

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE Y CASEINOLÍTICA DE LAS PROTEASAS DEL FRUTO DE "AGUAMA" (*Bromelia pinguin* L.)

PARTIAL CHARACTERIZATION OF MILK-CLOTTING AND CASEINOLYTIC ACTIVITIES OF "AGUAMA" FRUIT (*Bromelia pinguin* L.) PROTEASES

Jesús Martín Moreno-Hernández^{1*}, Xitlalli Desideria Hernández-Mancillas², Evelia Lorena Coss Navarrete², María de Jesús Bañuelos-Pérez², Jesús Aarón Salazar-Leyva², Idalia Osuna-Ruiz², Víctor Alfonso Rodríguez-Tirado², Miguel Ángel Mazorra-Manzano³

¹ Programa de Investigación en Biotecnología. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de Culiacán. Km 17.5 Carretera Culiacán-Eldorado, Culiacán, Sinaloa, 80000. México.

² Maestría en Ciencias Aplicadas. Unidad Académica de Ingeniería en Biotecnología. Universidad Politécnica de Sinaloa. Carretera Municipal Libre Mazatlán Higuera Km 3. Mazatlán, Sinaloa, 82199. México.

³ Laboratorio de Biotecnología, Química y Autenticidad de Alimentos. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a La Victoria Km 0.6, Hermosillo, Sonora, 83000. México.

RESUMEN

En este estudio se realizó la caracterización parcial de los extractos enzimáticos de frutos de *Bromelia pinguin* basado en su actividad coagulante de la leche, actividad caseinolítica y su inhibición con el uso de inhibidores específicos. Los extractos enzimáticos crudos mostraron una máxima actividad coagulante de la leche entre 65-85°C, correspondiente a 3.99 unidades Soxhlet·mL⁻¹. Esto indica que 1 mL del extracto enzimático fue suficiente para coagular 400 mL de leche en los primeros 40 min. El efecto del pH, estudios de inhibición y análisis por zimografía indican que la actividad caseinolítica se debe a la presencia de diferentes proteasas tipo cisteína y serina. El análisis por SDS-PAGE evidenció que las proteasas presentes en el extracto hidrolizan preferentemente la fracción κ-caseína durante los primeros 30 minutos, obteniéndose un perfil hidrolítico similar al que se obtiene cuando se utiliza la enzima comercial quimosina; no obstante se observa que después de este tiempo de incubación otras caseínas también fueron susceptibles a la acción proteolítica. Bajo condiciones convencionales de coagulación, las proteasas tipo cisteína y serina presentes en el extracto de *B. pinguin* contribuyeron en mayor grado al proceso de coagulación. *Bromelia pinguin* representa una opción atractiva como fuente de proteasas para su aprovechamiento y aplicación en procesos biotecnológicos que requieren el uso de proteasas.

Palabras clave: actividad coagulante de leche, actividad caseinolítica, *B. pinguin*, producción de quesos.

ABSTRACT

Enzymatic extract from *B. pinguin* fruits were partially characterized by its milk-clotting activity, caseinolytic activities and inhibition studies. Raw enzymatic extract (REE) showed a maximum milk-clotting activity around 65-85°C, corresponding to 3.99 Soxhlet units·mL⁻¹, indicating that 1 mL of REE is necessary to clot approximately 400 mL of

milk in 40 min of incubation. The effect of pH, inhibitors and zymogram analysis of the caseinolytic activity indicated that cysteine and serine proteases are found in crude extracts. SDS-PAGE analysis of casein hydrolysis profile show that κ-casein fraction was hydrolyzed preferentially during early stages of milk-coagulation (30 min), and this behavior was similar to the hydrolytic pattern of commercial chymosin; however, other caseins were also hydrolyzed under extensive incubation time. The milk-clotting activity found in *B. pinguin* extracts was mainly attributed to action of cysteine and serine proteases. *B. pinguin* offer an attractive source of proteases for biotechnological applications.

Keywords: milk-clotting activity, caseinolytic activity, *B. pinguin*, cheese-making

INTRODUCCIÓN

Las proteasas constituyen el grupo de enzimas más importante desde el punto de vista industrial, representando alrededor del 60% del mercado internacional de enzimas (Mahajan y Badgujar, 2010). En la industria alimentaria, las proteasas de origen animal (e.g. quimosina, pepsina y tripsina), microbiano (e.g. *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Aspegillus* sp. y *Rhizomucor* sp.) y vegetal (e.g. papaína, bromelina, cardosina y cinarasa) son utilizadas en una gran diversidad de procesos biotecnológicos tales como ablandamiento de carnes (Sullivan y Calkins, 2010), clarificación de bebidas y cerveza (Jones, 2005; Benucci *et al.*, 2011), producción de hidrolizados proteicos funcionales (Chalamaiah *et al.*, 2012; de Castro y Sato, 2015) y como coagulantes en la producción de queso (Roseiro *et al.*, 2003; Machalinski *et al.*, 2006; Mazorra-Manzano *et al.*, 2013b). En la industria láctea, la renina o quimosina es la proteasa utilizada por excelencia para la producción de quesos debido a su eficiencia, permitiendo obtener altos rendimientos en el proceso (Hyslop, 2003). No obstante, debido rápido incremento en la producción de quesos a nivel mundial (3.5% factor de crecimiento), el

*Autor para correspondencia: Jesús M. Moreno-Hernández
Correo electrónico: moreno.jesus@inifap.gob.mx.

Recibido: 21 de septiembre de 2016

Aceptado: 29 de abril de 2017

suministro de quimosina a partir de su fuente natural (estómago de terneros) se ha visto rebasada por la demanda de la industria quesera (Jacob *et al.*, 2011). Esto ha incentivado la búsqueda de fuentes naturales alternativas para la obtención de enzimas con propiedades coagulantes, siendo las plantas una opción atractiva y la más explorada en los últimos años (Fernández-Salguero *et al.*, 2002; Grozdanovic *et al.*, 2013; Beka *et al.*, 2014).

Las plantas como fuente de proteasas coagulantes ofrecen ventajas importantes en términos de disponibilidad de la fuente y diversidad de proteasas activas en una misma planta (Sarmiento *et al.*, 2009; Mazorra-Manzano *et al.*, 2013a). Los ejemplos más destacados son las proteasas de *Cyanara cardunculus*, este "cuajo vegetal" obtenido a partir de sus flores, ha sido utilizado para la producción ancestral de quesos como el Serra da Estrella y La Serena, cuyas características únicas les han permitido su estatus de Denominación de Origen (Jacob *et al.*, 2011). En China, proteasas extraídas del rizoma de jengibre (*Zingiber officinale*) son utilizadas para la producción de una bebida tradicional elaborada a base de leche coagulada (Hashim *et al.*, 2011) y en Nigeria los extractos de *Calotropis procera* (manzana de Sodoma) se han utilizado de manera tradicional para la producción de queso fresco (Aworh y Muller, 1987). Actualmente una gran diversidad de fuentes vegetales han sido exploradas y caracterizadas en busca de proteasas coagulantes con potencial en la industria quesera (Roseiro *et al.*, 2003; Shah *et al.*, 2013).

La gran abundancia y diversidad de la flora silvestre en algunas partes de México, ofrece un gran potencial para la búsqueda y obtención de proteasas de interés biotecnológico. Una planta conocida en como "aguama" o "guamara" (*Bromelia pinguin* L.) ha llamado la atención por la presencia de proteasas en su fruto. Esta especie posee hojas espinosas en rosetas con grandes vainas cubiertas de escamas y desarrolla racimos de 40 cm con la capacidad de producir entre 40-50 frutos de 5 cm de longitud con un peso aproximado de 18.5 g (Fig. 1). Los frutos son sumamente apreciados en algunas regiones por sus propiedades nutritivas y medicinales (Payrol *et al.*, 2005a; Pío-León *et al.*, 2009) y existen algunas propuestas para su aprovechamiento en la preparación de bebidas (Camacho-Díaz *et al.*, 2011). Sin embargo, el fruto sigue siendo subutilizado y/o desechado debido a la poca diversificación de su comercialización, por lo que se pierde un recurso valioso y de gran potencial tecnológico. Estudios previos en variedades de aguama cultivadas en Cuba y Puerto Rico han identificado un grupo de enzimas denominadas pinguinainas (cisteín proteasas) como las principales proteasas del fruto (Payrol *et al.*, 2005b) y evidencias más recientes sugieren la presencia de otras proteasas en este vegetal (Payrol *et al.*, 2008). A la fecha se desconoce el potencial de las proteasas de esta fuente en la industria láctea, por lo tanto el objetivo de esta investigación fue caracterizar parcialmente las propiedades coagulantes y caseinolíticas de las proteasas del fruto de aguama y explorar su potencial como una alternativa al uso de quimosina.

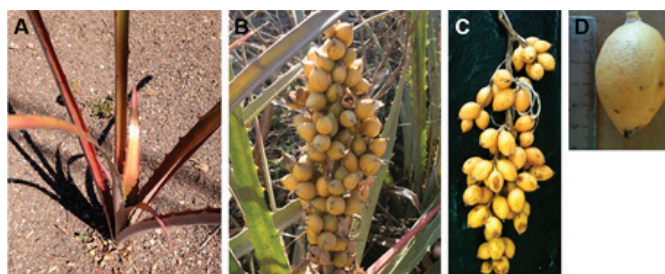


Figura 1. Cultivar silvestre de *Bromelia pinguin* creciendo en Sinaloa. Planta joven (A), planta adulta durante llenado de fruto (B), racimo cosechado (C) y fruto maduro (D).

Figure 1. Typical wild cultivar of *Bromelia pinguin* growing in Sinaloa. Whole young plant (A), mature plant during fruit filling (B), harvested raceme (C) and ripened fruit (D).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y preparación del extracto enzimático

Se colectaron frutos de 5 ejemplares silvestres de "aguama" *Bromelia pinguin* en el municipio de Culiacán, Sinaloa. El material vegetal fue colocado en bolsas plásticas, transportado al laboratorio de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-Culiacán) y almacenado a -30°C hasta su análisis. El extracto enzimático crudo se obtuvo homogenizando la pulpa del fruto (libre de exocarpio y endocarpio) con amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.0 a una relación 1:5 (p:v) en un procesador de alimentos (Osterizer Mexicana, S.A, México). El homogenizado resultante fue filtrado y centrifugado a $20000 \times g$ por 25 min a 4°C (Centrifuga RC-6, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). El sobrenadante obtenido por decantación fue designado como extracto enzimático crudo (EEC) y fue conservado al hielo durante su análisis.

Cuantificación de proteína

La concentración de proteína en EEC fue cuantificada mediante el método de Bradford (1976). El extracto fue incubado con el reactivo de Bradford (0.1:1 v:v) a temperatura ambiente hasta desarrollo de color. La absorbancia a 595 nm registrada en un espectrofotómetro UV-visible (Jenway 6305, Staffordshire, UK) fue utilizada para el cálculo de la concentración de proteína mediante una curva estándar de albumina de suero bovino ($0.05\text{-}0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Actividad coagulante de la leche (ACL)

La ACL de los extractos del fruto de aguama fue determinada de acuerdo a Mazorra-Manzano *et al.* (2013a). Un volumen de 0.5 mL de EEC fue incubado con 10 mL de leche comercial pasteurizada ($<1\%$ de grasa adicionada con 0.02% de CaCl_2) en un rango de temperatura de $25\text{-}90^{\circ}\text{C}$. El tiempo transcurrido desde la adición del extracto hasta la primera aparición de signos de coagulación fue registrado como tiempo de coagulación. El análisis de la ACL fue determinado por triplicado para cada temperatura y con 3 extractos independientes. Una unidad coagulante de la leche expresada en unidades Soxhlet ($\text{SU}\cdot\text{mL}^{-1}$) fue definida como la cantidad de

extracto requerido para coagular 100 mL de leche en 40 min bajo las condiciones del ensayo.

Actividad caseinolítica

La actividad proteolítica fue determinada de acuerdo a Vallés *et al.* (2007) con ligeras modificaciones durante la inactivación de la reacción. Se utilizó como sustrato una solución de Azocaseína al 1% en diferentes sistemas amortiguadores de citrato-NaOH 100 mM (pH 6.0-6.5), Tris-HCl 100 mM (pH 7-9) y glicina-NaOH 100 mM (pH 10-12). La mezcla de reacción consistió en 20 μ L de EEC + 1000 μ L de sustrato. La reacción se llevó a cabo a 35°C por 30 min para posteriormente ser inactivada con la adición de 500 μ L solución de ácido tricloroacético (TCA) al 20% (p:v). Inmediatamente las muestras fueron puestas en baño de hielo durante 20 min para asegurar la inactivación de la reacción. Posteriormente se centrifugaron a 14000 x g durante 10 min a 4°C y la absorbancia del sobrenadante a 366 nm fue utilizada para calcular las unidades caseinolítica (U_{cas}) para cada pH. Un blanco fue preparado bajo el mismo protocolo pero con la adición directa de TCA a la mezcla de reacción. Una unidad de actividad caseinolítica específica ($U_{cas} \cdot mg^{-1}$) fue definida como la cantidad de proteína (mg) que causa un incremento de una unidad de absorbancia respecto al blanco bajo las condiciones del ensayo.

Perfil de hidrólisis de caseínas por electroforesis SDS-PAGE

El perfil de hidrólisis de caseínas por las proteasas del EEC de aguama, fue visualizado incubando una solución de caseína al 1% (p:v) con 20 μ L de EEC a pH 7 (Tris-HCl 100 mM) a 35°C. Se tomaron muestras de las soluciones a diferentes tiempos (0, 10, 20 y 30 min) para monitorear la hidrólisis de caseína. La actividad enzimática de las muestras se inactivó con la adición de amortiguador de carga 2xSDS e incubación a 100°C por 5 min. Se utilizó la metodología propuesta Laemmli (1970) para el análisis por SDS-PAGE.

Zimogramas de actividad

La actividad de proteasas en el EEC fue visualizada en zimogramas de acuerdo a Raposo y Domingos (2008) con algunas modificaciones en la incorporación del sustrato durante la formación del gel. La muestra de EEC fue tratada con amortiguador de carga (Leampli 2xSDS) sin el agente reductor 2-mercaptoetanol y sin tratamiento térmico. Posteriormente fueron cargados en geles de poliacrilamida al 15% (p:v) previamente co-polimerizados con caseína a una concentración final de 0.1% (p:v) de sustrato. La electroforesis se llevó a cabo a 120 V por 90 min en una unidad de electroforesis SE300 mini VE Hoefer (Holliston, MA, USA). Los geles fueron lavados con solución Triton X-100 al 2.5% durante 1 h y lavado tres veces con agua destilada y posteriormente incubados a 35°C por 60 min a pH 6, 7, 8, 9 y 10 en el sistema de amortiguadores antes descrito. Posteriormente los geles fueron teñidos con azul de Coomassie y documentados para su análisis.

Estudios de inhibición

La actividad caseinolítica fue evaluada incubando el EEC en presencia de inhibidores de proteasas como Pepstatina A (1.5 mM), inhibidor de tripsina de soya (SBTI; 5 μ M), tosil-fenilalanil clorometil cetona (TPCK; 5 mM), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; 1 mM), cloruro de mercurio ($HgCl_2$; 5 mM) y ditioneitol (DTT; 5 mM) durante 15 min. Posterior a la incubación, el sustrato (azocaseína al 1% en Tris-HCl 100 mM pH 7) fue agregado a la mezcla de reacción y la actividad se desarrolló a 35°C por 60 min. Las muestras fueron inactivadas con TCA y centrifugadas a 14000 x g durante 10 min. La absorbancia del sobrenadante a 280 nm fue utilizada para el cálculo de la actividad caseinolítica residual (ACR) respecto al control (sin inhibidor).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la actividad coagulante de la leche

La actividad coagulante de la leche (ACL) de los diferentes extractos vegetales propuestos para la producción de quesos muestran un comportamiento característico en función del tipo de proteasa presente en el extracto, su concentración en la fuente y la dependencia a la temperatura de las enzimas responsables de la coagulación (Puglisi *et al.*, 2014). En la Figura 2, se muestra el comportamiento de la ACL y los tiempos de coagulación de los extractos enzimáticos crudos respecto a la temperatura de incubación. Se observó que a medida que aumenta la temperatura del ensayo,

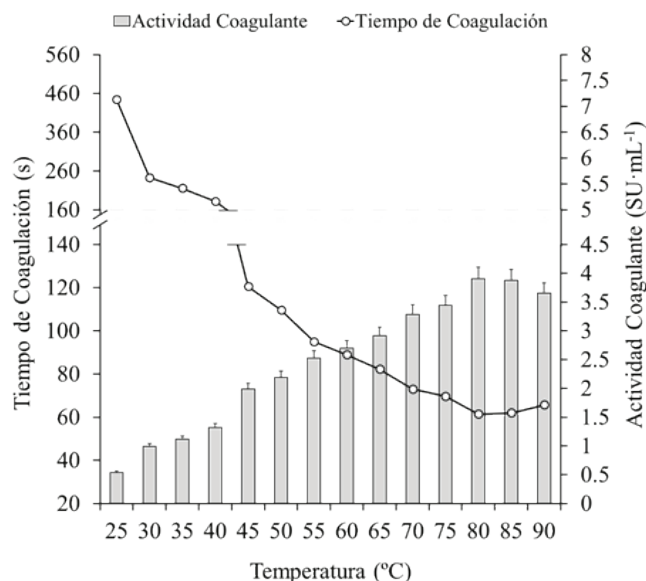


Figura 2. Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad coagulante de la leche de EEC.

La actividad se determinó utilizando como sustrato leche pasteurizada desnatada (0.02% $CaCl_2$). Una unidad de actividad coagulante de la leche fue definida como la cantidad de extracto requerido para coagular 100 mL de leche en 40 min bajo condiciones del ensayo.

Figure 2. Temperature effect on milk-clotting activity of EEC. Milk-clotting activity was assayed employing skim milk (0.02% $CaCl_2$). Milk-clotting unit was defined as the amount of raw extract necessary to clot 100 mL of skim milk in 40 min under assay conditions.

disminuyen los tiempos para conseguir la coagulación de la leche (pH 6.6-6.8; rango normal de la leche). En términos generales, se obtienen tiempos aceptables de coagulación (60-120 s) a temperaturas desde 40-85°C, por lo que el EEC puede usarse en este rango de temperaturas para conseguir la coagulación de la leche en tiempos aceptables. La máxima actividad coagulante se encontró en el rango de 65-85°C, correspondiendo a 3.9 SU·mL⁻¹, la actividad a estas condiciones de temperatura demostró la estabilidad térmica de las proteasas presentes en los extractos del fruto de "aguama". Bajo condiciones tradicionales de producción de queso utilizando quimosina (35-37°C), la actividad coagulante del EEC representó el 25% del máximo observado (aproximadamente 1.1 SU·mL⁻¹). Lo anterior indica que 1 mL de EEC logra coagular aproximadamente 100 mL de leche bajo estas condiciones. Estos resultados son similares a los reportados para otras fuentes vegetales de proteasas coagulantes de la leche; por ejemplo, bajo condiciones óptimas (65°C) se requieren 3 mL de extracto enzimático de flor de naranjo agrio (*Citrus aurantium*) para coagular un volumen de 100 mL de leche (Mazorra-Manzano *et al.*, 2013a). Las flores de *Cynara scolymus* poseen una gran concentración de proteasas coagulantes, por lo que 1 mL de extracto enzimático a partir de este tejido es suficiente para conseguir la coagulación de 400 mL de leche en 10 min a 37°C, lo que explica su éxito en la producción de quesos del Mediterráneo (Chazarra *et al.*, 2007); en contraste, 1 mL de extractos a partir de bayas de *Solanum elaeagnifolium* (trompillo) sólo consigue coagular 80 mL de leche en los primeros 40 min a 32°C (Gutiérrez-Mendez *et al.*, 2012). En términos de actividad coagulante específica, un miligramo de proteína de EEC es capaz de coagular 260 mL de leche en 40 min bajo condiciones tradicionales de coagulación. Esta actividad es comparable con los extractos de melón (*Cucumis melo*), jengibre (*Zingiber officinale*) y kiwi (*Actinidia deliciosa*) en los que un miligramo de proteína es suficiente para coagular 150, 230 y 270 mL de leche, respectivamente (Mazorra-Manzano *et al.*, 2013b). Las propiedades coagulantes del extracto de *B. pinguin* sugieren que esta fuente vegetal, ofrece un gran potencial como fuente de proteasas para coagular la leche, no obstante, se requiere continuar con la evaluación de su uso potencial en procesos biotecnológicos.

Caracterización de la actividad caseinolítica

Con el propósito de conocer la naturaleza de la actividad proteolítica del extracto de *B. pinguin*, se determinó la actividad caseinolítica en el rango de pH 6.0-12.0 (Fig. 3). La máxima actividad caseinolítica se registró a pH 7.5 (2.31 U_{cas}·mg⁻¹), mientras que a pH superior a 10.0 el extracto fue inactivado. Bajo condiciones óptimas de pH se evaluó la actividad caseinolítica con inhibidores específicos de proteasas (Tabla 1). En presencia de HgCl₂ (5 mM) y TPCK (5 mM), el extracto mostró sólo el 2.6% y 66.3% de actividad caseinolítica, respectivamente; lo que confirma la presencia de proteasas tipo cisteína y serina involucradas en la coagulación de las caseínas. La actividad caseinolítica se incrementó ligeramente en presencia de los inhibidores SBTI (1.12 veces) y

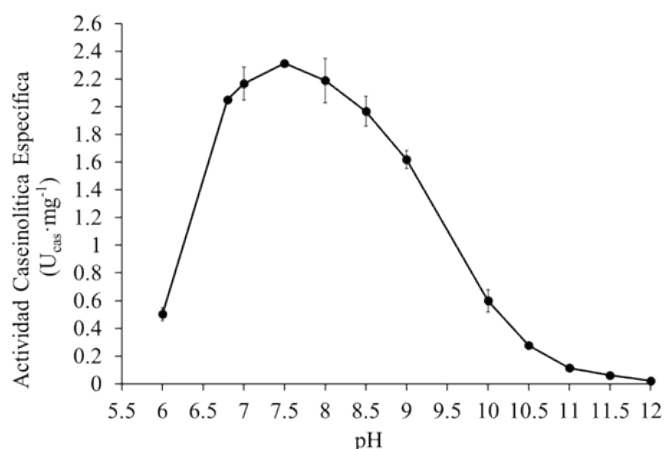


Figura 3. Efecto del pH sobre la actividad caseinolítica del EEA.

La actividad se determinó utilizando Azocaseína como sustrato. Una unidad de actividad caseinolítica específica fue definida como la cantidad de proteína que causa un incremento de una unidad de absorbancia a 366 nm respecto al control bajo las condiciones del ensayo.

Figure 3. pH effect on caseinolytic activity of EEA.

Activity was assayed using Azocasein as substrate. One specific caseinolytic unit was defined as the amount of protein necessary to increase one absorbance unit at 366 nm respect to control under assay condition

Tabla 1. Efecto de inhibidores específicos de proteasas sobre la actividad caseinolítica.

Table 1. Effect of specific protease inhibitors on caseinolytic activity.

Compuesto	Concentración (mM)	Actividad Caseinolítica Residual (%)
Control	Sin inhibidor	100
Pepstatin A	1.5	81.6
SBTI	0.005	112
DTT	5	128
HgCl ₂	5	2.6
EDTA	1	89.7
TPCK	5	66.3

La actividad fue desarrollada a pH 7 a 35°C utilizando caseína como sustrato.

DTT (1.28 veces). Estos resultados son congruentes con los mostrados por Payrol *et al.* (2005b) quienes determinaron que proteasas de tipo cisteína son las principales proteasas activas en los extractos enzimáticos en el fruto de una variedad similar cultivada en Cuba. En reportes más recientes, mediante estudios de análisis estructural (N-terminal) y cinética enzimática, estos autores indican discrepancias en la naturaleza de la actividad proteolítica y sugieren que un grupo distinto de proteasas a las comúnmente encontradas en familia de las Bromeliaceae podrían estar presentes (Payrol *et al.*, 2008).

El análisis SDS-PAGE muestra la hidrólisis de caseínas durante la coagulación por acción de las proteasas presentes

en el EEC de aguama (Fig. 4A). Se observa la aparición de un producto de hidrólisis (aproximadamente 14 kDa) correspondiente a la fracción para- κ -caseína (F_{1-105}), como resultado del posible rompimiento de la kappa-caseína (κ -CN) en su secuencias Phe₁₀₅-Met₁₀₆. Este rompimiento es muy similar al que cataliza la enzima quimosina y es de suma relevancia para el proceso de producción de quesos debido a que esta especificidad está directamente relacionada con mayores rendimientos de producto (Drohse y Foltmann, 1989; Hyslop, 2003). Al prolongar el tiempo de incubación se observó un incremento en la intensidad de la para- κ -caseína. Otras caseínas también fueron susceptibles a la hidrólisis por acción de las proteasas de EEC. Lo anterior implica que es necesario buscar alternativas para disminuir la actividad o inactivar las proteasas de EEC en los primeros 30 min de incubación durante la formación de la cuajada, con el propósito de prevenir una hidrólisis excesiva de las caseínas que repercuta en las propiedades funcionales del gel proteico y en el rendimiento del queso.

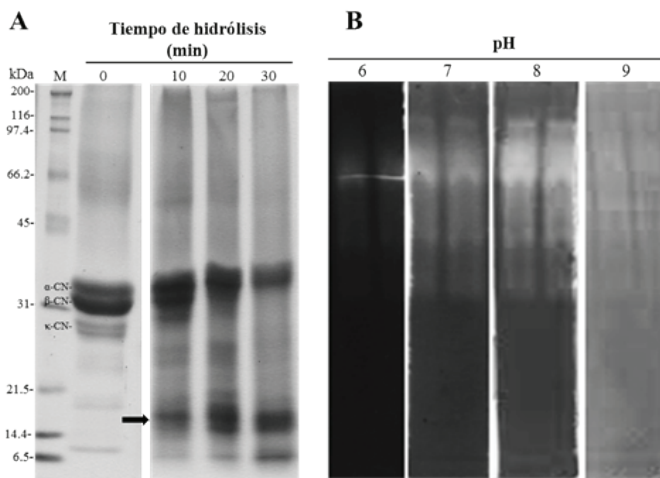


Figura 4. Análisis SDS-PAGE de la hidrólisis de caseínas durante coagulación (A) y actividad caseinolítica por zimograma (B). α -caseínas (α -CN), β -caseínas (β -CN) y κ -caseínas (κ -CN). Marcador de peso molecular (M); Hidrólisis de caseínas monitoreadas durante la coagulación de la leche (pH 7.0/35°C) a 0, 10, 20, 30 min. La actividad caseinolítica es visualizada como zonas claras en el gel. En ambos análisis de cargaron 80 μ g de proteína por carril en geles al 15% de poliacrilamida.

Figure 4. SDS-PAGE analysis of casein hydrolysis during milk coagulation (A) and caseinolytic activity by zymogram (B). α -caseins (α -CN), β -caseins (β -CN) and κ -caseins (κ -CN). Molecular weight marker (M); Casein hydrolysis monitored during milk coagulation conditions (pH 7.0/35°C) at 0, 10, 20, 30 min. Caseinolytic activity is visualized as clear zones in gel. In both analysis 80 μ g of protein were loaded per well in 15% of resolving polyacrylamide gels.

La Figura 4B muestra las diferentes zonas de actividad caseinolítica bajo condiciones en las que ocurre la coagulación de la leche (aprox. pH 7) y en la zona ligeramente alcalina (pH 8-9). Se observan diferentes zonas de actividad caseinolítica intensa, especialmente en el rango de pH 7-8, lo cual es congruente con los resultados obtenidos en la dependencia del EEC respecto al pH (Fig. 3). Este resultado confirma la hipótesis de que diferentes proteasas se encuen-

tran presentes en los extractos de *B. pinguin* y están asociadas a la actividad coagulante de la leche. Con el propósito de explotar el potencial de las diferentes proteasas activas en el EEC, se requieren estudios de purificación y caracterización para confirmar su naturaleza, y así definir sus características bioquímicas y estructurales, para posteriormente explorar nuevas aplicaciones biotecnológicas para las proteasas aisladas del fruto de aguama.

CONCLUSIONES

Los extractos enzimáticos del fruto de *B. pinguin* son una fuente importante de proteasas activas en el rango neutro-alcalino con la capacidad de coagular la leche en tiempos comparables con la quimosina comercial. Aunque los extractos muestran su mayor actividad coagulante en el rango de temperatura de 65 a 85°C, es posible utilizarlos bajo condiciones similares a las del cuajo convencional (35-37°C), obteniendo un cuajado en tiempos aceptables. Debido a la estabilidad térmica de las proteasas y su diversidad en los extractos enzimáticos, resulta necesario realizar estudios más profundos en la purificación y caracterización bioquímica de estas enzimas, para así establecer la aplicación de las proteasas de aguama en la industria quesera y en otras áreas biotecnológicas.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del INIFAP-Culiacán y en el Laboratorio de Compuestos Naturales Bioactivos de la Maestría en Ciencias Aplicadas de la Universidad Politécnica de Sinaloa (UPSIN-Mazatlán).

REFERENCIAS

- Aworh, O.C. y Muller, H.G. 1987. Cheese-making properties of vegetable rennet from sodom apple (*Calotropis procera*). *Food Chemistry*. 26: 71-79.
- Beka, R.G., Krier, F., Botquin, M., Guiama, V.D., Donn, P., Libouga, D.G., Mbofung, C.M., Dimitrov, K., Slomianny, M.-C., Guillochon, D. y Vercaigne-Marko, D. 2014. Characterisation of a milk-clotting extract from *Balanites aegyptiaca* fruit pulp. *International Dairy Journal*. 34: 25-31.
- Benucci, I., Liburdi, K., Garzillo, A.M.V. y Esti, M. 2011. Bromelain from pineapple stem in alcoholic-acidic buffers for wine application. *Food Chemistry*. 124: 1349-1353.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72: 248-254.
- Camacho-Díaz, S.p., Vargas-Delgado, F., Inzunza-Parra, M.A. y Gonzalez-Cristerna, J.L. 2011. Method for preparing beverages containing *Bromelia pinguin*. WPO patent A1 11874204.
- Chalamaiah, M., Dinesh kumar, B., Hemalatha, R. y Jyothirmayi, T. 2012. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*. 135: 3020-3038.
- Chazarra, S., Sidrach, L., Lopez, M.D. y Rodriguez, J.N. 2007.

- Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*. 17: 1393-1400.
- de Castro, R.J.S. y Sato, H.H. 2015. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International*. 74: 185-198.
- Drohse, H.B. y Foltmann, B. 1989. Specificity of milk-clotting enzymes towards bovine κ -casein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 995: 221-224.
- Fernández-Salguero, J., Tejada, L. y Gómez, R. 2002. Use of powdered vegetable coagulant in the manufacture of ewe's milk cheeses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82: 464-468.
- Grozdanovic, M.M., Burazer, L. y Gavrovic-Jankulovic, M. 2013. Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) extract shows potential as a low-cost and efficient milk-clotting agent. *International Dairy Journal*. 32: 46-52.
- Hashim, M.M., Dong, M., Iqbal, M.F., Li, W. y Chen, X. 2011. Ginger protease used as coagulant enhances the proteolysis and sensory quality of Peshawari cheese compared to calf rennet. *Dairy Science & Technology*. 91: 431-440.
- Hyslop, D.B. 2003. Enzymatic coagulation of milk. En: *Advanced Dairy Chemistry-1 Proteins: Part A*. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (ed.), pp 839-878. Springer, Boston, USA.
- Jacob, M., Jaros, D. y Rohm, H. 2011. Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*. 64: 14-33.
- Jones, B.L. 2005. Endoproteases of barley and malt. *Journal of Cereal Science*. 42: 139-156.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Machalinski, C., Pirpignani, M.L., Marino, C., Mantegazza, A. y de Jiménez Bonino, M.B. 2006. Structural aspects of the *Mucor bacilliformis* proteinase, a new member of the aspartyl proteinase family. *Journal of Biotechnology*. 123: 443-452.
- Mahajan, R.T. y Badgujar, S.B. 2010. Biological aspects of proteolytic enzymes: a review. *Journal of Pharmacy Research*. 3: 2048-2068.
- Mazorra-Manzano, M.A., Moreno-Hernández, J.M., Ramírez-Suarez, J.C., Torres-Llanez, M.d.J., González-Córdova, A.F. y Vallejo-Córdoba, B. 2013a. Sour orange *Citrus aurantium* L. flowers: A new vegetable source of milk-clotting proteases. *LWT-Food Science and Technology*. 54: 325-330.
- Mazorra-Manzano, M.A., Perea-Gutiérrez, T.C., Lugo-Sánchez, M.E., Ramírez-Suarez, J.C., Torres-Llanez, M.J., González-Córdova, A.F. y Vallejo-Córdoba, B. 2013b. Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. *Food Chemistry*. 141: 1902-1907.
- Gutiérrez-Mendez, N., Chávez-Garay, D.R. y Jiménez-Campos, H. 2012. Exploring the milk-clotting properties of a plant coagulant from the berries of *S. elaeagnifolium* var Cavanilles. *Journal of Food Science*. 77: 89-94.
- Payrol, J., Obregón, W., Trejo, S. y Caffini, N. 2008. Purification and characterization of four new cysteine endopeptidases from fruits of *Bromelia pinguin* L. grown in Cuba. *The Protein Journal*. 27: 88-96.
- Payrol, J.A., Mosquera, D.M.G. y Meneses, A. 2005a. Determinación de parámetros farmacognósticos y bromatológicos y evaluación de la actividad antiparasitaria de una preparación obtenida del fruto de *Bromelia pinguin* L. que crece en Cuba. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. 24: 377-382.
- Payrol, J.A., Obregón, W.D., Natalucci, C.L. y Caffini, N.O. 2005b. Reinvestigation of the proteolytically active components of *Bromelia pinguin* fruit. *Fitoterapia*. 76: 540-548.
- Pío-León, J.F., López-Angulo, G., Paredes-López, O., Uribe-Beltrán, M.d.J., Díaz-Camacho, S.P. y Delgado-Vargas, F. 2009. Physicochemical, nutritional and antibacterial characteristics of the fruit of *Bromelia pinguin* L. *Plant Foods for Human Nutrition*. 64: 181-187.
- Puglisi, I., Petrone, G. y Lo Piero, A.R. 2014. A kiwi juice aqueous solution as coagulant of bovine milk and its potential in Mozzarella cheese manufacture. *Food and Bioprocess Technology*. 92: 67-72.
- Raposo, S. y Domingos, A. 2008. Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures. *Process Biochemistry*. 43: 139-144.
- Roseiro, L.B., Barbosa, M., Ames, J.M. y Wilbey, R.A. 2003. Cheesemaking with vegetable coagulants-the use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*. 56: 76-85.
- Sarmiento, A., Lopes, H., Oliveira, C., Vitorino, R., Samyn, B., Sergeant, K., Debyser, G., Beeumen, J., Domingues, P., Amado, F., Pires, E., Domingues, M.R. y Barros, M. 2009. Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* L. *Planta*. 230: 429-439.
- Shah, M.A., Mir, S.A. y Paray, M.A. 2013. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science & Technology*. 94: 5-16.
- Sullivan, G.A. y Calkins, C.R. 2010. Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat Science*. 85: 730-734.
- Vallés, D., Furtado, S. y Cantera, A.M.B. 2007. Characterization of news proteolytic enzymes from ripe fruits of *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). *Enzyme and Microbial Technology*. 40: 409-413.