

MÉTODO PARA MEDIR ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE *Fusarium* sp. EN HARINAS DE TRIGO

Gonnet, S.¹; Bentancur, M.J.¹

Recibido: 27/09/04 Aceptado: 06/12/04

RESUMEN

Se han encontrado harinas contaminadas con *Fusarium* que, aunque tienen bajo contenido de toxinas, no son aptas para panificación ya que las proteasas del hongo degradan las proteínas de la harina y producen un deterioro en su calidad panadera. Como las harinas contaminadas contienen proteasas provenientes del grano de trigo además de las del hongo, es importante encontrar un método que permita distinguir la actividad proteolítica que proviene del *Fusarium* de la presente en la harina. Para esto se compararon las actividades proteolíticas de harinas no contaminadas con *Fusarium* y con alta contaminación, a efectos de optimizar las condiciones que permitieran medir la actividad de las proteasas de *Fusarium*. El método así obtenido fue validado porque permitió obtener una correlación positiva ($r=0.972$ $p\leq 0.01$) entre la actividad proteolítica y la contaminación de las harinas.

PALABRAS CLAVE: azocaseína, calidad panadera, proteasas.

SUMMARY

A METHOD TO MEASURE PROTEOLYTIC ACTIVITY OF *Fusarium* sp. IN WHEAT FLOURS

There are types of *Fusarium* contaminated flours that, despite containing low levels of toxins, are not suitable for breadmaking because their content of fungal proteases that degrade flour's proteins and can therefore reduce its breadmaking properties. In *Fusarium* contaminated flours there are cereal and fungal proteases. It is therefore important to obtain a method to measure the fungal protease activity only. We compared here the proteolytic activity of *Fusarium* contaminated and not contaminated flours to optimize the conditions to discriminate the fungal proteolytic activity. The method presented here validates because of the obtained high correlation ($r=0.972$ $p\leq 0.01$) between proteolytic activity and flour contamination.

KEY WORDS: azocasein, breadmaking quality, protease.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones con *Fusarium* sp. en cultivos de trigo y cebada se han hecho cada vez más frecuentes en Uruguay y han significado un problema importante para la seguridad alimentaria así como pérdidas económicas y problemas agronómicos (Díaz de Ackerman *et al.*, 2002). La presencia de *Fusarium* en harinas representa un riesgo desde el punto de vista de la alimentación porque produce

toxinas, pero además causa deterioro en la calidad industrial del trigo (Cuniberti, 2002).

El grano de trigo tiene un 70 - 80% de almidón, un 10 - 15% de proteínas y un 1 - 2% de lípidos medidos en peso seco y contiene proteasas y otras hidrolasas que participan en el proceso de germinación. Cuando el *Fusarium* infecta el grano produce proteasas y amilasas que, en el endosperma de los granos infectados, ocasionan la degradación de los gránulos de almidón y de la matriz proteica

¹Laboratorio de Bioquímica. Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Agronomía. Av. Garzón 780 CP 12900 Montevideo.
E-mail:sgonnet@fagro.edu.uy

de modo que las proteínas de alto peso molecular se transforman en polipéptidos de menor peso molecular. La incubación de extractos de harinas contaminadas con *Fusarium* muestra una gradual disminución de las proteínas con el tiempo, debida a la acción de las proteasas de los hongos contenidas en la harina (Nightingale *et al.*, 1999).

Las proteínas del gluten son los componentes que tienen más importancia en la definición de las propiedades funcionales de las harinas y la combinación de elasticidad y extensibilidad que le confieren a la harina, permiten la correcta formación de la red que retiene el CO₂ producido durante el proceso de leudado (Shewry *et al.*, 1997).

Las harinas contaminadas contienen proteasas provenientes de *Fusarium* que provocan la degradación de las proteínas del gluten durante la preparación del pan (Nightingale *et al.*, 1999) pero no en la preparación de pasta con el mismo tipo de harina ya que ese proceso requiere menos cantidad de agua y se realiza en menos tiempo (Dexter *et al.*, 1997).

Ensayos realizados con variedades de trigo de amplia difusión en Uruguay provenientes de chacras con altos problemas de *Fusarium*, demostraron que el deterioro de los parámetros de calidad panadera correlaciona con la contaminación de las harinas (Vázquez, 2002). Para establecer si también correlaciona con la actividad proteolítica, fue necesario determinar la actividad proteolítica proveniente del *Fusarium*. La posibilidad de medir esa actividad es de utilidad además porque pueden encontrarse harinas aceptables, desde el punto de vista del nivel de toxinas, pero que no son aptas para panificación ya que el porcentaje de granos dañados por *Fusarium* no siempre correlaciona con el contenido de toxinas (Dexter & Nowicki, 2003).

El objetivo de este trabajo fue optimizar un método para medir la actividad de las proteasas de *Fusarium* presentes en harinas contaminadas. Para esto se compararon las actividades proteolíticas de harinas sin contaminación y harinas con alta contaminación variando el tampón de reacción, para seleccionar las condiciones que permitieran que la actividad medida correspondiera principalmente a las proteasas de *Fusarium*. Para confirmar la validez del método se calculó la correlación entre la actividad proteolítica y la contaminación de harinas de trigo provenientes de chacras con alto problema de *Fusarium*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de harina

Se utilizaron muestras de harina de trigo INIA Boyero 1 y 2 de la zafra 2001-2002 con distinto contenido de

Fusarium (Vázquez *et al.*, 2004). Como control "sin *Fusarium*" se usó harina de la zafra 2000.

Extracción de las proteasas

Se extrajeron según Pekkarinen *et al.* (2000) de 10 g de harina que se mezclaron con 25 mL de tampón acetato de sodio 50 mM pH 5.5. Luego de 30 min de incubación a 4° C se centrifugó durante 25 min a 8000 g y se tomaron alícuotas del sobrenadante para ensayar la actividad proteolítica.

Actividad proteolítica

Se usó azocaseína como sustrato para medir la actividad de las proteasas de las muestras, que se midió de acuerdo a Becana *et al.* (1986) con modificaciones. La mezcla de reacción contenía igual volumen de tampón de ensayo, solución acuosa de azocaseína 0.4% y extracto de harina. Después de 3 h de incubación a 40° C la reacción se detuvo por el agregado de igual volumen de ácido perclórico 1 M. Los blancos respectivos se realizaron deteniendo la reacción a los 15 min. Los tubos se centrifugaron a 15000 g durante 10 min y en el sobrenadante se midió la actividad de las proteasas por el incremento de absorbancia a 337 nm.

La actividad proteolítica se expresó en unidades de enzima por gramo de harina (UE/g) siendo una UE la cantidad de enzima necesaria para producir un aumento de una unidad de absorbancia en 3 h de reacción. Los resultados graficados son medias de tres repeticiones con su desvío estándar y corresponden a un ensayo representativo de los tres realizados que mostraban la misma tendencia.

Elección del tampón de ensayo

Se compararon tampones de ensayo de distinta fuerza iónica, concentración de Ca²⁺ y pH. Los tampones usados fueron acetato de sodio-acético (pH 5.0 y 6.0), TRIS-HCl (pH 7.0, 8.0, 9.0, 9.5 y 10.0), MES-NaOH (pH 7.0) y glicina-NaOH (pH 9.0, 9.5 y 10.0). La fuerza iónica ensayada fue 1.0 M y 0.25 M y la concentración de Ca²⁺ en el tampón fue 40, 10 y 0 mM de CaCl₂.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para estimar la actividad proteolítica proveniente del *Fusarium* en harinas contaminadas fue necesario optimizar un método de extracción de las proteasas y un tampón de reacción que permitiera distinguir las proteasas del *Fusarium* de las de la harina.

Con el objetivo de seleccionar el tampón de ensayo y el tampón de extracción se utilizaron harinas muy contaminadas de modo de elegir las condiciones que permitieran obtener los mayores valores de actividad ya que ese tipo

de harinas contiene proteasas provenientes de la harina y de *Fusarium*.

Luego de establecida la forma de extracción, se midió la actividad proteolítica de los respectivos extractos ensayando variaciones del método de Becana *et al.* (1986) que utiliza azocaseína como sustrato. La actividad proteolítica también puede estimarse usando gelatina, azogelatina, hemoglobina y caseína como sustrato. La utilización de derivados azotados de proteínas como la azocaseína, cuyos productos de hidrólisis se detectan a 337nm, permite que la hidrólisis de otras proteínas presentes en el extracto no interfiera en la medida porque los productos no se detectan a esa longitud de onda (Jones *et al.*, 1998). La azocaseína se usa en nuestro laboratorio para medir proteasas en extractos vegetales y por eso fue utilizada como sustrato en este ensayo.

Para medir la actividad proteolítica proveniente del *Fusarium* en muestras de harina se ajustó el tampón de ensayo (pH, fuerza iónica y contenido de Ca^{2+}) comparando la actividad proteolítica de harinas muy contaminadas con harina "sin *Fusarium*". Se seleccionó el tampón de ensayo con el que se obtuvieron actividades proteolíticas altas con harina de alta contaminación y bajas con harina "sin *Fusarium*". La actividad proteolítica medida de esta forma provenía principalmente del *Fusarium* y esto fue confirmado midiendo actividad proteolítica en harinas de contaminación conocida.

Extracción de proteasas

Se realizaron ensayos preliminares para extraer las proteasas en los cuales se maceró la harina en una relación de 10% (p/v) con distintos tampones 1M conteniendo 40mM Ca^{2+} (glicina-HCl pH3.5, acetato de sodio-acético pH5.0 y TRIS-HCl pH7.5 y 9.0). La medida de la actividad en alícuotas de la suspensión macerada de harina, tomadas inmediatamente después de agitación, presentó dificultades porque las muestras continuaban con turbidez aún después de centrifugadas. El tratamiento por ebullición de los tubos (AOAC, 1995) luego de la detención de la reacción con perclórico, mejoró la lectura espectralométrica.

Con este procedimiento se extrajeron muestras de harina INIA Boyero 1 y 2 a dos pH (7.0 y 9.5), que aparentemente permitían diferenciar harinas con y sin *Fusarium*, pero los resultados fueron aleatorios (datos no mostrados).

A partir de estos resultados, la extracción de proteasas se realizó en frío con tampón acetato pH5.5 según Pekkarinen *et al.* (2000) y los extractos se usaron para ajustar las condiciones del tampón de ensayo (fuerza iónica, contenido de Ca^{2+} y pH).

Elección del tampón de ensayo

Se analizaron las distintas variables (fuerza iónica, contenido de Ca^{2+} y pH) comparando la actividad proteolítica de harinas con mucha contaminación y harinas sin *Fusarium* para elegir las condiciones que permitieran la mayor diferencia de actividad entre las mismas.

Elección de la fuerza iónica

En la figura 1 se comparan las actividades proteolíticas de harina contaminada y sin contaminar cuando se utilizaron tampones de ensayo de distinta fuerza iónica conteniendo 40mM de Ca^{2+} , en el rango de pH5.0 y 10.0. En todos los casos se encontró mayor actividad proteolítica en las harinas con *Fusarium* que en la sin *Fusarium*, y la harina contaminada dio mayor actividad proteolítica con tampones 0.25M que con tampones de fuerza iónica 1M (Figura 1).

A partir de este resultado se seleccionó 0.25M como fuerza iónica del tampón de ensayo para ajustar las restantes condiciones.

Elección del contenido de Ca^{2+}

El Ca^{2+} ha sido usado en la mezcla de reacción para medir actividad proteolítica (Castro & Cantera, 1995) y para nuestras determinaciones se incluyó inicialmente en una concentración 40mM que luego se modificó a 10 y 0mM. En la figura 2 se muestran las actividades proteolíticas de harina contaminada y sin contaminar usando tampón de ensayo 0.25M con distinto contenido de Ca^{2+} en el mismo rango de pH usado para elegir la fuerza iónica.

Se seleccionó el tampón sin Ca^{2+} porque presentó, a todos los pH, las mayores diferencias entre las actividades proteolíticas de harinas con y sin *Fusarium*. La pre-

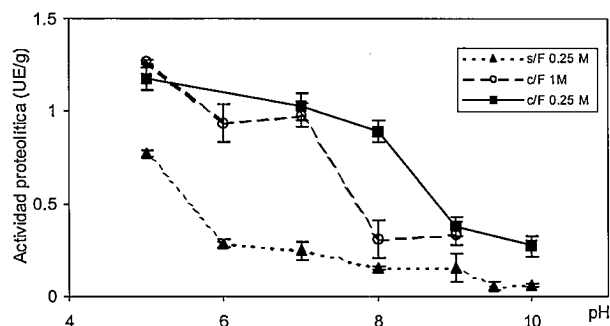


Figura 1. Actividad proteolítica de harinas medida a distintos pH con tampones 1M y 0.25M conteniendo 40mM Ca^{2+} . Harina sin *Fusarium* (s/F) y con *Fusarium* (c/F). Las barras representan los desvíos estándar.

sencia de Ca^{2+} es importante para la estabilidad de las proteasas de *Fusarium* purificadas (Pekkarinen & Jones, 2002), pero los extractos crudos pueden presentar concentraciones de Ca^{2+} mayores a 100mM (Betschart, 1988) lo que explicaría que el tampón de ensayo no necesite agregado de éste.

Elección de pH del tampón de ensayo

Los resultados de la medida de la actividad proteolítica de la harina contaminada y la sin *Fusarium* con el tampón 0.25M sin calcio fueron usados para seleccionar el pH del tampón de ensayo (Figura 2). A todos los pH la harina contaminada tiene mayor actividad proteolítica que la harina sin *Fusarium*. La diferencia de actividad proteolítica entre las harinas es baja a pH5.0, aumenta con el pH y por encima de pH8.0 comienza a disminuir hasta que a pH10.0 nuevamente los dos tipos de harina tienen valores de actividad similares.

La actividad proteolítica encontrada en la harina sin *Fusarium* tuvo su valor máximo a pH 5.0, similar al encontrado en la harina contaminada lo que indica que la mayor parte de la actividad que se detecta a pH5.0 en harinas contaminadas proviene de las proteasas de la harina. La presencia de proteasas de pH óptimo ácido en la harina se debe a que en el endosperma se mantiene un pH ácido durante la germinación para favorecer la solubilidad de los compuestos de reserva, la disociación de los inhibidores endógenos de las hidrolasas y el transporte de los productos de hidrólisis. En cebada en germinación las proteasas actúan a pH ácido (4.9 - 5.1), que en el endosperma se origina por acumulación de ácido málico en los estadios tardíos de formación del grano. En el

endosperma de granos de trigo en germinación se han encontrado proteasas ácidas y neutras en cantidades similares, seguramente ubicadas en distintos compartimentos. La acidificación en este cereal se produce luego de la respuesta al ácido giberélico durante la germinación (Domínguez & Cejudo, 1999).

La figura 2 muestra que los mayores valores de actividad en harina contaminada se obtuvieron a pH6.0, 7.0 y 8.0 pero para seleccionar el pH del tampón de ensayo se descartó el pH6.0, aunque era el valor mayor, porque las diferencias entre las actividades proteolíticas de harinas contaminadas y sin contaminar son mayores a pH7.0 y 8.0. Se seleccionó pH7.0 para el tampón de ensayo ya que el desvío estandar de las medidas de actividad a ese pH fue menor que el obtenido a pH8.0.

La gran diferencia que se encuentra a pH7.0 y 8.0 entre la actividad proteolítica de las harinas sin contaminar y contaminada, indica que a esos pH el valor obtenido en la harina contaminada proviene principalmente de las proteasas de *Fusarium*. Esto está de acuerdo con lo que informan Pekkarinen *et al.* (2000) que encontraron que *F. culmorum*, *F. graminearum* y *F. poae* producen proteasas neutras y alcalinas creciendo en medio con gluten de trigo o en granos de cebada infectados. En Uruguay la especie más frecuente en las infecciones de trigo es *F. graminearum* (Díaz de Ackerman *et al.*, 2002) lo que explicaría los resultados obtenidos. Pekkarinen *et al.* (2000) informan también para esa especie un máximo de actividad proteolítica a pH9.0, lo que no se encontró en nuestro estudio si bien entre pH9.0 y 10.0 se encontraron valores de actividad mayores a los de la figura 2 cuando se utilizó TRIS en lugar de glicina (datos no mostrados). De todos modos la activi-

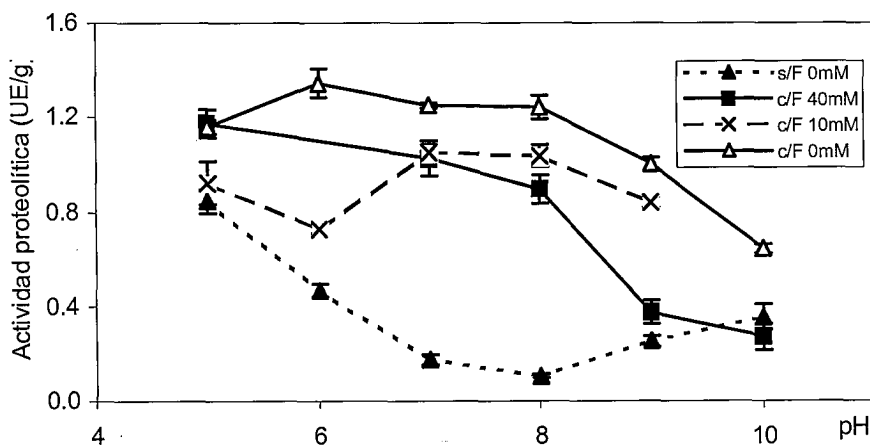


Figura 2. Actividad proteolítica de harinas medida con tampón 0.25M con 40, 10 y 0mM Ca^{2+} . Harina sin *Fusarium* (s/F) y con *Fusarium* (c/F). Las barras representan los desvíos estándar.

dad proteolítica medida en harina con *Fusarium* en esas condiciones no presentó tanta diferencia con la actividad de la harina sin *Fusarium* como la que se muestra en la figura 2 a pH7.0 y 8.0.

A pH7.0 las medidas realizadas con MES permitieron encontrar valores de actividad algo mayores a los obtenidos con TRIS (datos no mostrados) pero para medir numerosas muestras se eligió TRIS, que es un producto común en los laboratorios.

Para confirmar que las condiciones elegidas (TRIS-HCl 0.25M pH7.0) permitían medir la actividad proteolítica correspondiente al *Fusarium* en harinas contaminadas, se determinó la actividad en muestras de harinas (Vázquez *et al.*, 2004) y se buscaron correlaciones con su grado de contaminación.

Verificación del método elegido

Las 5 muestras de harina de cada origen, INIA Boyero 1 y 2, fueron preparadas por duplicado a partir de granos originales de cada tratamiento que se mezclaron con cantidades crecientes (0, 25, 50, 75 y 100%) de granos “limpios” (Vázquez *et al.*, 2004). Los granos “limpios” se seleccionaron entre los granos originales por su aparente no conta-

minación con *Fusarium*. Por lo tanto, la harina obtenida de 100% de granos “limpios” tiene contaminación, lo que se verificó porque sus valores de actividad proteolítica fueron siempre mayores (INIA Boyero 1: 0.475 UE/g e INIA Boyero 2: 0.646 UE/g) a los obtenidos con la harina “sin *Fusarium*”, que corresponde a trigo cosechado el año 2000, cuando la contaminación fue escasa (0.275 UE/g). La figura 3 muestra que la actividad proteolítica de las harinas INIA Boyero 1 y 2 tiene una correlación positiva con la contaminación de las mismas ($r=0.972$ $p\leq 0.01$). Esto permite concluir que el método de extracción de las proteasas y las condiciones seleccionadas para el tampón de ensayo fueron adecuados para medir las proteasas provenientes del *Fusarium* contenidas en harina de trigo.

Cuando la selección de harinas se hace por su bajo contenido de toxinas, es necesario utilizar un método complementario de selección ya que la contaminación con *Fusarium* no siempre correlaciona con el contenido de toxinas. El método descrito aquí para medir la actividad proteolítica proveniente del *Fusarium* en una harina de trigo es una forma rápida de descartar harinas no aptas para panificación que fueron aprobadas desde el punto de vista del contenido de toxinas.

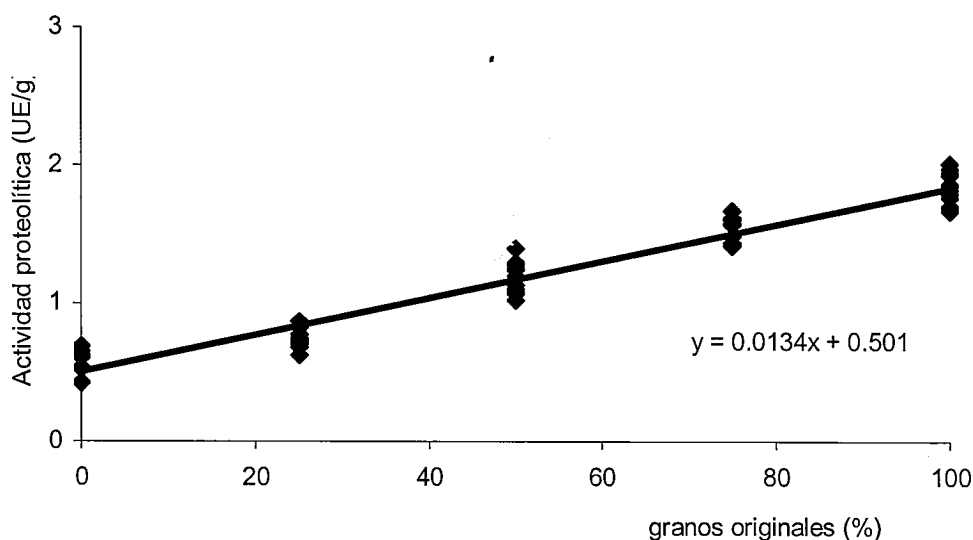


Figura 3. Correlación ($r=0.972$ $p\leq 0.01$) entre la actividad proteolítica (UE/g) y contaminación del grano (% granos originales).

AGRADECIMIENTOS

La investigación fue financiada por el proyecto INIA-LIA 021. Agradecemos a Pedro Díaz por su asesoramiento y a Daniel Vázquez por el apoyo bibliográfico.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC. 1995. Proteolytic Activity of Flour and Malted Wheat Flour. AOAC Official Methods of Analysis 32: 27.
- BECANA, M.; APARICIO-TEJO, P. & SÁNCHEZ-DÍAZ, M. 1986. Nitrate Metabolism in Alfalfa Root Nodules under Water Stress. *J. Exp. Bot.* 37: 798-806.
- BETSCHART, A.A. 1988. Nutritional Quality of Wheat and Wheat Foods. En: Pomeranz, Y. (ed), *Wheat: Chemistry and Technology*, 3rd ed. Vol. II. pp. 91-130. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN, USA.
- CASTRO, S. & CANTERA, M. B. 1995. A rapid and Inexpensive Procedure for the Determination of Proteolytic Activity. *Biochemical Education* 23:41-43.
- CUNIBERTI, M.B. 2002. *Fusarium* vs. Calidad de Trigo. Información para Extensión-INTA 71:15-15.
- DEXTER, J.; MARCHYLO, B.; CLEAR, R. & CLARKE, J. 1997. Effect of *Fusarium* Head Blight on Semolina Milling and Pasta Making Quality of Durum Wheat. *Cereal Chem.* 74:519-525.
- DEXTER, J. & NOWICKI, T.W. 2003. Safety Assurance and Quality Assurance Issues Associated with *Fusarium* Head Blight in Wheat. En: Leonard, K.J and Bushnell, W. (eds.), *Fusarium* Head Blight of Wheat and Barley, pp. 420-460. W.R. APS Press.
- DÍAZ de ACKERMAN, M.; PEREYRA, S. & STEWART, S. 2002. Antecedentes y perspectivas de control de Fusariosis de la espiga de trigo. Serie Actividades de Difusión INIA 282:1-9.
- DOMÍNGUEZ, F. & CEJUDO, F. 1999. Patterns of Starchy Endosperm Acidification and Protease Gene Expression in Wheat Grains following Germination. *Plant Physiol.* 119:81-87.
- JONES, B.; FONTANINI, D.; JÄRVINEN, M. & PEKKARINEN, A. 1998. Simplified Endoproteinase Assays Using Gelatin or Azogelatin. *Anal. Biochem.* 263:214-220.
- NIGHTINGALE, M.; MARCHYLO, B.; CLEAR, R.; DEXTER, J. & PRESTON, K. 1999. *Fusarium* Head Blight: Effect of fungal Proteases on Wheat Storage Proteins. *Cereal Chem.* 76:150-158.
- PEKKARINEN, A.; MANNONEN, L.; JONES, B. & NIKU-PAAVOLA M-L. 2000. Production of Proteases by *Fusarium* Species Grown on Barley Grains and in Media Containing Cereal Proteins. *J. Cereal Sci.* 31:253-261.
- PEKKARINEN, A. & JONES, B. 2002. Trypsine-like Proteinase Produced by *Fusarium culmorum* Grown on Grain Proteins. *J. Agric. Food Chem.* 50:3849-3855.
- SHEWRY P.; TATHAM, A. & LAZZERI, P. 1997. Biotechnology of Wheat Quality *J. Sci. Food Agric.* 73:397-406.
- VÁZQUEZ, D., 2002. Influencia del *Fusarium* en la calidad industrial del trigo. Mesa Nacional de Trigo, 4^a Jornadas de rendimiento y calidad de trigo, pp 45-53.
- VÁZQUEZ, D.; GONNET, S.; NIN, M. & BENTANCUR, O. 2004. Effect of *Fusarium* Proteases on Breadmaking Properties In: The Gluten Proteins, Eds. D. Lafiandra, S. Masci and R. D'Ovidio. The Royal Society of Chemistry, U.K. pp 429-432.