

Artículo Original / Original Article

Obtención de hidrolizados proteicos de leguminosas usando una proteasa recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* M211

Obtaining protein hydrolysates from leguminous using a recombinant protease from *Pseudomonas aeruginosa* M211

RESUMEN

El género *Pseudomonas* es una fuente importante de proteasas; sin embargo, su uso está restringido en la industria alimentaria. El clonaje permite aprovechar la capacidad catalítica de estas enzimas mediante su producción en microorganismos inoocuos. Por otro lado, las leguminosas son fuentes ricas en proteínas, a partir de las cuales se pueden obtener compuestos con valor agregado mediante procesos de hidrólisis enzimática. En este estudio, se produjo y caracterizó una proteasa recombinante (PT4) alcalina y termoestable de *Pseudomonas aeruginosa* M211, para la obtención de hidrolizados proteicos de leguminosas. Para ello, el gen de la proteasa se clonó en el vector pJET1.2/blunt utilizando *E. coli* DH5 α como hospedero. El análisis de la secuencia nucleotídica parcial de la proteasa indicó un 99 % de similitud con Peptidasas de la Familia M4 de *Pseudomonas aeruginosa*. La enzima recombinante presentó un peso molecular de 80 kDa, demostró ser activa y estable en condiciones alcalinas y termófilas con un pH y temperatura óptimos de 8 y 60 °C, respectivamente, y fue inhibida por EDTA. Además, hidrolizó proteínas de semillas de *Glycine max*, *Phaseolus lunatus*, *Lupinus mutabilis* y *Erythrina edulis*, obteniéndose fracciones peptídicas menores a 40 kDa. Esta proteasa recombinante se podría utilizar en la elaboración de hidrolizados proteicos funcionales a partir de proteínas de distintas fuentes y residuos agroalimentarios. Palabras clave: Hidrolizados proteicos; Leguminosas; *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

The genus *Pseudomonas* is an important source of proteases; however, in the food industry the use of this bacterium is restricted. Cloning allows for the use of the proteolytic activity of *Pseudomonas* proteases through their production in innocuous microorganisms. Leguminous are protein-rich sources from which value-added compounds can be obtained through enzymatic hydrolysis. In this study, an alkaline and thermostable recombinant protease (PT4) from *Pseudomonas aeruginosa* M211 was cloned and characterized in order to obtain protein hydrolysates from leguminous. Therefore, protease gene was cloned into the pJET1.2 / blunt

MSayuri Kina-Ysa¹, Carol N. Flores-Fernández^{1*},
JC Flores-Santos¹, Amparo I. Zavaleta¹.

1. Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima – Perú.

*Dirigir correspondencia a: Carol Nathali Flores Fernández. Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima – Perú. Jr. Puno 1002. Lima-Perú. Teléfono: + 51 980 553 650. E-mail: nathalifloresf@gmail.com

Este trabajo fue recibido el 31 de marzo de 2019.
Aceptado con modificaciones: 13 de diciembre de 2019.
Aceptado para ser publicado: 22 de diciembre de 2019.

vector using *E. coli* DH5 α as a host. Analysis of protease partial nucleotide sequence showed 99% homology with Peptidasas M4 Family from *Pseudomonas aeruginosa*. The molecular weight of the recombinant enzyme was 80 kDa, it was active and stable under alkaline and thermophilic conditions, presented an optimum pH and temperature of 8 and 60 °C, respectively, and was inhibited by EDTA. In addition, it hydrolysed *Glycine max*, *Phaseolus lunatus*, *Lupinus mutabilis* y *Erythrina edulis* proteins, obtaining peptide fractions less than 40 kDa. This recombinant protease could be used in the elaboration of functional hydrolysates using protein from different sources and agricultural waste. Key words: Cloning; Leguminous; Protease; Protein hydrolysates; *Pseudomonas aeruginosa*.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, se busca que los procesos industriales permitan conservar el medio ambiente. Una alternativa a ello, es el desarrollo de procesos biotecnológicos que utilicen microorganismos y enzimas para la obtención de productos. Así, la demanda de enzimas en la industria está en constante aumento debido a las ventajas económicas y a los procesos sostenibles que generan¹. Dentro del mercado global de enzimas, las proteasas constituyen el grupo con mayor aplicación en diferentes campos tales como las industrias: alimentaria, peletera, textil, cosmética, médica, química, entre otras. Asimismo, se calcula que las proteasas representan el 60% del mercado mundial de enzimas².

Los microorganismos producen diferentes tipos de enzimas como parte de su metabolismo y defensa. Estas enzimas tienen gran demanda e importancia en la industria debido a su bajo costo, alta tasa de producción, disponibilidad y estabilidad, lo cual disminuye los costos de producción. En este contexto, *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista presente en diversos ecosistemas, tanto acuáticos como terrestres, y productor de una gran variedad de enzimas proteolíticas extracelulares. Sin embargo, el uso de esta bacteria está restringido en la industria alimentaria, más no el de sus enzimas³. Por ello, a través del clonaje, es posible aprovechar la gran capacidad catalítica de estas proteasas y evaluar su potencial industrial, ya que esta técnica permite producir la enzima de interés en microorganismos inoocuos, de fácil manejo y aplicarla sin ningún riesgo. Además, la producción de proteasas recombinantes tiene otras ventajas como una mayor tasa de producción y procesos de purificación más simples y baratos¹.

Por otro lado, las leguminosas son una fuente importante de proteínas, a partir de las cuales se pueden obtener productos con valor agregado tales como hidrolizados proteicos o péptidos con actividad biológica, ambos de gran importancia en la industria alimentaria^{4,5,6,7}. Asimismo, se han publicado estudios de hidrólisis de proteínas de leguminosas con diversas enzimas comerciales tales como Alcalasa[®], pepsina, pancreatina, Thermolysin[®] y Flavourzyme[®], con el objetivo de mejorar sus propiedades funcionales y nutricionales; y de obtener compuestos con actividad biológica beneficiosa para la salud humana^{8,9,10}. Es así que, *Lupinus mutabilis* (tarwi), *Phaseolus lunatus* (pallar de Ica), *Glycine max* (soya) y *Erythrina edulis* (pajuro) presentan un porcentaje de proteínas entre 18 y 50%, lo cual las convierte en fuentes proteicas atractivas para la nutrición y la industria^{11,12,13,14,15}. Por todo ello, el objetivo de esta investigación fue producir una proteasa recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* M211, caracterizarla para determinar sus condiciones óptimas de reacción y estabilidad; y aplicarla para la obtención de hidrolizados proteicos de leguminosas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y condiciones de cultivo

Pseudomonas aeruginosa M211 (número de acceso GenBank MH130225) fue aislada de muestras de suelo de

los aguajales (*Mauritia flexuosa*) de Tambopata en Madre de Dios¹⁶. La cepa fue reactivada en caldo Luria Bertani (LB) a 37 °C por 24 h. *Escherichia coli* DH5 α se utilizó como hospedera y el plásmido pJET1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific, USA) como vector de clonaje. Las cepas de *E. coli* DH5 α conteniendo los plásmidos recombinantes se seleccionaron en caldo LB con ampicilina (Amresco, USA) (100 μ g/mL).

Amplificación y clonaje del gen de proteasa PT4

El gen de la proteasa PT4 fue amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores forward 5'-CCTGATCKGCGCGATAACTGCAAT-3' y reverse 5'-GGAAGACASCTATCAATTCGAACAG-3'¹⁷. La mezcla de reacción contenía 0,8 μ M de cada cebador, 200 μ M de cada dNTP, KCl 50 mM, Tris/HCl 10 mM, tritón X-100 0,1% (v/v), MgCl₂ 1,5 mM, Taq ADN-polimerasa 1,5 U y ADN 50 ng, con un volumen final de 25 μ L. Las condiciones de reacción fueron: 94 °C por 4 m, seguido por 35 ciclos a 94 °C por 45 s, 55 °C por 1 m y 72 °C por 45 s, con una extensión final a 72 °C por 7 m (termociclador PerkinElmer[®] 2.400). El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El clonaje se realizó siguiendo el protocolo del kit comercial CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), el cual contiene al vector pJET1.2/blunt linearizado con extremos romos y una ADN polimerasa termoestable con actividad correctora, la cual genera extremos romos en el producto de PCR del gen de interés, de tal manera que pueda ligarse a los extremos del vector. La preparación de las células competentes de *E. coli* DH5 α y la transformación fueron realizadas según el método descrito por Hanahan¹⁸. Finalmente, los clones recombinantes se analizaron mediante PCR de colonia, usando los cebadores del kit CloneJET PCR Cloning Kit (pJET1.2 forward y reverse); y extracción de los plásmidos recombinantes usando el kit Cyclo-Prep Plasmid DNA Purification Kit (Amresco, USA). En ambos casos, el gen clonado fue secuenciado por la compañía MacroGen (Corea del Sur) y la secuencia depositada en el GenBank.

Expresión de la proteasa recombinante PT4

E. coli DH5 α conteniendo el gen de la proteasa PT4 se cultivó en caldo LB con ampicilina 100 μ g/mL a 37 °C y 120 rpm por 12 h. Alícuotas de este cultivo se inocularon en matraces con 100 mL de caldo LB suplementado con ampicilina. Luego de 72 h de incubación, los cultivos se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 m a 4 °C. El precipitado celular se resuspendió en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7 y se realizó la lisis celular por sonicación (10 s encendido y 10 s apagado por 10 ciclos a 10 μ m de amplitud). Después de la lisis, la suspensión se centrifugó a 10.000 rpm por 10 m a 4 °C, se recuperó el sobrenadante (lisado celular), el cual fue concentrado 10 veces con una membrana de 10 kDa, y se mantuvo a 4 °C para los ensayos posteriores. Además, para demostrar la expresión de la proteasa recombinante PT4, se colocaron 10 μ L del lisado celular

en placas con agar skim milk o gelatina (1%), las cuales se incubaron a 37 °C por 24 h. Las placas se revelaron con ácido tricloroacético (ATC) al 10%, donde la formación de halos translúcidos indicó la hidrólisis por parte de la proteasa recombinante.

Ensayo de la actividad enzimática

La actividad de la proteasa recombinante PT4 se determinó en el lisado celular usando azocaseína (Sigma-Aldrich, USA) como sustrato, siguiendo la metodología descrita por Coêlho y col¹⁹ con algunas modificaciones. Se mezclaron 500 µL de azocaseína al 0,6% en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8 con 500 µL del lisado celular, se incubó a 37 °C por 30 m se adicionaron 500 µL de ATC al 10% y se centrifugó a 10.000 rpm por 10 m. Finalmente, 100 µL del sobrenadante fueron transferidos a una microplaca de 96 pocillos y se mezclaron con 100 µL de NaOH 500 mM. La absorbancia se determinó a 440 nm. Para cada muestra se preparó un blanco de reacción, en donde el ATC fue añadido a la azocaseína antes de la adición del lisado celular para inactivar la enzima. La actividad fue expresada en U/mL, donde una unidad de actividad es definida como la cantidad de enzima que aumenta en 0,001 la absorbancia de azocaseína hidrolizada por minuto de reacción.

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó usando el método de Bradford²⁰ siguiendo el protocolo para microensayo, usando 20 µL de lisado celular y 180 µL de reactivo. El blanco consistió en 20 µL de agua destilada y la misma cantidad de reactivo usado para las muestras. La absorbancia fue medida a 595 nm y se usó Albúmina Sérica Bovina (BSA) como estándar.

Zimograma de la proteasa recombinante PT4

El zimograma se realizó según el método descrito por Caballero y col²¹ con algunas modificaciones. Para ello, se copolimerizó caseína al 1% (p/v) en un gel de poli(acrilamida al 12%). La muestra (10 µg de proteína total) fue tratada en condiciones no desnaturizantes usando tampón de carga libre de β-mercaptoetanol y sin someterla a calentamiento. Luego de la corrida electroforética, el gel fue sumergido en tampón renaturalizante conteniendo Tritón X-100 2,5% (v/v) en Tris-HCl 50 mM pH 8. Luego de 20 m, se transfirió al tampón de actividad conteniendo NaCl 100 mM en Tris-HCl 50 mM pH 9 y se incubó a 37 °C por 24 h. Finalmente, se reveló con Azul de Coomassie R-250 0,5%, donde la aparición de una zona clara indicó la actividad de la enzima. Se utilizó el marcador de peso molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Standard Protocol (Thermo Fisher Scientific, USA).

Determinación del pH y la temperatura óptimos de la proteasa recombinante PT4

La determinación del pH óptimo se realizó a 37 °C usando azocaseína al 0,6% en los siguientes tampones a

50 mM: acetato (pH 4 y 5), fosfato de sodio (pH 6 y 7), Tris-HCl (pH 8 y 9) o glicina-NaOH (pH 10). La temperatura óptima se determinó en el rango de 20 a 100 °C (intervalos de 10 °C) usando azocaseína 0,6% en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8. La actividad enzimática se determinó según el procedimiento descrito anteriormente.

Termoestabilidad de la proteasa recombinante PT4

El efecto de la temperatura en la estabilidad de la enzima recombinante se determinó usando azocaseína 0,6% en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8. La enzima fue incubada a 40; 50 y 60 °C por 1, 2, 3, 4, 8 y 24 h. Los resultados fueron expresados como actividad residual respecto a la actividad enzimática inicial.

Efecto de los inhibidores en la actividad de la proteasa recombinante PT4

El efecto de los inhibidores en la enzima recombinante se evaluó incubando el lisado celular en Tris-HCl 50 mM pH 8 en presencia de PMSF (10 mM), EDTA (10 mM), E-64 (100 µM) o Pepstatin (25 µM) a 22 °C. Después de 1 h de incubación, se determinó la actividad proteolítica y se calculó la actividad residual (%) respecto a la actividad en ausencia de inhibidores.

Efecto de iones metálicos en la actividad de la proteasa recombinante PT4

La enzima recombinante se incubó con FeSO₄, CaCl₂, MgCl₂, MnSO₄ y ZnSO₄ (10 mM) a 22 °C por 1 h. Posteriormente, se determinó la actividad enzimática y se calculó la actividad residual con respecto a la actividad en ausencia de iones metálicos.

Hidrólisis enzimática de proteínas de leguminosas

Las proteínas de las semillas de *Lupinus mutabilis*, *Phaseolus lunatus*, *Glycine max* y *Erythrina edulis* se extrajeron según el método reportado por Intiquilla y col^{10,22} y se hidrolizaron con la proteasa recombinante PT4 (lisado celular). La enzima comercial Alcalasa® (Sigma-Aldrich, USA) se usó como control. La hidrólisis se realizó usando una relación enzima/sustrato de 1:50 (p/p de proteína), pH 8 y 50 °C durante 2 h. La reacción enzimática se detuvo calentando la mezcla a 100 °C por 10 m. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 10.000 rpm por 10 m. El sobrenadante se utilizó para determinar la concentración de proteínas residuales y el perfil electroforético.

SDS-PAGE de los hidrolizados de leguminosas

Las proteínas totales y los hidrolizados de las leguminosas fueron analizados mediante electroforesis en geles de poli(acrilamida al 12%) con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) según método reportado por Laemmli²³. Las muestras (10 µg de proteína total) se analizaron en condiciones desnaturizantes usando SDS 2% y β-mercaptoetanol; y fueron sometidas a 100 °C por 10 m. Se utilizó el marcador de peso molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Standard Protocol.

RESULTADOS

Clonaje y expresión del gen de proteasa PT4

El gen amplificado de la proteasa PT4 de *Pseudomonas aeruginosa* M211 presentó un tamaño aproximado de 1.500 bp. La secuencia nucleotídica parcial de la enzima recombinante consistió de 961 bp y fue depositada en el GenBank (número de acceso MK085974). El análisis por BLASTx indicó 99% de similitud con Peptidasas de la Familia M4 de *Pseudomonas aeruginosa* (Elastasa B). La actividad de PT4 en el lisado celular fue de 2,53 U/mL. En el ensayo de actividad en placas con agar usando skim milk o gelatina como sustratos, se observaron halos de hidrólisis de 28 y 23 mm, respectivamente. Además, la expresión de PT4 fue confirmada mediante un zimograma usando caseína como sustrato, el cual también permitió estimar su peso molecular, observándose una banda de aproximadamente 80 kDa (Figura 1).

Efecto del pH y la temperatura en la actividad de la proteasa PT4

La proteasa PT4 presentó mayor actividad sobre azocaseína a pH 8 y 60 °C (Figura 2). Además, cabe resaltar que conservó el 70% de actividad a pH 9; demostrando que es una proteasa alcalina. Asimismo, la enzima fue activa en un amplio rango de temperatura, manteniendo el 98 y 60% de actividad a 50 y 70 °C, respectivamente.

Termoestabilidad de la proteasa PT4

La proteasa PT4 presentó gran estabilidad a 40 y 50 °C, manteniendo el 96 y 74% de actividad, respectivamente luego de 24 h. En tanto, a 50 °C conservó más del 90% de actividad luego de 4 h, mientras que a 60 °C mantuvo el 90% luego de 2 h y solo 3% luego de 24 h (Figura 3).

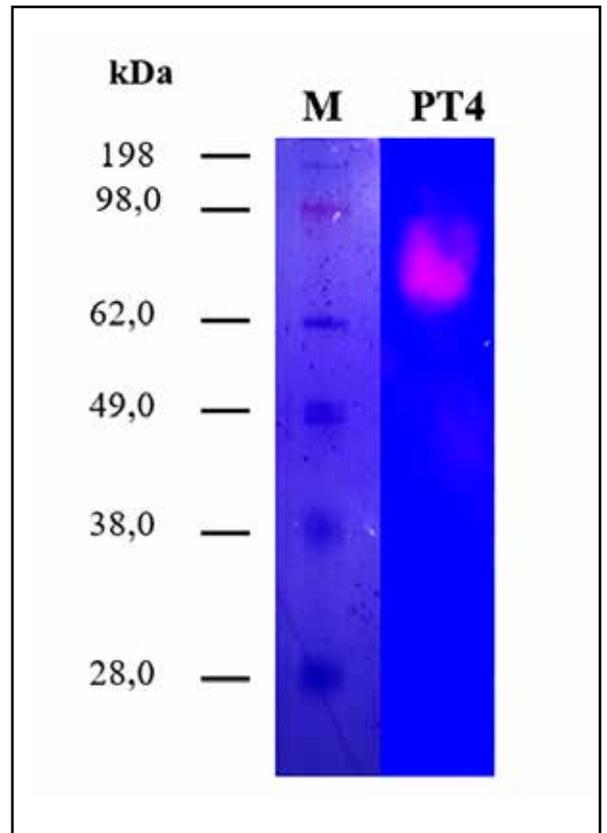


Figura 1: Zimograma de la proteasa recombinante PT4 de *Pseudomonas aeruginosa* M211. PT4, lisado celular de la proteasa recombinante; M, marcador de peso molecular.

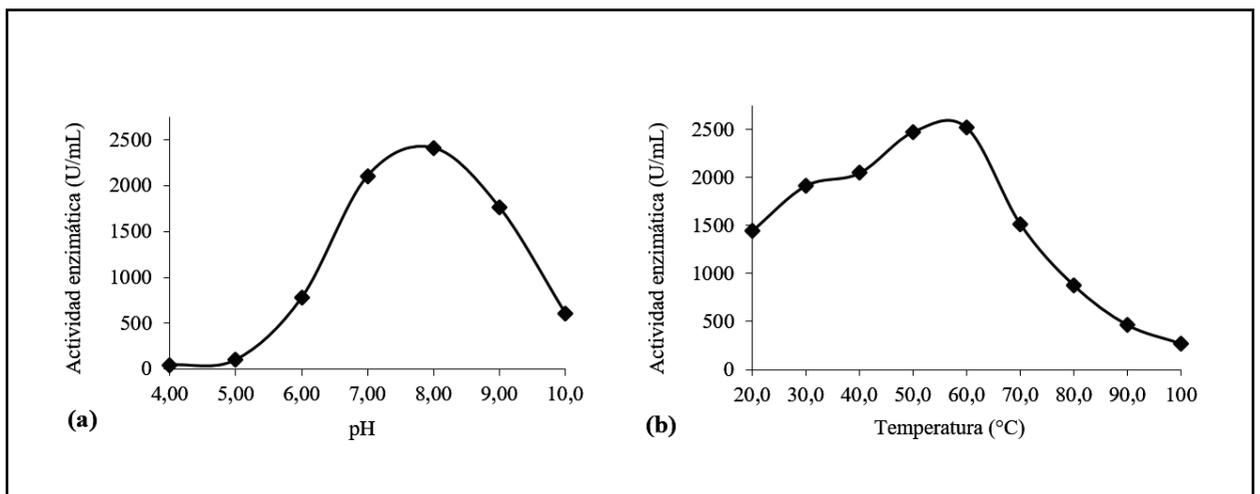


Figura 2: (a) pH y (b) temperatura óptimos de la proteasa recombinante PT4 de *Pseudomonas aeruginosa* M211. Las barras de error representan la media del duplicado \pm DE.

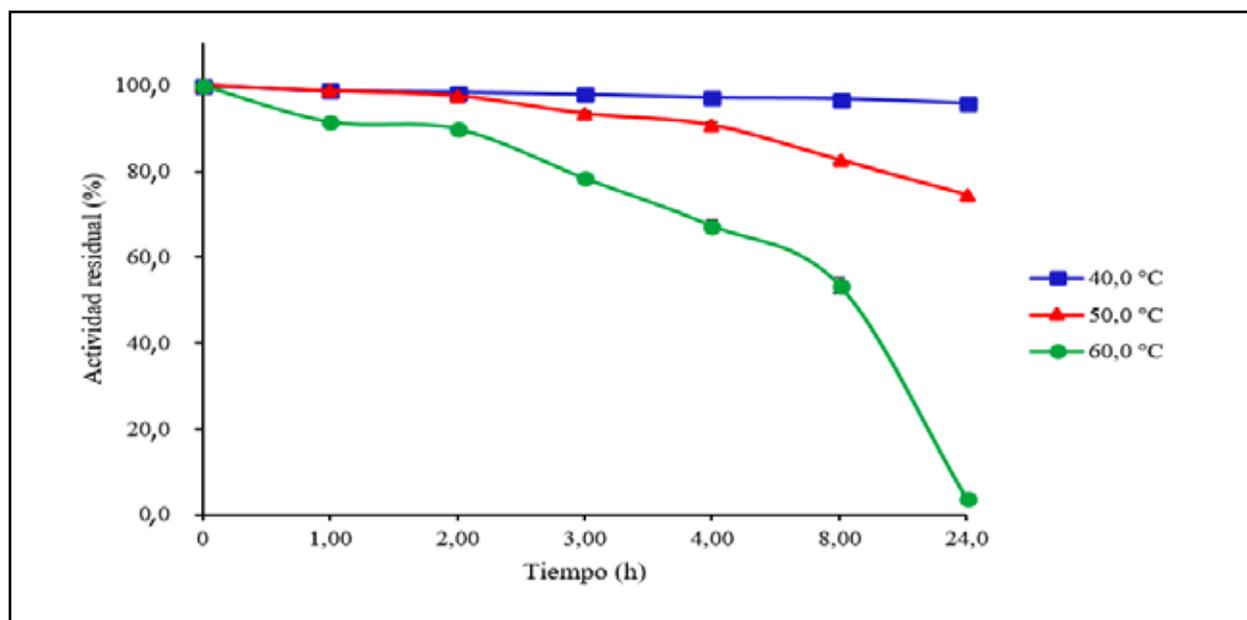


Figura 3: Termostabilidad de la proteasa recombinante PT4 de *Pseudomonas aeruginosa* M211. Las barras de error representan la media del duplicado \pm DE.

Efecto de los inhibidores e iones metálicos en la actividad de la proteasa PT4

Los resultados obtenidos mostraron que los inhibidores PMSF (serín proteasas), E-64 (cisteín proteasas) y Pepstatin (aspartil proteasas) no redujeron significativamente la actividad de la enzima. La actividad de la proteasa PT4 fue inhibida en 74%

por EDTA 10 mM, un inhibidor de metaloproteasas (Tabla 1).

Asimismo, los iones Mg^{+2} y Mn^{+2} no afectaron la actividad de la proteasa PT4. En tanto, en presencia de Ca^{+2} y Fe^{+2} la enzima presentó el 87 y 64% de actividad residual, respectivamente y en presencia de Zn^{+2} solo el 5% (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de los inhibidores e iones metálicos en la actividad de la proteasa recombinante PT4 de *Pseudomonas aeruginosa* M211.

Inhibidor/Ion	Concentración	Actividad residual (%)
Control	–	100,0
EDTA	10 mM	26,3 \pm 2,2
E-64	100 μ M	85,2 \pm 3,9
Pepstatin A	25 μ M	86,3 \pm 1,5
PMSF	10 mM	95,7 \pm 2,9
Fe^{+2}	10 mM	64,4 \pm 3,2
Ca^{+2}	10 mM	87,3 \pm 0,9
Mg^{+2}	10 mM	96,1 \pm 1,4
Mn^{+2}	10 mM	99,6 \pm 0,2
Zn^{+2}	10 mM	5,0 \pm 1,7

EDTA= ácido etilendiaminetetraacético, E-64=trans-epoxisuccinil-L-leucolamido (4-guanidino) butano. Los valores de actividad residual fueron expresados como media del duplicado \pm DE.

Hidrólisis enzimática de proteínas de leguminosas

La hidrólisis de las proteínas de leguminosas con la proteasa recombinante PT4 de *Pseudomonas aeruginosa* M211 se realizó a pH 8 y 50 °C durante 2 h, condiciones establecidas en relación a los resultados de mejor estabilidad de la proteasa. La enzima PT4 hidrolizó gran porcentaje de las proteínas de *Glycine max* y *Erythrina edulis*, pues se determinó solo un 8,4 y 19,7% de proteínas residuales; respectivamente. Por su parte, Alcalasa® hidrolizó las proteínas de *Glycine max* en su totalidad; y en el caso de las proteínas de *Erythrina edulis*, se determinó 8,4% de proteínas residuales. En la

hidrólisis de proteínas de *Phaseolus lunatus*, se resalta que la acción de la proteasa PT4 fue mejor que la de Alcalasa®, ya que los valores de proteínas residuales fueron 20,3 y 45,4%; respectivamente. Con relación a las proteínas de *Lupinus mutabilis*, la actividad de la enzima recombinante fue menor que el de Alcalasa® (Tabla 2).

En la figura 4, se observan los perfiles electroforéticos de las proteínas de las leguminosas *Phaseolus lunatus*, *Glycine max* y *Erythrina edulis* antes y después de la hidrólisis con PT4 y Alcalasa®. En el caso de *Erythrina edulis*, los perfiles proteicos después de la hidrólisis con PT4 y Alcalasa® fueron similares.

Tabla 2. Proteínas residuales de leguminosas después de la hidrólisis con la proteasa recombinante PT4 de *Pseudomonas aeruginosa* M211.

Proteínas	Proteína residual (%)	
	Alcalasa®	PT4
<i>Lupinus mutabilis</i>	0	42,3 ± 1,6
<i>Glycine max</i>	0	8,4 ± 1,2
<i>Phaseolus lunatus</i>	45,4 ± 1,2	20,3 ± 0,8
<i>Erythrina edulis</i>	8,4 ± 0,9	19,7 ± 1,4

Los valores de proteína residual fueron expresados como media del duplicado ± DE.

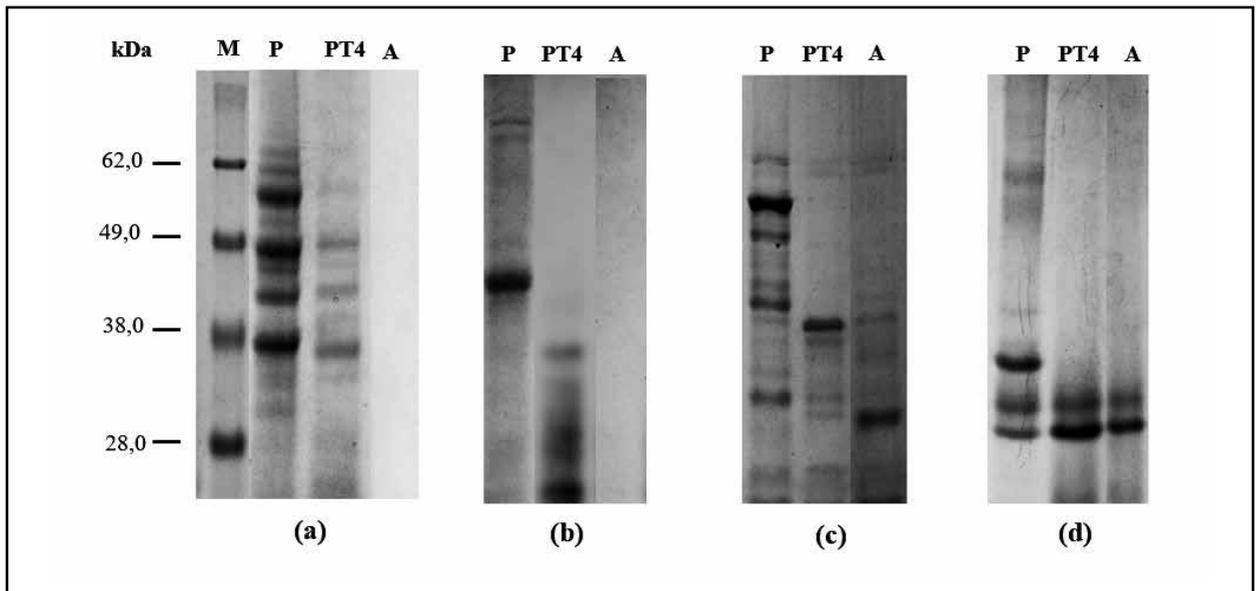


Figura 4: SDS-PAGE de los hidrolizados de proteínas de leguminosas con la proteasa recombinante PT4 de *Pseudomonas aeruginosa* M211. (a) *Lupinus mutabilis*, (b) *Glycine max*, (c) *Phaseolus lunatus* y (d) *Erythrina edulis*. MP, marcador de peso molecular; P, proteínas totales; PT4, Proteasa recombinante; A, Alcalasa®.

DISCUSIÓN

La Elastasa B de *Pseudomonas aeruginosa* es una proteína de 498 aminoácidos codificada por un gen de 1.497 bp. El tamaño del gen amplificado por PCR y analizado en un gel de agarosa al 1% fue de aproximadamente 1.500 bp. En tanto, la secuencia nucleotídica parcial de la proteasa recombinante PT4 depositada en el GenBank, mostró 99% de similitud con Peptidasas de la Familia M4 de *Pseudomonas aeruginosa*, principalmente con Elastasa B.

La enzima recombinante PT4 presentó un peso molecular de aproximadamente 80 kDa (Figura 1), mayor a lo reportado por Gupta y col²⁴ para una Elastasa B de *Pseudomonas cepa* PseA. El peso molecular determinado por estos autores fue de 53,6 kDa e incluyó 2,6 kDa del péptido señal; 18,1 kDa del pro péptido y 33 kDa de la proteína madura. Sin embargo, en otro estudio, fue descrita una Elastasa B de *Pseudomonas aeruginosa* PA103 con un peso molecular de 80 kDa determinado por zimograma. En la literatura científica se ha reportado pesos moleculares para esta proteasa que varían los desde los 18 hasta los 100 kDa^{25,26}.

El pH y temperatura óptimos encontrados para la proteasa PT4 (Figura 2) coinciden con los reportados por otros autores para Elastasa B de *Pseudomonas aeruginosa*^{27,28,29}. Aunque también se han reportado pH óptimos de 5,8; 6; 6,5; 7 y 7,5³⁰, así como temperaturas óptimas de 25; 30; 37; 50 y 55 °C³¹.

En relación a la estabilidad a la temperatura (Figura 3), la enzima PT4 demostró ser termoestable por periodos más prolongados (hasta 24 h) respecto a otras enzimas de este tipo descritas en investigaciones previas. Por ejemplo, Ghorbel-Bellaaj y col²⁹ reportaron una Elastasa B de *Pseudomonas aeruginosa* que a 40 °C mantuvo el 100% de actividad luego de 1 h de incubación, mientras que a 50 y 60 °C conservó el 80 y 60%, respectivamente. En tanto, Han y col³², describieron una Elastasa B recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* que a 60 °C no perdió actividad después de 30 m de incubación. Gupta y col²⁷ indicaron que Elastasa B mantuvo su actividad a 60 °C por 30 m, mientras que a 65 y 70 °C disminuyó a 70 y 20%, respectivamente luego de 10 m. Es importante considerar que la termoestabilidad podría estar influenciada por la presencia de iones metálicos como lo reportado para una Elastasa B que no perdió actividad a 70 °C por 10 m, pero en presencia Ca⁺²³³.

Por otro lado, la actividad de la proteasa recombinante PT4 fue inhibida por EDTA, demostrando que pertenece al grupo de las metaloproteasas (Tabla 1), lo cual coincide con lo reportado por otros investigadores para Elastasa B. Andrejko y col¹⁷ reportaron que la enzima Elastasa B nativa de *Pseudomonas aeruginosa* fue completamente inhibida por EDTA 6 mM. Asimismo, Gupta y col²⁷ y Ghorbel-Bellaaj y col²⁹, describen que EDTA 5 mM inhibió aproximadamente el 75% de la actividad de Elastasa B de *Pseudomonas aeruginosa*.

Respecto al efecto de los iones metálicos, algunos

estudios han reportado que el Zn⁺² es necesario para la actividad; mientras otros, como en este trabajo, que la inhibe. El catión Ca⁺² pese a ser descrito como estabilizador de la estructura terciaria de la enzima, en nuestra investigación produjo pérdida de la actividad en 12%. Por otro lado, se ha encontrado que los cationes Mg⁺² o Mn⁺² disminuyen la actividad de la Elastasa B^{27,29,32,33}, contrario a lo observado en los resultados obtenidos en la tabla 1.

En la hidrólisis enzimática de las proteínas de leguminosas, la proteasa comercial más ampliamente usada en la industria alimentaria para la obtención de hidrolizados proteicos y péptidos es Alcalasa®, la cual presenta pH y temperatura óptimos de 8 y 50 °C, respectivamente. Además, con Alcalasa® se han obtenido hidrolizados proteicos y péptidos con actividad antioxidante, antihipertensiva, hipolipemiente y otras a partir de proteínas de *Glycine max*, *Phaseolus lunatus* L, *Lupinus* sp. and *Erythrina edulis*^{8,9,11,34}.

La proteasa recombinante PT4 presenta gran potencial para hidrolizar proteínas de *Phaseolus lunatus*, *Glycine max* y *Erythrina edulis* y en menor proporción las de *Lupinus mutabilis* (Tabla 2). Asimismo, la enzima es activa en condiciones alcalinas, amplio rango de temperatura y presenta gran estabilidad térmica, características de gran importancia en bioprocesos. Do Evangelio y col⁶, hidrolizaron las proteínas de *Phaseolus vulgaris* L con pepsina a pH 2 y 37 °C y Alcalasa® a pH 7 y 50 °C, obteniendo mejores propiedades funcionales y actividad biológica con Alcalasa®. En este contexto, PT4 presenta similares condiciones de reacción que Alcalasa®, por lo que podría presentar gran potencial para la obtención productos bioactivos.

Además, se observó que las proteínas de mayor peso molecular de las leguminosas se hidrolizaron a fracciones menores a 40 kDa, con una mayor concentración de fracciones menores a 28 kDa (Figura 4). Es interesante señalar que Do Evangelio y col⁶ hidrolizaron proteínas de *Phaseolus vulgaris* L con pepsina o Alcalasa® y aunque en el análisis por SDS-PAGE encontraron que los hidrolizados con ambas enzimas presentaron perfil electroforético similar al de las proteínas totales iniciales, las propiedades funcionales y actividad biológica mejoraron considerablemente después de la hidrólisis, por lo cual concluyeron que los hidrolizados podrían ser usados como suplementos alimenticios bioactivos. Del mismo modo, Polanco y col³⁵, estudiaron el efecto de la hidrólisis con pepsina-pancreatina con respecto a las propiedades tecnofuncionales y biológicas de las proteínas de *Phaseolus lunatus*. En este caso, el perfil electroforético de las proteínas también fue similar antes y después de la hidrólisis, pero las fracciones peptídicas obtenidas mejoraron sus propiedades funcionales y presentaron actividades antioxidante y antihipertensiva.

En este trabajo, los perfiles electroforéticos de las proteínas de leguminosas antes y después de la hidrólisis con la proteasa recombinante PT4 fueron diferentes (Figura 4), lo cual se evidencia por la aparición de bandas de menor peso molecular después de la hidrólisis. Por lo tanto, la obtención de estos péptidos de bajo peso molecular nos

permite inferir el gran potencial de los hidrolizados en cuanto a propiedades funcionales y biológicas.

Respecto a la importancia nutricional de los hidrolizados proteicos, cabe mencionar que las proteínas de leguminosas presentan baja solubilidad, propiedades alérgicas y antinutricionales, así como limitada digestibilidad, absorción y por tanto bajo valor biológico. La obtención de hidrolizados proteicos de leguminosas mediante hidrólisis enzimática presenta ventajas en la alimentación, ya que a través de ella, las proteínas pueden mejorar su solubilidad, digestibilidad y absorción, incrementando su valor biológico y calidad nutricional. Asimismo, en estudios previos se ha publicado que las propiedades nutricionales y bioactivas de los hidrolizados proteicos dependen de las enzimas que se utilicen y del grado de hidrólisis alcanzado, obteniéndose mayores propiedades funcionales y biológicas con altos grados de hidrólisis, ya que son los péptidos de menor tamaño los que las presentan^{4,5,34,36}.

Por todo ello, la proteasa recombinante PT4 puede representar una alternativa para la obtención de productos con alto valor agregado, como hidrolizados proteicos o péptidos con propiedades funcionales a partir de proteínas no solo de leguminosas, sino de diferentes fuentes alimentarias y residuos agroindustriales.

CONCLUSIONES

El clonaje del gen de la proteasa PT4 de *Pseudomonas aeruginosa* M211 hizo posible la producción de la enzima de interés en un microorganismo inocuo cuyo manejo está ampliamente estandarizado en laboratorio. La caracterización permitió determinar los parámetros óptimos de actividad de la enzima para aplicarla en la hidrólisis de proteínas de leguminosas. Todo ello, contribuirá a un posterior escalamiento del bioproceso. Así, la proteasa recombinante PT4 presentó actividad a valores elevados de pH y temperatura, fue termoestable por periodos prolongados e hidrolizó proteínas de semillas de cuatro leguminosas, permitiendo obtener hidrolizados proteicos y fracciones peptídicas de diversos pesos moleculares, los cuales después de estudios complementarios podrían ser usados como suplementos o aditivos en la industria alimentaria por sus propiedades funcionales y biológicas.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado por CIENCIACTIVA según Convenio N° 007- FONDECYT- 2014 y Contrato N° 40-2017-INIA-PNIA-MAESTRÍA.

BIBLIOGRAFÍA

- Banerjee G, Ray AK. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2017; 33: 119-143.
- Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech.* 2016; 6: 174.
- Nicas TI, Iglewski BH. The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Microbiol.* 1985; 31: 387-392.
- Betancur-Ancona D, Martínez-Rosado R, Corona-Cruz A, Castellanos-Ruelas A, Jaramillo-Flores ME, Chel-Guerrero L. Functional properties of hydrolysates from *Phaseolus lunatus* seeds. *Int J Food Sci Technol.* 2009; 44: 128-137.
- Betancur-Ancona D, Sosa-Espiniza T, Ruiz-Ruiz J, Segura-Campos M, Chel-Guerrero L. Enzymatic hydrolysis of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrates and its effects on biological and functional properties. *Int J Food Sci Technol.* 2014; 49: 2-8.
- Do Evangelho JA, Vanier NL, Pinto VZ, De Berrios JJ, Dias ARC, Da Rosa Zavareze E. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. *Food Chem.* 2017; 214: 460-467.
- Duranti M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia.* 2006; 77: 67-82.
- Segura-Campos M, Ruiz-Ruiz J, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D. Antioxidant activity of *Vigna unguiculata* L. walp and hard-to-cook *Phaseolus vulgaris* L. protein hydrolysates. *CYTA J Food.* 2013; 11: 208-215.
- Torruco-Uco J, Chel-Guerrero L, Martínez-Ayala A, Dávila-Ortiz G, Betancur-Ancona D. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. *Lebenson Wiss Technol.* 2009; 42: 1597-1604.
- Valdez-Ortiz A, Fuentes-Cutiérrez CI, Germán-Báez LJ, Gutiérrez-Dorado R, Medina-Godoy S. Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. *Lebenson Wiss Technol.* 2012; 46: 91-96.
- Intiquilla A, Jiménez-Aliaga K, Zavaleta AI, Arnao I, Peña C, Chávez-Hidalgo EL, et al. *Erythrina edulis* (Pajuro) seed protein: a new source of antioxidant peptides. *Nat Prod Commun.* 2016; 11: 1-6.
- Oliveira AP, Andrade GF, Mateó BS, Naozuka J. Protein and metalloprotein distribution in different varieties of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): effects of cooking. *Int J Food Sci.* 2017; 2017.
- Sharma S, Kaur M, Goyal R, Gill BS. Physical characteristics and nutritional composition of some new soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) genotypes. *J Food Sci Technol.* 2014; 51: 551-557.
- Martins JMN, Talhinhos P, Sousa RB. Yield and seed chemical composition of *Lupinus mutabilis* in Portugal. *Rev Ciênc Agrár.* 2016; 39: 518-525.
- Hidalgo M, Rodríguez V, Porras O. Revisiting the physiological benefits of legume consumption. *Rev Chil Nutr.* 2018; 45: 32-44.
- Flores-Fernández CN, Cárdenas-Fernández M, Dobrijevic D, Jurlewicz K, Zavaleta AI, Ward JM, Lye GJ. Novel extremophilic proteases from *Pseudomonas aeruginosa* M211 and their application in the hydrolysis of dried distiller's grain with solubles (DDGS). *Biotechnol Prog.* 2018; 35: e2728.
- Andrejko M, Mizerska-Dudka M. Elastase B of *Pseudomonas aeruginosa* stimulates the humoral immune response in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol.* 2011; 107: 16-26.
- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 1983; 166: 557-580.
- Coelho DF, Saturnino TP, Fernandes FF, Mazzola PG, Silveira E, Tambourgi EB. Azocasein substrate for determination of proteolytic activity: Reexamining a traditional method using bromelain samples. *Biomed Res Int.* 2016; 2016:8409183
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of

- protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.
21. Caballero AR, Moreau JM, Engel LS, Marquart ME, Hill JM, O'Callaghan RJ. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases. *Anal Biochem.* 2001; 290: 330-337.
 22. Intiquilla A, Jiménez-Aliaga K, Guzmán F, Alvarez CA, Zavaleta AI, Izaguirre V. et al. Novel antioxidant peptides obtained by alkalase hydrolysis of *Erythrina edulis* (pajuro) protein. *J Sci Food Agric.* 2019; 99: 2420-2427.
 23. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.
 24. Gupta A, Ray S, Kapoor S, Khare SK. Solvent-stable *Pseudomonas aeruginosa* PseA protease gene: identification, molecular characterization, phylogenetic and bioinformatic analysis to study reasons for solvent stability. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2008; 15: 234-243.
 25. Marquart ME, Caballero AR, Chomnawang M, Thibodeaux BA, Twining SS, O'Callaghan RJ. Identification of a novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* that causes corneal erosions. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46: 3761-3768.
 26. Kida Y, Higashimoto Y, Inoue H, Shimizu T, Kuwano K. A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF- κ B through protease-activated receptors. *Cell Microbiol.* 2008; 10: 1491-1504.
 27. Gupta A, Roy I, Khare SK, Gupta MN. Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *J Chromatogr A.* 2005; 1069: 155-161.
 28. Cheng M, Takenaka S, Aoki S, Murakami S, Aoki K. Purification and characterization of an eggshell membrane decomposing protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain ME-4. *J Biosci Bioeng.* 2009; 107: 373-378.
 29. Ghorbel-Bellaaj O, Hayet BK, Bayoudh A, Younes I, Hmidet N, Jellouli K, et. al. *Pseudomonas aeruginosa* A2 elastase: Purification, characterization and biotechnological applications. *Int J Biol Macromol.* 2012; 50: 679-686.
 30. Padrines M, Bieth JC. Oxidized and Met358 \rightarrow Leu mutated α 1-proteinase inhibitor as substrates of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Biochim Biophys Acta.* 1993; 1163: 61-66.
 31. Odunuga OO, Adekoya OA, Sylte I. High-level expression of pseudolysin, the extracellular elastase of *Pseudomonas aeruginosa*, in *Escherichia coli* and its purification. *Protein Expr Purif.* 2015; 113: 79-84.
 32. Han M, Wang X, Ding H, Jin M, Yu L, Wang J, Yu X. The role of N-glycosylation sites in the activity, stability, and expression of the recombinant elastase expressed by *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol.* 2014; 54: 32-37.
 33. Morihara K. Pseudolysin and other pathogen endopeptidases of thermolysin family. *Methods Enzymol.* 1995; 248: 242-253.
 34. Boschini C, Scigliuolo GM, Resta D, Arnoldi A. ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. *Food Chem.* 2014; 145: 34-40.
 35. Polanco-Lugo E, Dávila-Ortiz C, Betancur-Ancona DA, Chel-Guerrero LA. Effects of sequential enzymatic hydrolysis on structural, bioactive and functional properties of *Phaseolus lunatus* protein isolate. *Food Sci Technol.* 2014; 34: 441-448.
 36. Herrera-Ponce AL, Alarcón-Rojo AD, Salmeron I, Rodríguez-Figueroa JC. Physiological health effects of whey protein-derived bioactive peptides: A review. *Rev Chil Nutr.* 2019; 46: 205-214.