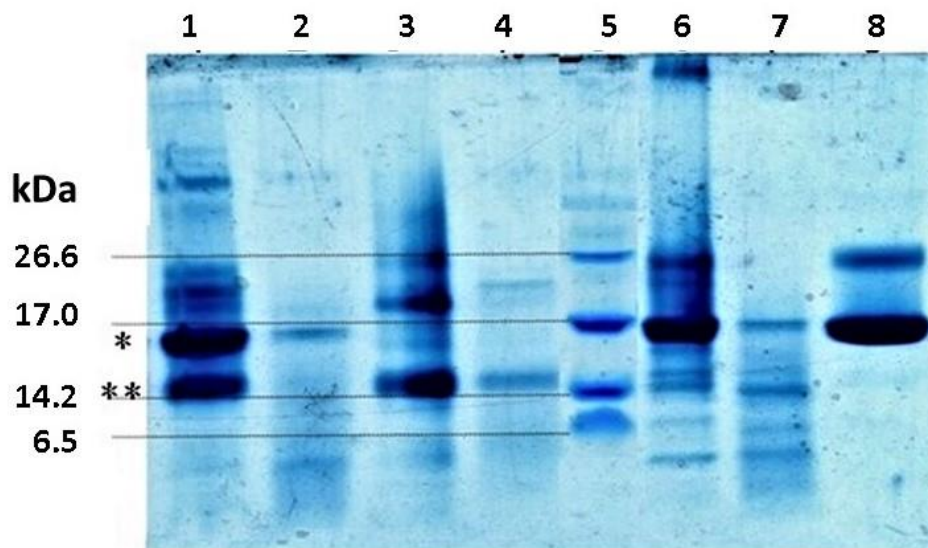
Se realizaron hidrólisis de las proteínas mayoritarias del lactosuero ( $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactalbúmina) con EC<sub>(Araujia)</sub>, en las mismas condiciones seleccionadas anteriormente. Las fracciones de hidrolizado obtenidas después de 0 y 30 min de reacción fueron evaluadas por SDS-PAGE, bajo las condiciones detalladas en el ítem 3.2.14. El perfil de bandas obtenido se muestra en la figura 30.

Debido a que la concentración del lactosuero utilizado fue ajustada a 6.0 mg/mL, las soluciones de las proteínas aisladas se prepararon en concentraciones de 3,0 y 1.5 mg/mL respectivamente, con la finalidad de respetar las abundancias relativas a las que normalmente se encuentran (50 y 25 % aproximadamente). De esta manera, las bandas proteicas correspondientes a  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina en el suero (tiempo cero, carril 1) corresponden a cantidades equivalentes en los carriles de cada proteína aislada (carriles 3 y 6, respectivamente).

Se puede apreciar que tanto la  $\alpha$ -lactalbúmina como la  $\beta$ -lactoglobulina fueron blanco de las enzimas proteolíticas del extracto. En el carril 8 se sembró una solución de  $\beta$ -lactoglobulina a la que no se le agregó extracto enzimático para distinguir, en comparación con el carril 6, las bandas correspondientes a las proteínas propias de este.

Estudios similares realizados con EC<sub>(Ficus)</sub> no evidenciaron cambios apreciables en el perfil de bandas electroforéticas (resultados no mostrados). Esto podría deberse a que los enlaces peptídicos clivados están distribuidos de manera tal que se obtienen como productos finales, además de pequeños péptidos, grandes fragmentos de proteína cuya diferencia de tamaño con la proteína sin hidrolizar no es distinguible por medio de este tipo de análisis.





**Figura 30-** Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida con tricina, de lactosero de caseinería (6.0 mg/mL) y soluciones de  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina (1.5 y 3.0 mg/mL respectivamente), a 0 y 30 min de reacción utilizando  $EC_{(Araujia)}$ . Condiciones de hidrólisis: pH 7.5, 50 °C, E/S = 0.2 UE/mg. Carriles 1 y 2: lactosero a 0 y 30 min de reacción respectivamente; carriles 3 y 4:  $\alpha$ -lactalbúmina a 0 y 30 min de reacción respectivamente; carril 5: marcadores de peso molecular; carriles 6 y 7:  $\beta$ -lactoglobulina a 0 y 30 min de reacción respectivamente; carril 8: solución de  $\beta$ -lactoglobulina sin agregado de extracto enzimático. Las marcas (\*) y (\*\*) indican la posición de las bandas de  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactalbúmina respectivamente.

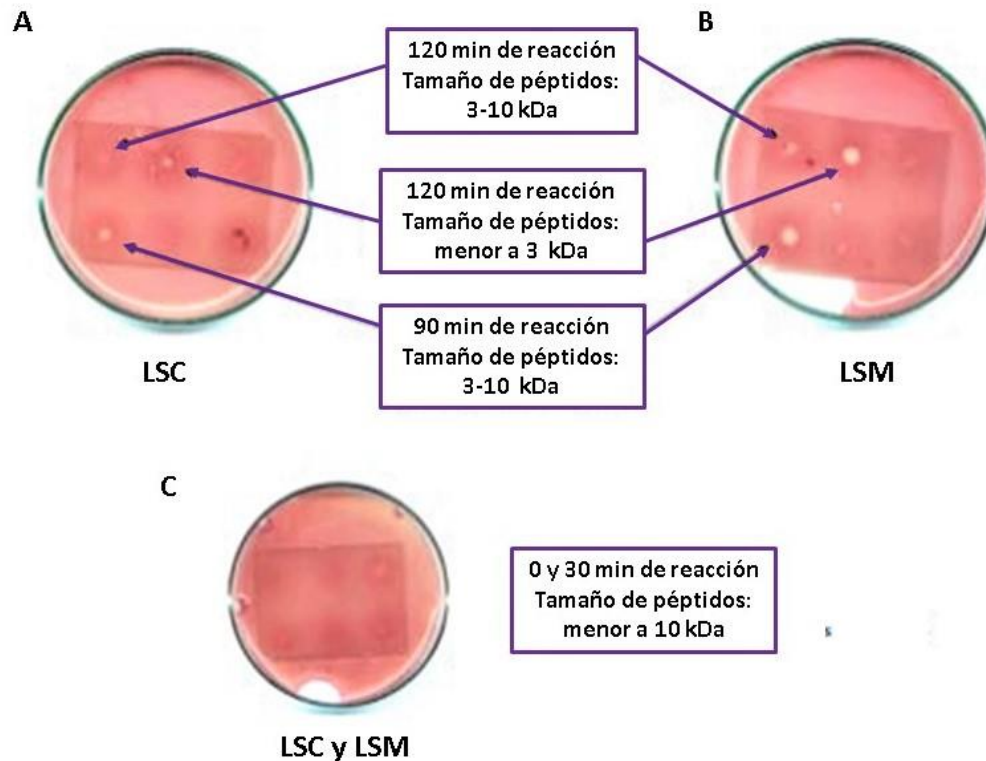
#### 4.4- OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

Los hidrolizados de los lactosueros de caseinería (LSC) y Mozzarella (LSM) obtenidos a diferentes tiempos por la acción del EC<sub>(Ficus)</sub> y el EC<sub>(Araujia)</sub>, en las condiciones de reacción seleccionadas, fueron evaluados en su capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano. Todas las alícuotas de hidrolizado fueron fraccionadas por ultrafiltración para obtener muestras menos complejas y enriquecidas en los péptidos de interés. Se utilizaron filtros de centrífuga con cortes de masa de 3 y 10 kDa, de forma secuencial como se describe en 3.2.16. De esta manera se obtuvieron fracciones enriquecidas en péptidos menores a 3 kDa, entre 3 y 10 kDa y mayores a 10 kDa, denominadas LSC<sub><3</sub>, LSC<sub>3-10</sub>, LSC<sub>>10</sub> o LSM<sub><3</sub>, LSM<sub>3-10</sub>, LSM<sub>>10</sub>, respectivamente.

Ninguna de las fracciones obtenidas mostró efectos antimicrobianos apreciables con *E. coli* como cepa de referencia. Por el contrario, algunas de ellas presentaron actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*.

Las fracciones menores a 10 kDa de los hidrolizados de ambos lactosueros obtenidos a los 90 y 120 min de reacción con EC<sub>(Ficus)</sub>, produjeron inhibición del crecimiento de una cepa de *S. aureus*. Los halos de inhibición obtenidos por bioautografías se muestran en la figura 31. Se aprecia que el efecto inhibitorio fue más marcado en los hidrolizados provenientes de LSM. Para ambos lactosueros, cuando se hidrolizaron durante 90 min, la acción antimicrobiana sólo se encontró en las fracciones enriquecidas con péptidos entre 3 y 10 kDa. Luego de 120 min este efecto se desplazó principalmente a las que contenían péptidos menores a 3 kDa.

Esto podría explicarse considerando que algunos de los productos antimicrobianos obtenidos durante los primeros 90 min de hidrólisis pudieron haber continuado su degradación proteolítica con el avance del tiempo de reacción, generándose así moléculas más pequeñas con acción antimicrobiana más potente.



**Figura 31- Bioautografías obtenidas con cepa de *S. aureus*, utilizando como agente inhibidor hidrolizados de lactosueros de caseinería y Mozzarella obtenidos con *EC(Ficus)*, a los 90 y 120 min de reacción. Condiciones de hidrólisis: pH 7.2, 50 °C, E/S = 0.01 UE/mg. Cada placa tiene 6 siembras, que se enumeran para cada caso de izquierda a derecha, primero la fila superior y luego la inferior. **A-** Resultados de: LSC<sub>3-10</sub> y LSC<sub><3</sub> obtenidos a los 120 min de reacción; LSC<sub>3-10</sub> obtenido a los 60 min de reacción; LSC<sub>3-10</sub> y LSC<sub><3</sub> obtenidos a los 90 min de reacción; LSC<sub><3</sub> obtenidos a los 60 min de reacción. **B-** Resultados de: LSM<sub>3-10</sub> y LSM<sub><3</sub> obtenidos a los 120 min de reacción; LSM<sub>3-10</sub> obtenido a los 60 min de reacción; LSM<sub>3-10</sub> y LSM<sub><3</sub> obtenidos a los 90 min de reacción; LSM<sub><3</sub> obtenido a los 60 min de reacción. **C-** Resultados de: LSM<sub>3-10</sub> y LSM<sub><3</sub> obtenidos a tiempo cero; LSM<sub>3-10</sub> obtenido a los 30 min de reacción; LSC<sub>3-10</sub> y LSC<sub><3</sub> obtenidos a tiempo cero; LSC<sub>3-10</sub> obtenido a los 30 min de reacción.**

La figura 31 C muestra el resultado obtenido al aplicar en la placa fracciones menores a 10 kDa, obtenidas a 0 y 30 min de reacción para ambos lactosueros. La ausencia de halos de inhibición permite comprobar que no hubo efecto antimicrobiano debido a otros factores ajenos al proceso hidrolítico. En la figura no se muestran las siembras correspondientes a LSC<sub><3</sub> y LSM<sub><3</sub> obtenidos a los 30 min de reacción, cuyos resultados fueron también negativos.

Tampoco hubo resultados positivos para las fracciones que contenían péptidos mayores a 10 kDa (resultados no mostrados). Si bien se esperaba encontrar actividad antimicrobiana debido a la lactoferrina (Recio y Visser, 2000), su baja proporción en el lactosuero bovino (1-2 %) y la dilución resultante de los procesos realizados, podrían haber hecho que su actividad fuera indetectable. Por otra parte, esta proteína pudo haber sido hidrolizada por las peptidasas utilizadas. Se comprobó así que el proceso hidrolítico del lactosuero, realizado con EC<sub>(Ficus)</sub>, incrementó notoriamente el potencial antimicrobiano del material de partida.

La evaluación bioautográfica de la capacidad antimicrobiana de las fracciones de hidrolizado obtenidas con EC<sub>(Araujia)</sub> también dio como resultado halos de inhibición de crecimiento de *S. aureus*, pero, en este caso, solamente cuando se aplicó la fracción LSC<sub><3</sub> obtenida a los 15 min de reacción (figura 32).



**Figura 32- Bioautografía obtenida con cepa de *S. aureus*, utilizando como agente inhibidor hidrolizados obtenidos con EC<sub>(Araujia)</sub> sobre lactosuero de caseinería. Condiciones de hidrólisis: pH 7.5, 50 °C, E/S = 0.2 UE/mg. La placa tiene 4 siembras que se enumeran de izquierda a derecha, primero la fila superior y luego la inferior: LSC<sub>3-10</sub> y LSC<sub><3</sub> obtenidos a tiempo cero; LSC<sub>3-10</sub> y LSC<sub><3</sub> obtenidos luego de 15 min de reacción.**

Debido a que este resultado correspondió a la zona de la curva de hidrólisis que presenta una alta variabilidad de los grados de hidrólisis en función del tiempo de reacción, los resultados no fueron siempre concordantes en cuanto a este último parámetro, ya que en algunos casos los resultados positivos se obtuvieron cierto tiempo antes o después de los 15 min.

La tabla 6 integra los resultados obtenidos, correlacionando los tiempos de reacción con los grados de hidrólisis a los cuales se obtuvieron efectos antimicrobianos para cada fracción obtenida con el uso de EC<sub>(Ficus)</sub> y EC<sub>(Araujia)</sub>. en ambos lactosueros.

**Tabla 6- Tiempos de reacción y grados de hidrólisis correspondientes a los hidrolizados que presentaron resultados positivos en las bioautografías realizadas con *S. aureus*. Condiciones de hidrólisis: pH 7.2, 50 °C, E/S = 0.01 UE/mg para EC<sub>(Ficus)</sub> y pH 7.5, 50 °C, E/S = 0.2 UE/mg para EC<sub>(Araujia)</sub>. (\*) El número de cruces es representativo del grado de inhibición de crecimiento, en términos cualitativos significando +++: fuerte inhibición, ++: inhibición moderada y + poca inhibición. (\*\*) Tiempo al que con mayor frecuencia la fracción exhibió los resultados expuestos.**

Extracto enzimático	Fracción	Tiempo de reacción (min)	GH (%)	Inhibición del crecimiento*
EC <sub>(Ficus)</sub>	LSC <sub>3-10</sub>	90	2.4 ± 0.3	++
	LSC <sub>&lt;3</sub>	90	2.4 ± 0.3	-
	LSC <sub>3-10</sub>	120	2.4 ± 0.2	+
	LSC <sub>&lt;3</sub>	120	2.4 ± 0.2	++
	LSM <sub>3-10</sub>	90	2.9 ± 0.2	+++
	LSM <sub>&lt;3</sub>	90	2.9 ± 0.2	-
	LSM <sub>3-10</sub>	120	3.1 ± 0.3	++
	LSM <sub>&lt;3</sub>	120	3.1 ± 0.3	+++
EC <sub>(Araujia)</sub>	LSC <sub>3-10</sub>	15	1.2 ± 0.3	-
	LSC <sub>&lt;3</sub>	15 **	1.2 ± 0.3	+++
	LSM <sub>3-10</sub>	15	0.4 ± 0.2	-
	LSM <sub>&lt;3</sub>	15	0.4 ± 0.2	-

Se determinó la concentración peptídica total de las fracciones que tuvieron máxima capacidad antimicrobiana. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 7. Puede apreciarse que la fracción LSM<sub><3</sub> obtenida con el uso del EC<sub>(Ficus)</sub> a los 120 min de reacción contiene una concentración peptídica global de aproximadamente el 22 % que la determinada para LSM<sub>3-10</sub> obtenida a los 120 min, lo cual sugiere que en ella se logró un enriquecimiento preferencial de las especies más bioactivas.

**Tabla 7- Concentración peptídica de las fracciones de los hidrolizados de LSM y LSC obtenidas con EC<sub>(Ficus)</sub> y EC<sub>(Araujia)</sub>, que mostraron mayor actividad antimicrobiana. Condiciones de hidrólisis: pH 7.2, 50 °C, E/S = 0.01 UE/mg para EC<sub>(Ficus)</sub> y pH 7.5, 50 °C, E/S = 0.2 UE/mg para EC<sub>(Araujia)</sub>. (\*) Tiempo al que con mayor frecuencia la fracción exhibió los resultados expuestos.**

Extracto enzimático	Fracción	Tiempo de reacción (min)	Concentración peptídica (mM)
EC <sub>(Ficus)</sub>	LSM <sub>3-10</sub>	90	4.20 ± 0.15
	LSM <sub>&lt;3</sub>	120	0.96 ± 0.10
EC <sub>(Araujia)</sub>	LSC <sub>&lt;3</sub>	15 *	3.6 ± 0.3

A las fracciones LSM<sub>3-10</sub> y LSM<sub><3</sub> de los hidrolizados obtenidos con EC<sub>(Ficus)</sub> luego de 90 y 120 min de reacción respectivamente, se les cuantificó la actividad antimicrobiana en placas de microtitulación, tal como se describe en 3.2.17. Los porcentajes de inhibición del crecimiento obtenidos utilizando la cepa de *S. aureus* fueron de 86 ± 3 % para LSM<sub>3-10</sub> y 94 ± 4 % para LSM<sub><3</sub>.

Estos resultados adquieren especial relevancia por el hecho de que el *S. aureus* es la causa principal de las bacteriemias intrahospitalarias, tanto en América como en Europa, lo cual se hace más grave cuando se trata de cepas resistentes a metilicina, endémicas en muchas instituciones de salud.

Actualmente, el tratamiento de infecciones provocadas por *S. aureus* resistente a metilicina, es la vancomicina, glucopéptido tricíclico de origen bacteriano, pero en

los últimos años han surgido cepas con susceptibilidad reducida a este agente terapéutico (Castellano-González y col., 2020), por lo cual se hace cada vez más necesario el descubrimiento de otras alternativas.

Estudios adicionales son necesarios para determinar la susceptibilidad de cepas de *S.aureus* meticilino resistentes frente a las fracciones antimicrobianas obtenidas en el presente trabajo, así como para dilucidar cuáles de los péptidos presentes en estas son los responsables de dicha bioactividad y en qué concentraciones efectivas la ejercen.

#### 4.5- OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIOXIDANTES

Como primera aproximación para evaluar la capacidad antioxidante de los hidrolizados de lactosueros obtenidos con  $EC_{(Ficus)}$  y  $EC_{(Araujia)}$ , se determinó la capacidad de depuración del radical estable DPPH, evaluando fracciones de diferentes rangos de tamaño ( $LSC_{<3}$ ,  $LSC_{3-10}$ ,  $LSC_{>10}$  o  $LSM_{<3}$ ,  $LSM_{3-10}$ ,  $LSM_{>10}$ ) obtenidas a diferentes tiempos de reacción (incluyendo  $t = 0$  min).

En el caso de las fracciones obtenidas con  $EC_{(Ficus)}$  se obtuvieron resultados positivos para  $LSC_{<3}$  correspondiente a un tiempo de reacción de 120 min, mientras que en el caso de las obtenidas con  $EC_{(Araujia)}$  se evidenció depuración radicalaria con  $LSC_{3-10}$  y  $LSC_{<3}$  obtenidos a los 30 y 90 min. Los resultados se resumen en la tabla 8. Ninguna de las fracciones provenientes de los hidrolizados de lactosuero de Mozzarella evidenció actividad antioxidante.

**Tabla 8- Porcentajes de depuración del DPPH de hidrolizados de lactosuero de caseinería obtenidos con  $EC_{(Ficus)}$  (condiciones de hidrólisis: pH 7.2, 50 °C, E/S = 0.01 UE/mg) y  $EC_{(Araujia)}$  (condiciones de hidrólisis: pH 7.5, 50 °C, E/S = 0.2 UE/mg).**

Extracto enzimático	Fracción	Tiempo de reacción (min)	GH (%)	Depuración del DPPH (%)
$EC_{(Ficus)}$	$LSC_{<3}$	120	$2.4 \pm 0.2$	$22 \pm 0.3$
$EC_{(Araujia)}$	$LSC_{3-10}$	30	$4.7 \pm 0.2$	$20 \pm 0.2$
	$LSC_{<3}$	30	$4.7 \pm 0.2$	$42 \pm 0.4$
	$LSC_{3-10}$	90	$4.8 \pm 0.2$	$15 \pm 0.3$
	$LSC_{<3}$	90	$4.8 \pm 0.2$	$28 \pm 0.2$

Debido a que el DPPH es un radical libre sin correlación biológica, se hace necesario utilizar un método adicional para evaluar la capacidad antioxidante de compuestos con potencial uso en sistemas biológicos. El método ORAC se basa en



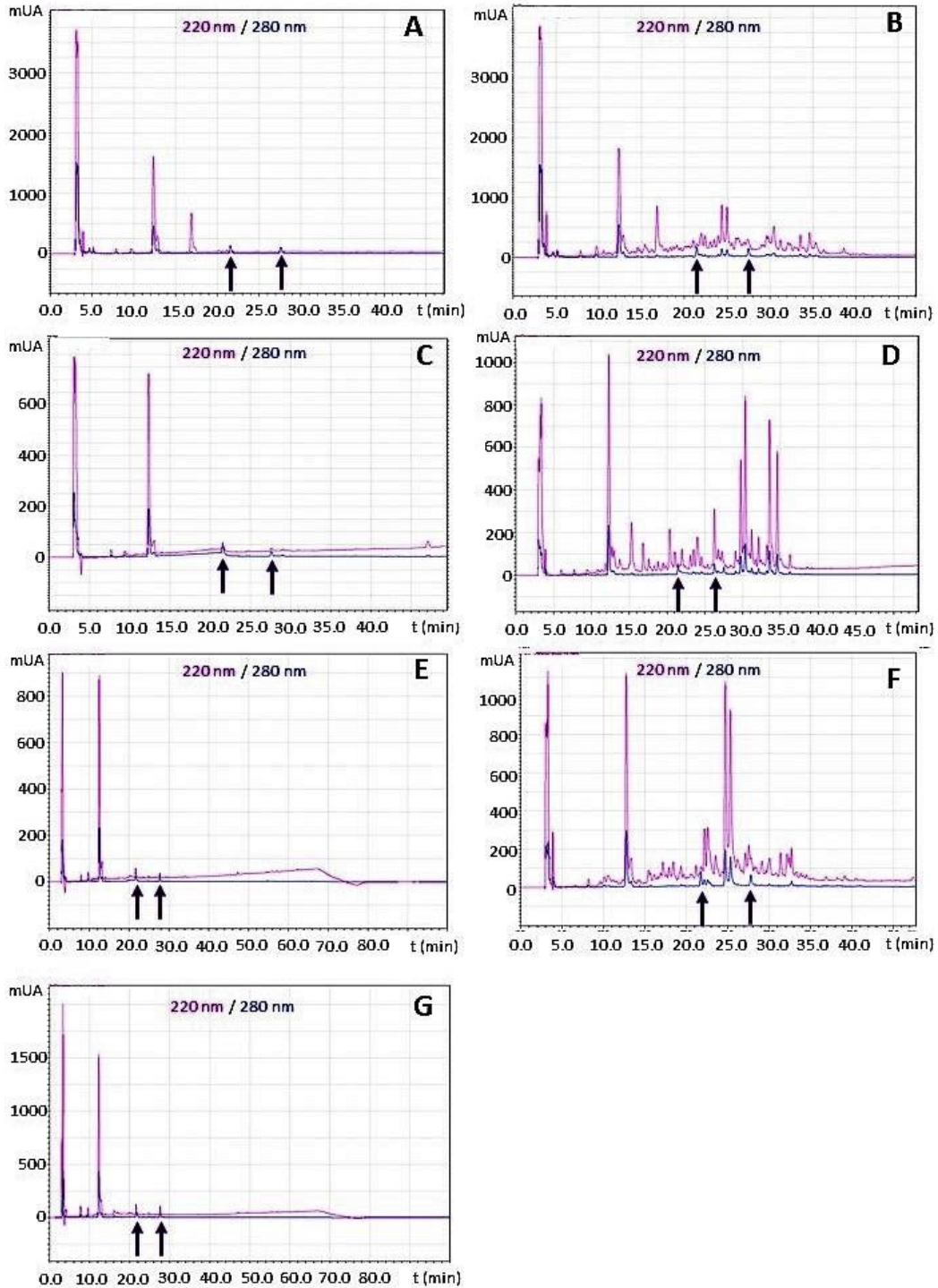
la determinación de la capacidad de una muestra para neutralizar la acción de los radicales libres peroxilo, que son intermediarios comunes en oxidaciones biológicas (p. ej., oxidación de lípidos). Por lo tanto, este fue el método de elección para continuar el estudio con la fracción LSC<sub>3</sub> del hidrolizado obtenido con EC<sub>(Araujia)</sub>, a los 30 min de reacción, comparando los resultados con los de la fracción del mismo rango de tamaño, correspondiente al tiempo cero.

Para poder discriminar entre las fracciones activas y las trazas de clorofila u otros componentes provenientes del extracto capaces de emitir fluorescencia en las condiciones de trabajo (longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 535 nm, respectivamente) y por lo tanto interferir con el método ORAC, se realizó una separación cromatográfica previa de las muestras.

Las fracciones LSC<sub>3</sub> de los hidrolizados obtenidos a 0 y 30 min de reacción fueron separadas por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa. Previamente las fracciones fueron liofilizadas y disueltas en fase móvil A, según se detalla en 3.2.18, obteniendo concentraciones peptídicas finales de  $18.2 \pm 0.2$  mM y  $30.1 \pm 0.3$  mM, respectivamente. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la figura 33 A y B.

El mismo procedimiento se siguió para fracciones de hidrolizados de ALA y BLG (0 y 30 min de reacción) enriquecidos en péptidos menores a 3 kDa, denominados ALA<sub>3</sub> y BLG<sub>3</sub> respectivamente, obtenidos según 3.2.13 y fraccionados como se detalla en 3.2.16. En la figura 33 C y D se aprecian los cromatogramas correspondientes a ALA, mientras que los de BLG se muestran en la figura 33 E y F. La figura 33 G corresponde al cromatograma del EC<sub>(Araujia)</sub>,

De la comparación de los cromatogramas surgieron dos poblaciones, una correspondiente a componentes ya presentes en el material de partida y otra constituida por nuevos picos, atribuibles a la reacción hidrolítica. Los picos de tiempos de retención 3, 8, 9.5, 12, 21.7 y 27.7 min provinieron del EC<sub>(Araujia)</sub>, mientras que el LSC<sub>3</sub> aportó el que se aprecia a los 17 min, que aparece en el cromatograma de LSC<sub>3</sub> (tiempo cero) pero no en los de ALA<sub>3</sub>, BLG<sub>3</sub> o EC<sub>(Araujia)</sub>.

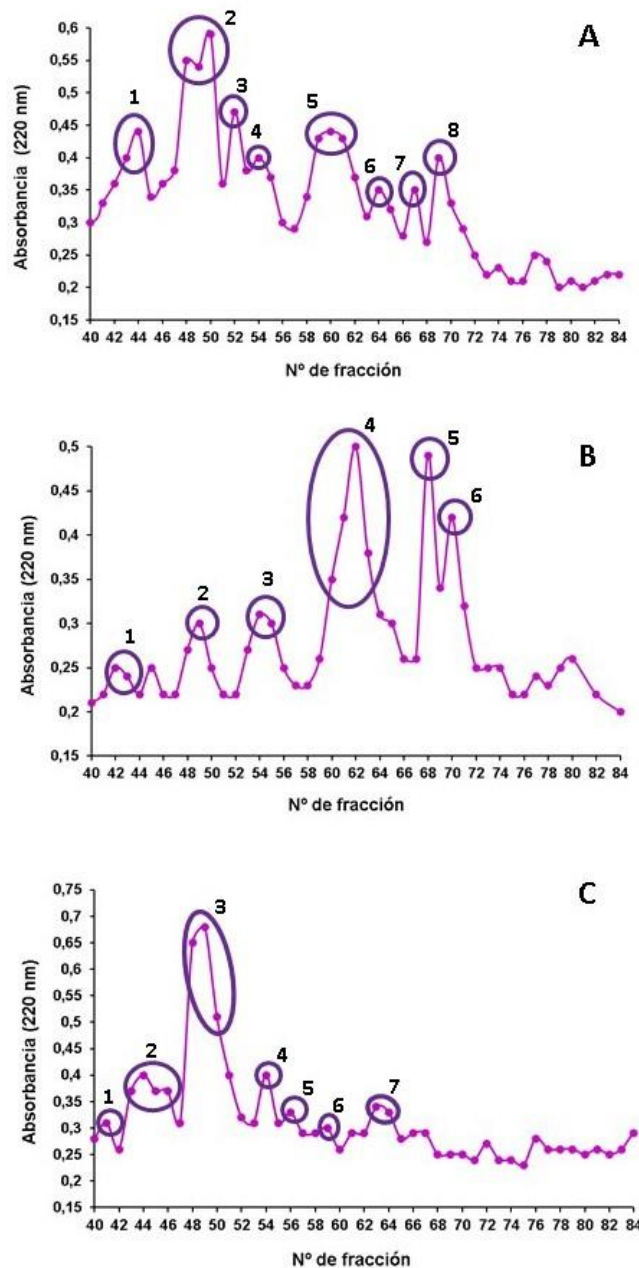


**Figura 33-** Cromatogramas de corridas de RP-HPLC del EC<sub>(Araujia)</sub> y de las fracciones LSC<sub>3</sub>, ALA<sub>3</sub> y BLG<sub>3</sub>. Condiciones de hidrólisis: pH 7.5, 50 °C, E/S 0.2 UE/mg. Las flechas indican las fracciones con fluorescencia intrínseca. **A** y **B**- LSC<sub>3</sub> (tiempo cero y 30 min de reacción, respectivamente). **C** y **D**- ALA<sub>3</sub> (tiempo cero y 30 min de reacción, respectivamente). **E** y **F**- BLG<sub>3</sub> (tiempo cero y 30 min de reacción, respectivamente). **G**- EC<sub>(Araujia)</sub>.

A las fracciones obtenidas se les determinó la fluorescencia intrínseca en las condiciones de trabajo, encontrando emisión fluorescente en dos de ellas, de tiempos de retención de 21.7 y 27.7 min, con  $1419,0 \pm 32$  y  $9331,0 \pm 51$  unidades de fluorescencia respectivamente. El hecho de que estas fracciones están presentes en los cromatogramas realizados a LSC<sub><3</sub>, ALA<sub><3</sub> y BLG<sub><3</sub> para ambos tiempos de reacción y también en el del EC<sub>(Araujia)</sub>, confirma que dichas sustancias interferentes provienen del material vegetal de partida, debiéndose tener en cuenta su presencia en el análisis de los resultados subsiguientes.

El gran número de señales generadas en los cromatogramas de ALA y BLG correspondientes a los 30 min de reacción confirma una notoria acción hidrolítica por parte del EC<sub>(Araujia)</sub> sobre estos sustratos, la cual había sido ya evidenciada en los estudios electroforéticos mostrados en la figura 30. De todas maneras, los resultados obtenidos sobre las proteínas aisladas no son necesariamente extrapolables a la acción del extracto en el lactosuero, debido, no solamente a la diferencia del entorno molecular en el que se da la reacción, sino también a que cada una de estas proteínas sufre la competencia de los otros sustratos presentes en el medio.

A las fracciones colectadas a tiempos de retención mayores a 20 min, de las corridas cromatográficas (RP-HPLC) de LSC<sub><3</sub>, ALA<sub><3</sub> y BLG<sub><3</sub> (30 min de reacción: figura 33 B, D y F respectivamente) se les midió la absorbancia a 220 nm, construyéndose los perfiles de elución que se muestran en la figura 34. Cada fracción, previamente concentrada como se describe en 3.2.18., se analizó por el método ORAC para evaluar su capacidad antioxidante. En los casos en que las fracciones constituían los valores máximos de un mismo pico se mezclaron previamente en un pool. Ocho de las muestras analizadas de LSC<sub><3</sub>, (denominadas LSC<sub>1-8</sub>), de tiempos de retención entre 23 y 31 min, dieron resultados positivos. Con ALA<sub><3</sub> se obtuvieron seis muestras positivas (ALA<sub>1-6</sub>) y con BLG<sub><3</sub> siete (BLG<sub>1-7</sub>).



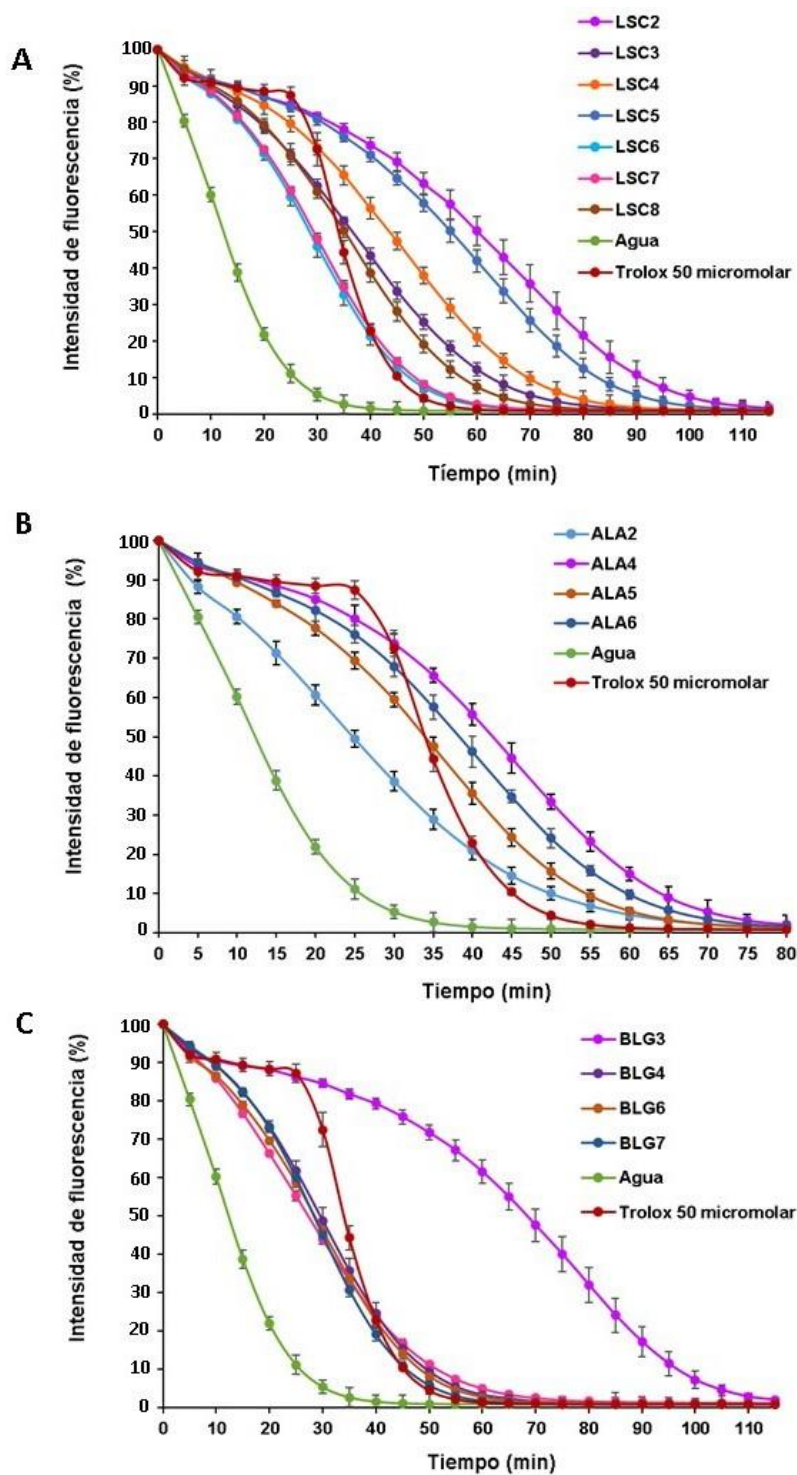
**Figura 34- Perfiles de elución contruídos por medición de la  $A_{220}$  de las fracciones de 0.5 mL colectadas durante las cromatografías (RP-HPLC) de LSC<sub>3</sub>, ALA<sub>3</sub> y BLG<sub>3</sub> (correspondientes a los cromatogramas de la figura 32 B, D y F, respectivamente). Los círculos numerados señalan los pools o fracciones individuales que constituyeron las muestras con actividad antioxidante determinada por el método de ORAC. A- Perfil de elución de LSC<sub>3</sub>. Los números 1-8 corresponden a las muestras denominadas LSC<sub>1-8</sub>, respectivamente. B- Perfil de elución de ALA<sub>3</sub>. Los números 1-6 corresponden a las muestras denominadas ALA<sub>1-6</sub>, respectivamente. C- Perfil de elución de BLG<sub>3</sub>. Los números 1-7 corresponden a las muestras denominadas BLG<sub>1-7</sub>, respectivamente.**

Debido a que las fracciones que contenían los componentes fluorescentes propios del extracto fueron parte constituyente de LSC<sub>1</sub>, ALA<sub>1</sub>, ALA<sub>3</sub>, BLG<sub>2</sub> y BLG<sub>5</sub>, los valores ORAC encontrados en estas fueron solamente aparentes o estuvieron sobreestimados.

Las fracciones colectadas a tiempos de retención mayores a 20 min de las corridas RP-HPLC de LSC<sub><3</sub>, ALA<sub><3</sub> y BLG<sub><3</sub> (tiempo de reacción cero), no presentaron actividad antioxidante, con excepción de las fracciones interferentes antes mencionadas, por lo que podría afirmarse que la actividad antioxidante encontrada en LSC<sub>2-8</sub>, ALA<sub>2</sub>, ALA<sub>4-6</sub>, BLG<sub>1</sub>, BLG<sub>3</sub>, BLG<sub>4</sub> y BLG<sub>6-7</sub> fue generada por el proceso hidrolítico (30 min de reacción con EC *(Araujia)*). Las curvas correspondientes a la cinética de decaimiento de la fluorescencia de la fluoresceína por la acción oxidativa del radical AAPH, en presencia de estas muestras, se aprecian en la figura 35.

El Trolox 50 µM logró mantener relativamente estables los niveles de fluorescencia durante los primeros 30 min, comenzando a partir de ese momento un brusco descenso en la intensidad de emisión. Se observó que con las muestras LSC<sub>2</sub>, LSC<sub>5</sub> y BLG<sub>3</sub> se logró una protección contra la acción radicalaria que superó notoriamente la alcanzada con este estándar de referencia. Los valores ORAC obtenidos se detallan en la tabla 9.

Respecto a las fracciones con tiempos de retención menor a 20 min, el método de ORAC arrojó valores de  $127.4 \pm 6$  y  $124.2 \pm 8$  ET (µM) para las correspondientes a los picos que se visualizan a los 3 y 12 min respectivamente, en el cromatograma de EC *(Araujia)*, así como en los de LSC<sub><3</sub> de ALA<sub><3</sub> y BLG<sub><3</sub> (tiempo cero y 30 de reacción). Estos resultados revelan que el EC *(Araujia)* contiene componentes que le confieren un notorio poder antioxidante contra radicales de oxígeno. Abdel-Aty y col. (2019), como resultado de su trabajo con extractos de látex de *Ficus carica*, *Ficus sycomorus* y *Euphorbia tirucalli* reportaron una fuerte correlación entre el contenido fenólico de estos y la capacidad antioxidante.



**Figura 35- Curvas de cinética de oxidación de la fluoresceína sódica por acción del AAPH en presencia de muestras obtenidas a partir de fracciones colectadas durante corridas de RP-HPLC de LSC<sub>3</sub>, ALA<sub>3</sub> y BLG<sub>3</sub> (Condiciones de hidrólisis: pH 7.5, 50 °C, E/S = 0.2 UE/mg, 30 min de reacción). Se usó agua destilada como blanco y Trolox 50 μM como estándar de referencia.**

**Tabla 9- Actividad antioxidante, determinada por el método de ORAC y expresada en equivalentes Trolox ( $\mu\text{M}$ ) de las muestras obtenidas a partir de fracciones colectadas del RP-HPLC correspondientes a LSC<sub>3</sub>, ALA<sub>3</sub> y BLG<sub>3</sub> (Condiciones de hidrólisis: 30 min de reacción, pH 7.5, 50 °C, E/S = 0.2 UE/mg,). Se usó agua destilada como blanco y Trolox 50  $\mu\text{M}$  como estándar de referencia.**

<b>Muestra</b>	<b>Fracciones constituyentes</b>	<b>Actividad antioxidante (ET <math>\mu\text{M}</math>)</b>
LSC <sub>2</sub>	48-50	112.4 $\pm$ 4.2
LSC <sub>3</sub>	52	59.9 $\pm$ 2.1
LSC <sub>4</sub>	54	75.9 $\pm$ 3.2
LSC <sub>5</sub>	59-61	100.5 $\pm$ 3.7
LSC <sub>6</sub>	64	38.7 $\pm$ 1.9
LSC <sub>7</sub>	67	40.6 $\pm$ 2.7
LSC <sub>8</sub>	69	55.0 $\pm$ 2.4
ALA <sub>2</sub>	49	33.2 $\pm$ 1.6
ALA <sub>4</sub>	60-63	70.7 $\pm$ 3.6
ALA <sub>5</sub>	68	51.3 $\pm$ 2.8
ALA <sub>6</sub>	70	61.5 $\pm$ 3.4
BLG <sub>1</sub>	41	39.5 $\pm$ 2.7
BLG <sub>3</sub>	48-50	128.0 $\pm$ 3.5
BLG <sub>4</sub>	54	42.1 $\pm$ 3.0
BLG <sub>6</sub>	59	38.5 $\pm$ 2.2
BLG <sub>7</sub>	63-64	38.2 $\pm$ 2.6

La muestra LSC<sub>2</sub>, constituida por un pool de tres fracciones correspondientes a los dos picos con tiempos de retención de 24.596 y 25.216 min, tuvo una actividad antioxidante de 112.4  $\pm$  4.2 ET ( $\mu\text{M}$ ) con una concentración peptídica global de 7.4  $\pm$  0.2  $\mu\text{M}$ . En el caso de LSC<sub>5</sub>, se alcanzaron valores ORAC de 100.5  $\pm$  3.7 ET ( $\mu\text{M}$ ) con una concentración peptídica de 6.8  $\pm$  0.4  $\mu\text{M}$ . Para ambos casos, la actividad

antioxidante puede expresarse como  $15.2 \pm 1.0$  y  $14.8 \pm 0.7$  ET ( $\mu\text{mol}$ ) / $\mu\text{mol}$  de péptidos, respectivamente.

Respecto a BLG<sub>3</sub>, cuya concentración peptídica fue de  $8.7 \pm 0.2$   $\mu\text{M}$ , la actividad antioxidante puede expresarse también como  $14.7 \pm 0.7$  ET ( $\mu\text{mol}$ ) / $\mu\text{mol}$  de péptidos.

Estos valores duplican aproximadamente los reportados por Hernández-Ledesma y col. (2007) para péptidos sintéticos derivados de  $\beta$ -lactoglobulina e indexados en la base de datos de péptidos bioactivos BIOPEP-UWM (Minkiewicz y col., 2019), los cuales dieron valores entre 4.45 y 7.67 ET ( $\mu\text{mol}$ ) / $\mu\text{mol}$  de péptidos. Los mismos autores también reportaron los resultados obtenidos utilizando el antioxidante sintético BHA, con el cual obtuvieron valores ORAC de 2.43 ET ( $\mu\text{mol}$ ) / $\mu\text{mol}$  de péptidos.

A LSC<sub>2</sub>, LSC<sub>5</sub> y BLG<sub>3</sub> se les determinó además la capacidad de depuración de radicales DPPH, obteniéndose una reducción del  $75 \pm 3$  % para LSC<sub>2</sub>, de  $52 \pm 4$  % para LSC<sub>5</sub> y de  $82 \pm 4$  % para BLG<sub>3</sub>, con  $\text{CI}_{50}$  de  $4.9 \pm 0.3$ ,  $6.2 \pm 0.5$  y  $5.3 \pm 0.4$   $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Soares de Castro y Sato (2014) reportaron fracciones enriquecidas con péptidos antioxidantes obtenidas por hidrólisis de lactosuero bovino con la peptidasa de *A. oryzae* LBA 01 y posterior ultrafiltración con membranas de corte en 10 y 3 KDa. Los autores señalaron la eficacia del paso de ultrafiltración para la concentración de las especies bioactivas, encontrando las máximas actividades con la fracción correspondiente a péptidos menores de 3 KDa, con la cual se obtuvieron valores de depuración del DPPH de 72 %.



## 4.6- ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS PÉPTIDOS ANTIOXIDANTES

Se realizó un análisis por espectrometría de masas de las muestras LSC<sub>2-8</sub> y búsqueda en bases de datos SwissProt.2017.11.01, como se describe en 3.2.20. En la figura 36 se presentan las secuencias identificadas provenientes de  $\beta$ -lactoglobulina y de  $\alpha$ -lactalbúmina, así como su ubicación en la secuencia de la proteína fuente.

### PÉPTIDOS DE BLG ENCONTRADOS EN LSC<sub>2</sub>

TMKGLDIQK RTPEVDDEALE  
VEELKPTPEGDL DEALEKFDK  
EELKPTPEGDL LEKFDKALK

LIVTQ**TMKGLDIQK**VAGTWYSLAMAAASDISLLDAQSAPLRVY  
**VEELKPTPEGDL**EILLQKWENGECAQKKIIAEKTKIPAVFKIDA  
LNENKVLVLDTDYKYYLLFCMENSAPAEQSLACQCLV**RTPEV**  
**DDEALEKFDKALKALPMHIRLSFNPTQLEEQCHI**

### PÉPTIDOS DE BLG ENCONTRADOS EN LSC<sub>3</sub>

TMKGLDIQ VEELKPTPEGDL  
KGLDIQKV EELKPTPEGDL  
KGLDIQKVA ELKPTPEGDL  
LLDAQSAPLR LVLDTDYK  
DAQSAPLRVY DTDYKKYL  
AQSAPLRVY TDYKKYL  
QSAPLRVY LVRTPEVDDEALE  
ALPMHIR

LIVTQ**TMKGLDIQK**VAGTWYSLAMAAASDISLLDAQSAPLRVY  
**VEELKPTPEGDL**EILLQKWENGECAQKKIIAEKTKIPAVFKID  
ALNENKVLVLD**TDYKYYLLFCMENSAPAEQSLACQCLV****RTPE**  
**VDDEALEKFDKALKALPMHIRLSFNPTQLEEQCHI**

### PÉPTIDOS DE BLG ENCONTRADOS EN LSC<sub>4</sub>

DAQSAPLRVY LVRTPEVDDEALE  
AQSAPLRVY VRTPEVDDEALEKFD  
VEELKPTPEGDL RTPEVDDEALEKFD  
KTKIPAVFK TPEVDDEALEKFD  
KIDALNENKVLV EVDDEALEKFDK  
ALNENKVLV DDEALEKFD  
VLVLDTDYK EALEKFDKALK  
LVLDTDYK ALPMHIR  
DTDYKKYL SFNPTQLEEQCHI

LIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAAASDISLL**DAQSAPLRVY**  
**VEELKPTPEGDL**EILLQKWENGECAQKKIIAE**KTKIPAVFKIDA**  
**LNENKVLVLDTDYKYYLLFCMENSAPAEQSLACQCLV****RTPEV**  
**DDEALEKFDKALKALPMHIRLSFNPTQLEEQCHI**

### PÉPTIDOS DE BLG ENCONTRADOS EN LSC<sub>5</sub>

KGLDIQK DTDYKKYLL  
MAASDISLLDAQS TDYKKYLL  
ASDISLLDAQSAPLR MENSAPAEQSLA  
LDAQSAPLR VRTPEVDDEALEKFD  
DAQSAPLRVYV RTPEVDDEALE  
AQSAPLRVYV RTPEVDDEALEKF  
QSAPLRVYV RTPEVDDEALEKFD  
APLRVYV RTPEVDDEALEKFDKALK  
VYVEELKPTPEGDL TPEVDDEALE  
VYVEELKPTPEGDL TPEVDDEALEK  
EELKPTPEGD TPEVDDEALEKF  
EELKPTPEGDL TPEVDDEALEKFD  
EKTIPAVF TPEVDDEALEKFDKA  
KIDALNENKVLV TPEVDDEALEKFDKALK  
ALNENKVLVLD EVDDEALEKFD  
ALNENKVLVLDT VDDEALEKFD  
ALNENKVLVLDTDYK DEALEKFDKALK  
LNENKVLVLDTDYK KALPMHIRLS  
ENKVLVLDTDYK ALPMHIR  
VLVLDTDYK SFNPTQLEEQCHI  
VLDTDYKKYL

LIVTQ**TMKGLDIQK**VAGTWYSLA**MAASDISLLDAQSAPLRVY**  
**VEELKPTPEGDL**EILLQKWENGECAQKKIIAE**KTKIPAVFKIDA**  
**LNENKVLVLDTDYKYYLLFCMENSAPAEQSLACQCLV****RTPEV**  
**DDEALEKFDKALKALPMHIRLSFNPTQLEEQCHI**



**Figura 36- Secuencias peptídicas identificadas por espectrometría de masas, de los componentes de LSC<sub>2-8</sub> provenientes de BLG y ALA. A la derecha de la figura se muestra la secuencia de las proteínas fuente; las letras azules señalan la región a la que pertenecen los péptidos encontrados.**

Se aprecia en todas las muestras la presencia de varios péptidos derivados de BLG, desde 6 en LSC<sub>2</sub> hasta 41 en LSC<sub>5</sub>. En cambio, fueron muy pocos los provenientes

de ALA, evidenciándose solamente en cuatro muestras: 5 secuencias en LSC<sub>3</sub>, y solamente una en LSC<sub>4</sub>, LSC<sub>5</sub> y LSC<sub>8</sub>. Es de destacar la diferencia entre estos resultados y los que arrojó el cromatograma resultante del RP-HPLC para ALA<sub><3</sub> (30 min de reacción), que se muestra en la figura 34 B. En este, pueden apreciarse varios picos correspondientes a productos de hidrólisis, los cuales no se ven reflejados en los resultados obtenidos por espectrometría de masas, lo cual denota una acción hidrolítica diferencial del EC<sub>(Araujia)</sub> sobre ALA, cuando esta se encuentra formando parte del lactosuero o cuando constituye el único sustrato presente.

En todas las muestras se identificaron también péptidos derivados de proteínas cuya concentración en los lactosueros suele ser muy baja, como la lactoferrina, o de contaminantes normales de estos, como  $\alpha$ -caseína S1 y S2,  $\beta$ -caseína, etc., cuya incidencia en los valores de actividad antioxidante probablemente sea muy baja o nula debido a la mínima proporción relativa respecto al resto de los componentes peptídicos de las muestras.

Por comparación de lo obtenido con LSC<sub>2</sub> y LSC<sub>5</sub>, las muestras con mayor capacidad antioxidante determinada por el método de ORAC, se aprecia que en la primera se logró una menor complejidad y mayor selectividad de las posibles secuencias activas, frente a la amplia gama de productos incluidos en LSC<sub>5</sub>.

En LSC<sub>2</sub> se encontraron también nueve secuencias provenientes de la molécula de adhesión celular 1 dependiente de glicosilación (glycam-1). Esta es una proteína que se expresa específicamente en las células endoteliales de los ganglios linfáticos periféricos y mesentéricos y en un sitio específico del pulmón, pero se ha reportado que también es expresada durante la lactancia por las células epiteliales mamarias (Dowbenko y col., 1993), pudiendo llegar a una proporción en el lactosuero del 10-12 % aproximadamente.

Los resultados obtenidos con LSC<sub>2</sub> se detallan en la tabla 10, observándose que todos los péptidos identificados se encuentran en el mismo rango de tamaño que los de mayor actividad antioxidante reportados por otros autores (entre 500 y 1800 Da). Esto adquiere una importancia adicional respecto a potenciales riesgos para la salud que pueda tener la incorporación de estas sustancias en productos

alimenticios, debido a que, en general, los péptidos menores a 3 kDa poseen alergenicidad muy reducida, lo cual los hace aptos para su utilización en fórmulas infantiles u otros alimentos destinados a la población sensible a alergias alimentarias (Zhao y Ashaolu, 2020).

**Tabla 10- Secuencias peptídicas provenientes de BLG y glycam-1, identificadas en LSC<sub>2</sub> por espectrometría de masas.**

Proteína de origen	Secuencia	Masa teórica (Da)	Masa observada (Da)
BLG (6 - 14)	TMKGLDIQK	1033	1035
BLG (43 - 55)	VEELKPTPEGDLE	1455	1457
BLG (44 - 55)	EELKPTPEGDLE	1356	1358
BLG (124 - 134)	RTPEVDDEALE	1273	1275
BLG (130 - 138)	DEALEKFDK	1094	1096
BLG (133 - 141)	LEKFDKALK	1091	1093
Glycam-1 (1 - 12)	ILNKPEDETHLE	1437	1439
Glycam-1 (82 - 91)	SEETTEHTPS	1117	1119
Glycam-1 (82 - 92)	SEETTEHTPSD	1232	1234
Glycam-1 (82 - 93)	SEETTEHTPSDA	1303	1305
Glycam-1 (87 - 101)	EHTPSDASTTEGKLM	1619	1621
Glycam-1 (92 - 101)	DASTTEGKLM	1068	1070
Glycam-1 (93 - 101)	ASTTEGKLM	937	939
Glycam-1 (127 - 134)	SHAFEVVK	916	918
Glycam-1 (128 - 134)	HAFEVVK	829	831

Comparando los resultados de la RP-HPLC para LSC<sub>3</sub> y BLG<sub>3</sub> (30 min de reacción) puede observarse una absoluta concordancia entre los tiempos de retención de las fracciones constituyentes de LSC<sub>2</sub> y BLG<sub>3</sub>. Este hecho, sumado a que los valores de actividad antioxidante entre ambas muestras no presentaron diferencias

significativas entre sí, hizo suponer que la bioactividad expresada por LSC<sub>2</sub> se debió, al menos en un alto porcentaje, a la fracción peptídica proveniente de BLG.

Se realizó una espectrometría de masas a BLG<sub>3</sub>, con la subsiguiente identificación de secuencias. Los resultados revelaron la presencia de 11 péptidos, que se detallan en la tabla 11. Puede observarse que la secuencia KPTPEGDL encontrada en BLG<sub>3</sub> está contenida en dos de los péptidos pertenecientes a LSC<sub>2</sub>: VEELKPTPEGDL y EELKPTPEGDL, las cuales a su vez tienen alta relación con la secuencia YVEELKPTPEGDL de la cual se reportaron efectos significativos en la reducción de ROS en células tratadas con peróxido de hidrógeno (Basilicata y col., 2018). Además, Saerom y col. (2020) informaron para el fragmento aminoterminal YVEEL, la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica.

**Tabla 11- Secuencias peptídicas identificadas en BLG<sub>3</sub> por espectrometría de masas.**

<b>Proteína de origen</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Masa teórica (Da)</b>	<b>Masa observada (Da)</b>
BLG (32 - 40)	LDAQSAPLR	970	970
BLG (47 - 54)	KPTPEGDL	856	856
BLG (94 -100)	VLDTDYK	853	853
BLG (107 - 117)	MENSAEPEQSL	1234	1234
BLG (107 - 118)	MENSAEPEQSLA	1305	1305
BLG (124 - 134)	RTPEVDDEALE	1274	1274
BLG (124 - 135)	RTPEVDDEALEK	1402	1402
BLG (125 - 133)	TPEVDDEAL	988	988
BLG (125 - 134)	TPEVDDEALE	1117	1117
BLG (125 - 135)	TPEVDDEALEK	1246	1246
BLG (142 - 148)	ALPMHIR	837	837

Por otra parte, tres de los péptidos de LSC<sub>2</sub> y cinco de BLG<sub>3</sub> están incluidos en el fragmento de 18 aminoácidos BLG (124-141), incluyéndose la secuencia RTPEVDDEALE, presente en ambas muestras. Dentro de este grupo, la secuencia

TPEVDDEALEK de BLG<sub>3</sub> fue reportada previamente por Zanutto-Elgui y col. (2019) como potencial péptido antioxidante de una fracción derivada de un hidrolizado de leche de cabra producido por proteasas fúngicas. Power y col. (2014) reportaron además su capacidad de inhibir la dipeptidil peptidasa IV, por lo que podría ser una alternativa en tratamientos antidiabéticos.

Al considerar la naturaleza de los residuos aminoacídicos de las 6 secuencias provenientes de BLG encontradas en LSC<sub>2</sub>, se puede observar que todas presentan al menos un residuo de leucina. Las secuencias VEELKPTPEGDLE y EELKPTPEGDLE son las más ricas en aminoácidos reportados como favorables para exhibir actividad antioxidante. Ambas poseen dos residuos de leucina y dos de prolina; en particular VEELKPTPEGDLE tiene adicionalmente un residuo de valina en el extremo amino terminal.

Respecto a DEALEKFDK y LEKFDKALK, cada una tiene un residuo de fenilalanina y ambas poseen leucina. En el caso de LEKFDKALK se aprecian dos, uno de ellos en el extremo amino terminal. Por último, TMKGLDIQK posee el aminoácido azufrado metionina y una leucina y RTPEVDDEALE una prolina, una valina y una leucina.

El conjunto de secuencias con potencial antioxidante compartidas entre LSC<sub>2</sub> y BLG<sub>3</sub>, junto con la ya mencionada concordancia de los tiempos de retención entre estas dos muestras que exhibieron resultados similares tanto con el método ORAC como con el de DPPH, sugiere que los péptidos derivados de BLG presentes en LSC<sub>2</sub> serían los responsables de su bioactividad, aunque se requiere de estudios adicionales para confirmarlo. Cabe resaltar la presencia en BLG<sub>3</sub> del péptido ALPMHIR, el cual es inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), lo que le confiere actividad antihipertensiva (Power y col., 2014). Saerom y col. (2020) reportaron, además, actividad antioxidante para el tetrapéptido carboxiterminal MHIR.

De acuerdo con estos resultados, el hidrolizado presentaría múltiples actividades biológicas, incluyendo secuencias antioxidantes posiblemente derivadas de BLG, no reportadas previamente.



## 5- DISCUSIÓN GENERAL

La rica biodiversidad con que cuenta nuestro territorio, brinda la posibilidad de disponer de una enorme variedad de fuentes de enzimas y otros componentes, capaces de actuar en una amplia gama de condiciones que cubran diferentes necesidades biotecnológicas.

La posibilidad de aprovechamiento de recursos naturales con fines biotecnológicos trae aparejado, además de ventajas económicas, la valorización de elementos autóctonos y el aumento del interés en trabajos de investigación tendientes a generar conocimiento sobre especies de las cuales hay escasa o nula información, como es el caso del *Ficus luschnathiana*.

Respecto al sustrato utilizado, en los trabajos encontrados en la literatura referentes a péptidos bioactivos obtenidos por hidrólisis enzimática de lactosueros, el material de partida es un concentrado obtenido luego de una serie de procedimientos como microfiltración, ultrafiltración y liofilización. En ocasiones, también se añade un paso de desnaturalización de proteínas. En los casos en los que se ha requerido obtener péptidos de alguna de las proteínas de los lactosueros en particular, se han utilizado concentrados enriquecidos con esta y, en un gran número de casos, el material de partida es directamente la proteína purificada, de origen comercial.

En el presente trabajo se utilizó el lactosuero en el mismo estado en que se produce, evitando la necesidad de ciertos equipos y ofreciendo además la posibilidad de un procesamiento rápido que permite la integración a la cadena productiva del queso o caseinato.

También existieron diferencias muy ventajosas en las condiciones del proceso de hidrólisis, concretamente en la temperatura y los tiempos de reacción. Por ejemplo, en la mayoría de los reportes de obtención de péptidos antioxidantes, la hidrólisis se realizó a 37 °C con tiempos de reacción en el rango entre 8 y 24 h (Hernández-Ledesma y col., 2005; Contreras y col., 2011; Power y col., 2014). En otros trabajos se han usado mayores temperaturas, como en el de Contreras y col. (2011) quienes

informaron que los mejores resultados se obtuvieron utilizando termolisina durante 25 h a 80 °C. Teniendo en cuenta la importancia económica de utilizar tiempos de reacción largos y/o altas temperaturas, las condiciones utilizadas en este trabajo consistieron en una combinación equilibrada de ambos parámetros, ya que con una temperatura de 50 °C los tiempos de reacción se acortaron a 120 min para la generación de péptidos antimicrobianos ya a sólo 30 min para los antioxidantes.

En resumen, utilizando una nueva fuente vegetal de enzimas proteolíticas y un sustrato económico y nutricionalmente valioso, sin requerimiento de procesamiento previo, se obtuvieron fracciones de hidrolizado enriquecidas con péptidos bioactivos con potencialidad para ser utilizados en diversas áreas industriales. Estas fracciones podrían presentar varias ventajas frente a la utilización de péptidos aislados ya que, además de su menor costo de producción, presentan la posibilidad de contener secuencias diferentes que actúen sinérgicamente para ejercer determinada acción o poseer actividades multifuncionales.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo dieron lugar a dos publicaciones en revistas internacionales arbitradas que se citan a continuación:

Barros, M., Cantera, A.M.B., 2014. Characterization of the proteolytic activity of latex of *Ficus luschnathiana* and its application in the generation of whey antimicrobial peptides. Res. J. Phytochem. 8 (4), 172–187.

<https://doi.org/10.3923/rjphyto.2014.172.187>

Barros, M., Villadóniga, C., Cantera, A.M.B., 2022. Production of antioxidant whey hydrolysate using proteolytic extracts of *Araujia sericifera* var. hortorum latex. Biocatal. Agric. Biotechnol 44.

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102453>



## 6- CONCLUSIONES

- Se obtuvieron extractos crudos con actividad proteolítica a partir de látex de *A. sericífera* var. hortorum (E. Fourn.) y *F. luschnathiana* (Miq.) Miq., ambas especies pertenecientes a la flora nativa del Uruguay. Los respectivos extractos exhibieron mecanismos catalíticos diferentes, determinándose para el EC<sub>(Ficus)</sub> un modo de acción correspondiente a peptidasas de naturaleza serínica.
- Se determinó el efecto de agentes reductores sobre la actividad del EC<sub>(Araujia)</sub>, haciendo énfasis en la utilización de cisteína por su aptitud para ser utilizada en la industria alimenticia, evaluándose la concentración óptima en la mezcla de reacción para lograr un máximo en la actividad proteolítica. Esto resultó en un valor de 4.0 mM, con el cual se logró aumentar en 12 veces la actividad respecto al control.
- La capacidad de coagulación de la caseína obtenida con los ECs, abre la posibilidad de utilización de estos en la industria láctea, en particular la de producción de quesos.
- La actividad proteolítica del EC<sub>(Ficus)</sub> fue máxima a pH 7.6-8.0, y la temperatura más favorable fue de 70°C.
- La actividad del EC<sub>(Ficus)</sub> se vio afectada muy desfavorablemente por los procesos de congelamiento/descongelamiento, exhibiendo en cambio muy buena estabilidad a temperaturas altas.
- Con excepción del almacenamiento a -20 °C, la estabilidad de la actividad del EC<sub>(Araujia)</sub> fue menor que la del EC<sub>(Ficus)</sub> a todas las temperaturas ensayadas. Ambos extractos se mostraron estables a temperaturas lo suficientemente elevadas para exhibir buena actividad e inhibir la proliferación microbiana, sin el perjuicio de requerir costos muy elevados desde el punto de vista económico y energético.
- Los cortos tiempos de inactivación a 100 °C obtenidos para ambos ECs permiten utilizar este método para la detención de las reacciones hidrolíticas,

evitando la necesidad de adición de sustancias incompatibles con potenciales aplicaciones.

- Ambos extractos fueron capaces de mantener su actividad en un amplio rango de pH, siendo la condición más favorable para el EC<sub>(Ficus)</sub> el pH 6.5, y para el EC<sub>(Araujia)</sub> un rango entre 6.0 y 9.0. Un medio fuertemente básico tuvo un efecto más negativo que uno ácido sobre la estabilidad de ambos extractos.
- Los análisis moleculares de las proteínas presentes en el EC<sub>(Ficus)</sub> revelaron una mezcla de gran complejidad constituida por diversos componentes con tendencia a formar agregados heterogéneos dependientes del pH del medio. Se evidenció la presencia en el extracto de al menos tres componentes con actividad proteolítica, con diferentes tamaños moleculares y puntos isoeléctricos.
- El EC<sub>(Ficus)</sub> y el EC<sub>(Araujia)</sub> fueron efectivos para hidrolizar lactosueros de caseinería y de queso Mozzarella, obteniéndose valores máximos de grados de hidrólisis a 50 °C y pH neutro, de  $3.1 \pm 0.3$  % por la acción del EC<sub>(Ficus)</sub> sobre LSM (E/S = 0.01 UE/mg, 120 min de reacción) y de  $4.7 \pm 0.2$  % por la acción del EC<sub>(Araujia)</sub> sobre LSC (E/S = 0.2 UE/mg, 30 min de reacción).
- Se lograron fracciones peptídicas con capacidad antimicrobiana frente a una cepa de *S. aureus*, a partir de hidrolizados obtenidos por la acción del EC<sub>(Ficus)</sub> y el EC<sub>(Araujia)</sub> sobre lactosueros. Las fracciones LSM<sub>3-10</sub> y LSM<sub><3</sub> obtenidas luego de 90 y 120 min de hidrólisis con EC<sub>(Ficus)</sub> resultaron en un porcentaje de inhibición de  $86 \pm 3$  % y  $94 \pm 4$  % respectivamente.
- Se lograron fracciones peptídicas con capacidad antioxidante frente a radicales oxígeno y de depuración de radicales DPPH, a partir de hidrolizados obtenidos por la acción del EC<sub>(Araujia)</sub> en lactosuero de caseinería, obteniéndose valores máximos de  $15.2 \pm 1.0$  ET (μmol) /μmol de péptidos y  $75 \pm 3$  % de depuración, respectivamente.
- Se obtuvo información sobre las secuencias peptídicas constituyentes de las fracciones con actividad antioxidante.

## 7- ANEXOS

### **I- CARACTERÍSTICAS DE LA EXTRACCIÓN Y EJEMPLOS DE VALORES DE ACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS CRUDOS**

Durante la obtención de los extractos crudos, no es posible medir con exactitud los volúmenes de látex extraído debido a que este se va recogiendo de a pocos microlitros a medida que aflora y el proceso de coagulación en la herida de la planta suele impedir en muchas ocasiones completar el volumen prefijado en la micropipeta. Por otra parte, este proceso de coagulación se da también dentro del tip, quedando material adherido a las paredes internas y disminuyendo cada vez más su capacidad, hasta que se hace necesario recambiarlo.

Las condiciones climáticas también condicionan la fluidez, el caudal y los tiempos de coagulación, los cuales son factores adicionales de variabilidad, por lo que no suelen ser reproducibles los valores de actividad de los diferentes extractos.

Respecto al efecto de la temperatura y humedad del ambiente, se observó para el  $EC_{(Ficus)}$  que en las épocas en las cuales se habían registrado muchas lluvias el tiempo de coagulación del látex fue mayor, facilitando su extracción. Por otra parte, en épocas de altas temperaturas el caudal fue escaso, de fluir lento, mientras que en períodos invernales se apreció un volumen considerablemente mayor manando de cada herida. De todas maneras, se hace necesario un estudio más riguroso desde el punto de vista estadístico para concluir una correlación entre los fenómenos mencionados.

En el caso del  $EC_{(Araujia)}$ , debido a que el látex se extrajo de los frutos, exclusivamente en el período de setiembre a noviembre, no se constataron variaciones relacionadas a factores climáticos.

En la tabla 12 se muestran los valores de actividad, concentración de proteínas y actividad específica para nueve extractos de *F. luschnathiana* recogidos en diferentes épocas del año y seis extractos de *A. sericífera*.

**Tabla 12- Datos de actividad proteolítica y actividad específica de EC<sub>(Ficus)</sub> y EC<sub>(Araujia)</sub> preparados a partir de látex recolectados en diferentes épocas del año.**

<b>Extracto</b>	<b>Mes de recolección</b>	<b>Actividad (UE/mL)</b>	<b>Actividad específica (UE/mg)</b>
EC <sub>(Ficus)</sub>	Junio	0.52 ± 0.04	0.82 ± 0.07
EC <sub>(Ficus)</sub>	Junio	0.70 ± 0.02	0.54 ± 0.05
EC <sub>(Ficus)</sub>	Julio	0.56 ± 0.03	0.48 ± 0.03
EC <sub>(Ficus)</sub>	Julio	0.65 ± 0.05	0.75 ± 0.06
EC <sub>(Ficus)</sub>	Agosto	0.90 ± 0.04	0.50 ± 0.04
EC <sub>(Ficus)</sub>	Setiembre	0.78 ± 0.03	0.65 ± 0.05
EC <sub>(Ficus)</sub>	Setiembre	0.87 ± 0.05	0.39 ± 0.05
EC <sub>(Ficus)</sub>	Noviembre	0.60 ± 0.06	0.25 ± 0.03
EC <sub>(Ficus)</sub>	Noviembre	0.54 ± 0.03	0.32 ± 0.04
EC <sub>(Araujia)</sub>	Setiembre	0.64 ± 0.04	0.82 ± 0.07
EC <sub>(Araujia)</sub>	Setiembre	0.78 ± 0.03	0.65 ± 0.06
EC <sub>(Araujia)</sub>	Octubre	0.49 ± 0.03	0.72 ± 0.08
EC <sub>(Araujia)</sub>	Octubre	0.83 ± 0.05	1.04 ± 0.05
EC <sub>(Araujia)</sub>	Noviembre	0.67 ± 0.04	0.61 ± 0.06
EC <sub>(Araujia)</sub>	Noviembre	0.92 ± 0.03	0.66 ± 0.04

## II- ECUACIONES DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN

### **Método de Lowry:**

$$y = 1.314 x + 0,094 (R^2= 0,9961)$$

### **Método de Biuret:**

$$y = 0.047 x + 0.024 (R^2= 0,9983).$$

### **Determinación de concentraciones peptídicas con o-ftalaldehído:**

$$y = 0.024 x - 0.0489. R^2 = 0.9997$$

### **Determinación de tamaños moleculares por filtración en gel:**

$$\log PM = - 0.025 V_e + 3.382 (R^2 = 0.9984) \quad V_e: \text{volumen de elución}$$

### **Determinación de tamaños moleculares por PAGE-SDS convencional:**

$$\log PM = - 0.9853 R_f + 2.1707 (R^2= 0.9929)$$

### **Determinación de tamaños moleculares por PAGE-SDS en FAST SYSTEM:**

$$\log PM = -1.175 R_f + 2.345 (R^2= 0.9935)$$

### **Determinación de grados de hidrólisis:**

$$y = 0.2995 x + 0.0215 (R^2 = 0.9958)$$

### III- CÓDIGOS DE DENOMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS

<b>Aminoácido</b>	<b>Código de 3 letras</b>	<b>Código de 1 letra</b>	<b>Aminoácido</b>	<b>Código de 3 letras</b>	<b>Código de 1 letra</b>
Alanina	Ala	A	Isoleucina	Ile	I
Arginina	Arg	R	Leucina	Leu	L
Asparragina	Asn	N	Lisina	Lys	K
Aspártico	Asp	D	Metionina	Met	M
Cisteína	Cys	C	Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F	Serina	Ser	S
Glicina	Gly	G	Tirosina	Tyr	Y
Glutámico	Glu	E	Treonina	Thr	T
Glutamina	Gln	Q	Triptofano	Trp	W
Histidina	His	H	Valina	Val	V

## IV- PORTADAS DE LOS TRABAJOS PUBLICADOS

Research Journal of Phytochemistry 8 (4): 172-187, 2014  
ISSN 1819-3471 / DOI: 10.3923/rjphyto.2014.172.187  
© 2014 Academic Journals Inc.

### **Characterization of the Proteolytic Activity of Latex of *Ficus luschnathiana* and its Application in the Generation of Whey Antimicrobial Peptides**

<sup>1</sup>M. Barros and <sup>1,2</sup>A.M.B. Cantera

<sup>1</sup>Departament of Biosciences and Biochemistry, Faculty of Chemistry, Universidad de la República, Avda. Gral. Flores 2124, CP 11800, Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup>Laboratory of Hydrolytic Enzyme, Institute of Biological Chemistry, Faculty of Sciences, Universidad de la República, Equals 4225, CP 11400, Montevideo, Uruguay

*Corresponding Author: Miriam Barros, Faculty of Chemistry, Laboratory of Biochemistry, General Flores 2124, Montevideo, Uruguay*

#### **ABSTRACT**

Characterization studies were performed to a proteolytic extract, prepared from latex of *Ficus luschnathiana* (Miq.) Miq., a Moraceae family tree. The mechanism of action was determined, corresponding to serine proteinases behaviour. Studies of optimum pH and temperature showed a maximum catalytic activity at pH 8.0 and 75°C, respectively. The proteolytic activity exhibited good stability when incubated at different pH and temperature conditions. At 7°C and pH 7.5, the extract kept a 100% of the initial activity for 5 months. When comparing the effect of pH on the stability, maximum values were obtained at pH 6.5, with 98% of the initial activity remaining after 5 h of incubation at 60°C. After 1 min at 100°C total inactivation occurred. Regarding the potential use in the dairy industry, milk clotting activity was determined obtaining a very effective coagulant action. Analysis protocols which included molecular exclusion chromatography, electrophoretic methods and mass spectrometry revealed a complex protein profile. It was found that the molecules responsible for the proteolytic activity of the extract were several proteins of different molecular weight and isoelectric points, most of which still retained the activity in presence of SDS and reducing agents. These proteic components displayed a pH-dependant tendency to form aggregates. Using the proteolytic activity of the crude extract under controlled hydrolysis conditions on whey proteins, yielded peptidic fractions with antimicrobial activity against a *S. aureus* strain. It was found that fractions of peptide concentration of 0.96  $\mu\text{mol mL}^{-1}$  inhibited growth by 94%.

**Key words:** Antimicrobial peptides, *Ficus luschnathiana*, latex, proteolytic enzymes, whey

#### **INTRODUCTION**

The wide range of biotechnological applications of proteolytic enzymes have generated in recent years increased efforts to search for new sources that provide activity profiles adaptable to current demands. This, coupled with the convenience of using natural resources in each region, has turned much of the interest of researchers towards the native flora.

The plant proteolytic enzymes have received particular attention due to the property to maintain its activity in a wide range of temperature and pH (Devaraj *et al.*, 2008). They play an important role in regulating the biological processes in plants, such as stress response, recognition of pathogen, mobilization of storage protein during germination, senescence, etc. (Singh *et al.*, 2008).



Contents lists available at ScienceDirect

## Biocatalysis and Agricultural Biotechnology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bab](http://www.elsevier.com/locate/bab)Production of antioxidant whey hydrolysate using proteolytic extracts of *Araujia sericifera* var. hortorum latexM. Barros<sup>a,b,\*</sup>, C. Villadóniga<sup>c</sup>, A.M.B. Cantera<sup>a,c</sup><sup>a</sup> Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Avda. Gral. Flores 2124, CP 11800, Montevideo, Uruguay<sup>b</sup> Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay<sup>c</sup> Laboratorio de Biotecnologías y sus Aplicaciones, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Igua 4225, CP 11400, Montevideo, Uruguay

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Bioactive peptides  
Araujia  
Latex  
Antioxidants  
Proteolytic enzymes  
Whey

## ABSTRACT

Proteins in whey from casein production were hydrolyzed with proteolytic extracts from the latex of *Araujia sericifera* var. hortorum. Hydrolysate fractions that were partially purified by RP-HPLC and evaluated using the ORAC method resulted in an antioxidant capacity of  $112.4 \pm 4.2$  Trolox equivalents ( $\mu\text{M}$ ). LC-MS/MS analysis of peptide fractions showed that peptides derived from  $\beta$ -lactoglobulin could be responsible for antioxidant activity. The sum of these results along with the fact that a controlled and reproducible production process was used, involving the use of natural resources and reaction conditions without excessive costs at an industrial scale, makes a promising contribution to improving antioxidant dairy products.

## 1. Introduction

*Araujia sericifera* var. hortorum is a perennial vine, that belongs to the Apocynaceae family and subfamily Asclepiadaceae, native to northeastern Argentina, southern and southeastern Brazil, Paraguay, and Uruguay (Instituto de Botánica Darwinion, 2019). *Araujia hortorum* is currently distributed across much of the world (Asia, Europe, North America, Oceania, and South Africa), where it is cultivated due to its various applications, including use as a medicinal, edible, ornamental, and textile plant (Santa Cruz and Cordero, 2018). Three cysteine proteases (araujain h-I, araujain h-II and araujain h-III) present in the latex of *Araujia hortorum* fruits were reported (Priolo et al., 2000, 2001; Obregon et al., 2001).

Milk protein hydrolysates produced by latex extracts have been previously reported, most of which come from casein (Di Pierro et al., 2014). Barros and Cantera (2014) describe the use of proteolytic extracts obtained from *Ficus luschnathiana* latex to hydrolyze whey, which is the liquid fraction resulting after the formation of the casein clot during cheese or casein production. Due to the continuous growth of the dairy industry and the large annual production of large whey volumes, the use of this coproduct is insufficient (Zandona et al., 2021); thus, it is important to look for alternative forms of use that generate products with high added value. Due to its high pollutant characteristics, discarding whey without adequate treatment causes damage to the environment and also discards potential sources of nutrients and energy. The excellent potential of whey's proteins, considering the nutritional quality and the capacity to generate bioactive peptides, may enable biotechnological applications to produce high value-added products (Barros and Cantera, 2014; Villadóniga and Cantera, 2019).

\* Corresponding author. Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Avda. Gral. Flores 2124, CP 11800, Montevideo, Uruguay.

E-mail address: [mbarros@fq.edu.uy](mailto:mbarros@fq.edu.uy) (M. Barros).

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102453>

Received 8 February 2022; Received in revised form 26 July 2022; Accepted 27 July 2022

Available online 3 August 2022

1878-8181/© 2022 Published by Elsevier Ltd.



## 8- REFERENCIAS

Abdel-Aty, A.M., Hamed, M.B., Salama, W.H., Ali, M.M., Fahmy, A.S., Mohamed, S.A., 2019. *Ficus carica*, *Ficus sycomorus* and *Euphorbia tirucalli* latex extracts: phytochemical screening, antioxidant and cytotoxic properties. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 20, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101199>

Agyei, D., Akanbi, T.O., Oey, I., 2019. Enzymes for use in functional foods, en Kuddus, M. (Ed.), *Enzymes in food biotechnology: production, applications, and future prospects*, Academic Press, Londres, págs. 129-147.

Aider, M., 2021. Potential applications of ficin in the production of traditional cheeses and protein hydrolysates. *JDS Communications* 2 (5), 233-237.

Amerik, A.Y., Hochstrasser, W., 2004. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.* 1695 (1-3), 189-207.

Amira A. B., 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. *Int. J. Food Prop.* 20 (51), 576-593.

Anderson, J.W., 1968. Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochem.* 7, 1973-1988.

Andrews, B. A., Asenjo, J. A., 1986. Synthesis and regulation of extracellular  $\alpha$  (1-3) glucanase and protease by *Cytophaga* sp. in batch and continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 1366-1375.

Baró, L., Jiménez, J., Martínez-Férez, A., Bouza, J.J., 2001. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *Ars. Pharmaceutica* 42 (3-4), 135-145.

Basilicata, M.G., Pepe, G., Adesso, S., Ostacolo, C., Sala, M., Sommella, E., Scala, M.C., Messore, A., Autore, G., Marzocco, S., Campiglia, P., 2019. Antioxidant properties of buffalo-milk dairy products: A  $\beta$ -Lg peptide released after gastrointestinal digestion of buffalo ricotta cheese reduces oxidative stress in

intestinal epithelial cells. Int. J. Mol. Sci. 19, 1955. <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/7/1955>

Beynon, R.J., Salvesen, G. 1989. Commercially available protease inhibitors, en Beynon, R.J. y Bond, J.S. (Eds.), Proteolytic enzymes, a practical approach, IRL Press, Oxford, págs. 241-249.

Brandelli, A., Daroit, D.J., Folmer Corrêa, A.P., 2015. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. Food Res. Int. 73, 149-161.

Bucciarelli, A., Cambi, V., Villamil, C., 2008. Morfoanatomía de *Araujia hortorum* E. Fourn. (Asclepiadaceae), especie nativa de interés medicinal (Con 3 Figuras). Phytón (Buenos Aires) 77, versión On-line, ISSN 1851-5657, [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-56572008000100024](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572008000100024)

Burkitt, M., 2001. A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides,  $\alpha$ -tocopherol, thiols, and ceruloplasmin. Arch. Biochem. Biophys. 394 (1), 117-135.

Castellano-González, M.J., Franquis-Rodríguez, R.M., Perozo-Mena, A.J., Sandoval-Castellano, I.V., 2020. Susceptibilidad a metilicina y vancomicina en *Staphylococcus aureus* aislados de hemocultivos. Kasmera 48 (1), <https://doi.org/10.5281/zenodo.3712378>

Castro, S., Cantera A.M.B., 1995. A rapid and inexpensive procedure for the determination of proteolytic activity. Biochem. Educ. 23, 41-43.

Contreras, M.M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Martín-Álvarez, P.J., Recio, I., 2011. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: optimization by response surface methodology. Food Sci. Technol. 44 (1), 9-15.

Church, F.C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., Catignani, G. L., 1983. Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. J. Dairy Sci. 66, 1219-1227.

Dalgleish, D.G., 1993. The enzymatic coagulation of milk, en Fox, P.F. (Ed.), Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Springer, Boston, págs. 579-619.

Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M., Bienert, M., 2001. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge, FEBS Lett. 501,146–150.

Devaraj. K.B, Gowda, L.R., Prakash V., 2007. An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.), Phytochem. 69, 647-655.

D'Ipólito, S. Guevara, M.G., Tito, F.R., Tonón, C., V., 2018. An overview of plant proteolytic enzymes, en Guevara, M.G., Daleo, G.R., (Eds.), Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes, Springer, págs., 1-19.

Dowbenko, D., Kikuta, A., Fennie, C., Gillett, N., Lasky, N.A., 1993. Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1 (GlyCAM 1) mucin is expressed by lactating mammary gland epithelial cells and is present in milk. J Clin Invest. 92 (2), 952-960.

Dubey, V.K., Jagannadham, M.V., 2003. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. Phytochem. 62, 1057-1071.

Dunaevsky, Y.E., Popova, V.V., Semenova, T.A., Beliakova, G.A., Belozersky M.A., 2014. Fungal inhibitors of proteolytic enzymes: Classification, properties, possible biological roles, and perspectives for practical use. Biochimie 101, 10-20.

Dunn, B.M., 1989. Determination of protease mechanism, en Beynon, R.J. y Bond, J.S. (Eds.), Proteolytic enzymes, a practical approach, IRL Press, Oxford, págs. 57-81.

Feijó Corrêa, J.A., Gonçalves Evangelista, A., de Melo Nazareth, T., Bittencourt Luciano, F., 2019. Fundamentals on the molecular mechanism of action of antimicrobial peptides. Materialia 8, 100494.

Feijó Corrêa, J.A., de Melo Nazareth, T., Fernandes da Rocha, G., Bittencourt Luciano, F., 2023. Bioactive Antimicrobial Peptides from Food Proteins: Perspectives and Challenges for Controlling Foodborne. Pathogens. Pathogens 12, 477.

- Fujinaga, M., Cherney, M.M., Oyama, H., Oda, K., James, M.N., 2004. The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 3364–3369.
- Ghribi, A. M., Gafsi, I. M., Blecker, C., Attia, H., Bouaziz, M. A., Besbes, S., 2022. *Cynara cardunculus* as a potential source of milk coagulating protease: effects on physical properties of cow's milk. Food Sci. Nutr. 10, 3855–3864.
- González García, M., San Juan Galán, J., Morales Vicente, F.E., Otero González, A.J., 2017. Péptidos antimicrobianos: potencialidades terapéuticas. Rev Cubana Med Trop. 69 (2), 1-13.
- Ha, E., Zemel, M.B., 2003. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (Review). J. Nutr. Biochem. 14, 251–258.
- Habinshuti, I., Nsengumuremyi, D., Muhoza, B., Ebenezer, F., Aregbe, A.Y., Ndisanze, M.A., 2023. Recent and novel processing technologies coupled with enzymatic hydrolysis to enhance the production of antioxidant peptides from food proteins: A review. Food Chem. 423, 136313.
- Hadacek, F., Greger H., 2000. Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice. Phytochem. Anal., 11, 137-147.
- Hartmann, R., Meisel, H., 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. Curr. Opin. Biotechnol., 18 (2), 163-169.
- Hernandez-Ledesma, B., Amigo, L., Recio, I., Bartolomé, B., 2007. ACE-inhibitory and radical-scavenging activity of peptides derived from  $\beta$ -lactoglobulin f (19-25). Interactions with ascorbic acid. Agric. Food Chem. 55, 3392–3397.
- Hinrichs R., Gotz, J., Noll, M., Wolfschoon, A., Eibel, H., Weisser, H., 2004. Characterization of different treated whey protein concentrates by means of lowresolution nuclear magnetic resonance. Int. Dairy J. 14 (9): 817-827.
- Homaei, A.A., Sajedi, R.H., Sariri, R., Seyfzadeh, S., Stevanato, R., 2010. Cysteine enhances activity and stability of immobilized papain. Amino Acids 38, 937–942.

Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., Yi, H., 2020. Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Front. Microbiol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>

Instituto de Botánica Darwinion, 2018. Flora argentina y del conosur- Catálogo de las plantas vasculares. <http://conosur.floraargentina.edu.ar/species/details/8617>

Kang, L., Han, T., Cong, H., Yu, B., Shen, Y., 2022. Recent research progress of biologically active peptides. *Biofactors*, 48, 575–596.

Korhonen, H., Pihlanto, A., 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.*, 16, 945-960.

Kumar. D., Bhalla, T.C., 2005. Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:726–736

Lahmar, I., Nasri-Ayachi, M.B., Belghith, K., 2022. Laticifer identification, rubber characterization, phenolic content, and antioxidant activity of *Pergularia tomentosa* latex extract. *Biomed Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2022/7158905>

Layne, E., 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins, en Colowick, S. P., Kaplan, N. O. (Eds.), *Methods in Enzymology*, 3. Academic Press, New York, págs. 447-454.

Li, X., Zuo, S., Wang, B., Zhang, K., Wang, Y., 2022. Antimicrobial mechanisms and clinical application prospects of antimicrobial peptides. *Molecules* 27, 2675. <https://doi.org/10.3390/molecules27092675>

López-García, G., Dublan-García, O., Arizmendi-Cotero, D., Gómez Oliván, L.M., 2023. Antioxidant and antimicrobial peptides derived from food proteins. *Molecules* 27, 1343. <https://doi.org/10.3390/molecules27041343>

Lynn, K.R., Clevette-Radford, N.A., 1986. Ficin e, a serine-centred protease from *Ficus elastica*. *Phytochemistry* 25 (7), 1559-1561.

Malekkhaiat Häffner, S, Malmsten, M., 2018. Influence of self-assembly on the performance of antimicrobial peptides. *J. Colloid Interface Sci.* 38, 56-79.

Mazorra-Manzano, M.A., Moreno-Hernández, J.M., Ramírez-Suarez, J.K., 2018. Milk-Clotting Plant Proteases for Cheesemaking, en Guevara, M.G., Daleo, G.R., (Eds.), *Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes*, Springer, págs., 21-41.

Milošević, J., Vrhovac, L., Đurković, F., Janković, B., Malkov, S., Lah, J., Polović, N. Đ., 2020. Isolation, identification, and stability of Ficin 1c isoform from fig latex. *New J. Chem.* <https://doi.org/10.1039/d0nj02938f>

Minkiewicz, P., Iwaniak, A., Darewicz, M., 2019. BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: current opportunities. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (5978) <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/23/5978>

Mohammadrezaei, M., Navidshad, B., Gheisari, A., Toghyani, M., 2021. Cottonseed meal bioactive peptides as an alternative to antibiotic growth promoters in broiler chicks. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 27, 329-340.

Morcelle, S., Caffini, N.O., Priolo, N., 2004. Proteolytic properties of *Funastrum clausum* latex. *Fitoterapia* 75, 480-493.

Motta-Correa, Y.O., Mosquera, M.W.J., 2015. Aprovechamiento del lactosuero y sus componentes como materia prima en la industria de alimentos. *@Liment Cienc. Tecnol. Aliment.* 13, 81-91.

Mótyán, J.A., Tóth, F., Tózsér, F., 2013. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules* 3, 923-942.

Obregón, W.D., Arribére, M.C., Morcelle, del Valle S., Liggieri, C., Caffini N., Priolo N., 2001. Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits, *Protein Chem. J.*, 20 (4), 317-325.

Panesar, P.S., Kennedy, J.F., Gandhi, D.N., Bunko, K., 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chem.* 105, 1–14.

Parra Huertas, R.A., 2009. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* 62 (1), 4967-4982.

- Pereira, L.S., Gomes, V.M., Fernandes, K.V.S., Sales, M.P., Xavier-Filho J., 1999. Insecticidal and antifungal proteins of the latex from *Manihot glaziovii* Muell. Arg. Rev Bras Bot., 22, 27-30.
- Power, O., Fernández, A., Norris, R., Riera, F.A., FitzGerald, R.J., 2014. Selective enrichment of bioactive properties during ultrafiltration of a tryptic digest of  $\beta$ -lactoglobulin. J. Funct. Foods 9, 38-47.
- Priolo, N., Morcelle del Valle, S., Arribére, M.C., López, L., Caffini N., 2000, Isolation and Characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits. Protein Chem. J., 19, 39-49.
- Priolo, N., Arribére, M.C., Caffini, N., Barberis, S., Nieto Vázquez, R., Luco J.M. 2001. Isolation and purification of cysteine peptidases from the látex of *Araujia hortorum* fruits. Study of their esterase activities using partial least-squares (PLS) modelling. J. Mol. Catal. B Enzym.,15, 177-189.
- Queiroga, A.C., Pintado, M.E., Malcata, F.X., 2012. Search for novel proteolytic enzymes aimed at textile and agro-industrial applications: An overview of current and novel approaches. Biocatal. Biotransformation, 30 (1), 154-169.
- Ramos, M.V., Demarco, D., da Costa Souza, I.C., Teixeira de Freitas, C., D., 2019. Laticifers, latex, and their role in plant defense. Trends Plant Sci. 24 (6), 553-567.
- Rawlings, N., 2020. Twenty-five years of nomenclature and classification of proteolytic enzymes. Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteom., 1868 (2), 1-11.
- Rawlings, N., Bateman, A., 2021. Origins of peptidases. Biochimie 166, 4-18.
- Recio, I y Visser, S, 2000. Antibacterial and binding characteristics of bovine, ovine and caprine lactoferrins: a comparative study. Int. Dairy J. 9, 597-605.
- Saerom, K., Hye-Ryung; C., Yoon-Jeong, K., Yoon-Sik, L., Kyoung-Chan, P., Seon-Yeong, K., 2020. Milk protein-derived antioxidant tetrapeptides as potential hypopigmenting agents. Antioxidants 9 (11), <https://doi.org/10.3390/antiox9111106>

Salas, C.E., Dittz, D., Torres, M.J., 2018. Plant proteolytic enzymes: their role as natural pharmacophores, en Guevara, M.G., Daleo, G.R., (Eds.), *Biotechnological applications of plant proteolytic enzymes*, Springer, págs. 107-127.

Salvesen, G.S., Nagase, H, 2001. Inhibition of proteolytic enzyme, en Beynon, R., Bond, J.S. (Eds.), *Proteolytic enzymes*, seg. ed., Oxford University Press, Oxford, págs. 105-130.

Samaranayaka, A.G.P., Eunice, C.Y., Li-Chan, 2011. Food-derived peptidic antioxidants: a review of their production, assessment, and potential applications. *J. Funct. Foods* 3, 229–254.

Samrot, A.V., Mun, C.Y., Qi, N.X., Saigeetha S., Wilson, S., Rajesh, V.V., Pachiyappan, S., Rajalakshmi, D., Chinni, S.V., 2022. Plant latex: phytochemistry, medicinal properties and application – a review. *J. Pharm. Negat.* 13 (7), 5351-5375.

Santa Cruz, J., Cordero, S., 2018. Primer registro de *Araujia sericifera* (Apocynaceae: Asclepiadoideae) para Chile, una nueva especie exótica trepadora de América del Sur. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 53 (2), 313-317.  
<https://doi.org/10.31055/1851.2372.v53.n2.20587>

Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y.S.R., De, B., 2010. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 3 (1), 91-100.

Schagger, H., 2006. Tricine–SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* 1, 16–22.

Schneider, J.J., Unholzer, A., Schaller, M., Schäfer-Korting, M., Korting, H.C., 2005. Human defensins. *J. Mol. Med.* 83, 587–595.

Singh, B.P., Rohit, Manju, K.M., Sharma, R. Bhushan, B., Ghosh, S., Goel, G., 2023. Nano-Conjugated Food-Derived Antimicrobial Peptides as Natural Biopreservatives: A Review of Technology and Applications. *Antibiotics* 12, 244.

Singh, P.K., Shrivastava, N., Ojha, B.K., 2019. Enzymes in the Meat Industry, en Kuddus, M. (Ed.), *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects*, Academic Press, Londres, págs. 111-128.



Singh, V.K., Patel, A.K., Moir, A.J., Jagannadham, M.V., 2008. Indicain, a dimeric serine protease from *Morus indica* cv. K2. *Phytochem.* 69, 2110-2119.

Soares de Castro, R.J., Sato, H.H., 2014. Advantages of an acid protease from *Aspergillus oryzae* over commercial preparations for production of whey protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3, 58-65.

Sobottka, A.M., Tonial, F., Sytwala, S., Melzig, M., 2014. Proteinase activity in latex of three plants of the family Euphorbiaceae. *Braz. J. Pharm. Sci.* 50 (3), 559-565.

Soltani, M., Say, D., Guzeler, N., 2017. Functional Properties and Nutritional Quality of Whey Proteins. *J. Int. Environ. Appl. Sci.* 12 (4), 334-338.

Spadaro, A.C.C., Draghetta, W., del Lama, S.N., Camargo, A., Greene, L.J., 1979. A convenient manual trinitrobenzenesulfonic acid method for monitoring amino acids and peptides in chromatographic column effluents. *Anal. Biochem.* 96, 317–321.

Szwajkowska, M., Wolanciuk; A., Barłowska; A., Król; J., Litwińczuk, Z., 2011. Bovine milk proteins as the source of bioactive peptides influencing the consumers' immune system – a review. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 29(4), 269-280.

Trejo, S., López, L.M.I., Cimino, C.V., Caffini, N.O., Natalucci C.L., 2001. Purification and characterization of a new plant endopeptidase isolated from latex of *Asclepias fruticosa* L. (Asclepiadaceae). *Protein Chem. J.*, 20, 6, 445-453.

Troncoso, F.D., Sánchez, D.A., Ferreira M.L., 2022. Production of plant proteases and new biotechnological applications: an updated review. *ChemistryOpen* 11, <https://doi.org/10.1002/open.202200017>

Ucar, Y., Ozogul, Y., Ozogul, F., Durmus, M., Kösker, A.R., Boga, K., 2021. The impact of different levels of nisin as a biopreservative agent on the chemical, sensory and microbiological quality of vacuum-packed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets stored at  $4 \pm 2$  °. *Grasas y aceites* 72 (2). <https://doi.org/10.3989/gya.1261192>

Ventoso, A., 2014. Higuierón, en Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, Dirección Nacional de Medio Ambiente (Eds.), Guía de identificación de especies arbóreas nativas del Uruguay, págs. 75-76.

Villadóniga, C., Cantera, A. M. B., 2019. New ACE-inhibitory peptides derived from  $\alpha$ -lactalbumin produced by hydrolysis with *Bromelia antiacantha* peptidases. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 20, 101258.

Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Haihui, Duan, Y., Ma, H., 2020. Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 105, 308-322.

Winnick, T., Davis, A.R., Greenberg, D.M., 1940. Physicochemical properties of the proteolytic enzyme from the latex of the milkweed, *Asclepias speciosa* torr. Some comparisons with other proteases. *J. Gen. Physiol.* 23, 275-288.

Xiong, Y.L., 2010. Antioxidant peptides, en Mine, Y., Li-Chan, E., Jiang, B. (Eds), *Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals*, Wiley online library, págs. 29-42. <https://doi.org/10.1002/9780813811048.ch3>

Zandona, E., Blažić, M., Režek Jambrak, A., 2021. Whey utilisation: sustainable uses and environmental approach. *Food Technol. Biotechnol.* 59 (2), 147–161.

Zanutto-Elgui, M.R., Souza Vieira, J.C., Zanoni do Prado, D., Rabelo Buzalaf, M.A., de Magalhães Padilha, P., Elgui de Oliveira, D., Fleuri, L.F., 2019. Production of milk peptides with antimicrobial and antioxidant properties through fungal proteases. *Food Chem.* 278, 823-831.

Zare, H., Moosavi-Movahedi, A.A., Salami, M., Mirzaei, M., Saboury, A.A., Sheibani, N., 2013. Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (*Ficus carica* cv. Sabz) latex. *Phytochemistry* 87, 16-22.

Zhang, W., Chen, H., Wang, Z., Lan, G., Zhang, L., 2013. Comparative studies on antioxidant activities of extracts and fractions from the leaves and stem of *Epimedium koreanum* Nakai. *J. Food Sci. Technol.* 50 (6), 1122–1129.

Zhao, C., Ashaolu, T.J., 2020. Bioactivity and safety of whey peptides. *Food Sci. Technol.* 134, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109935>

Zhu, H., Lao, F., Pan, X., Wu, J., 2022. Food protein-derived antioxidant peptides: molecular mechanism, stability and bioavailability. *Biomolecules* 12, 1622.

Zikiou, A., Zidoune, M.N., 2019. Enzymatic extract from flowers of Algerian spontaneous *Cynara cardunculus*: Milk-clotting properties and use in the manufacture of a Camembert-type cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 72 (1), 89-99.

Zulueta, A., Esteve, M.J., Frígola, A., 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem.* 114, 310–316.