

Proteolytic activity of wild fruits of *Bromelia karatas* L. of Yucatán, Mexico

Actividad proteolítica de frutos silvestres de *Bromelia karatas* L. de Yucatán, México

Hernán de J. Villanueva-Alonzo¹; Glendy M. Polanco-Hernández¹; Gabriel Lizama-Uc²; Karla Y. Acosta-Viana¹; Arturo A. Alvarado-Segura^{3*}

¹Universidad Autónoma de Yucatán, Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, Biomedicina de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Laboratorio de Biología Celular. Av. Itzáes, núm. 490 x calle 59, col. Centro. C. P. 97000. Mérida, Yucatán, México.

²Instituto Tecnológico de Mérida. Av. Tecnológico km 4.5 s/n. C. P. 97118. Mérida, Yucatán, México.

³Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán. Carretera Muna-Felipe Carrillo Puerto Tramo Oxkutzcab-Akil km 41+400. C. P. 97880. Oxkutzcab, Yucatán, México.

*Corresponding author: a_alvaradosegura@outlook.com, tel.: +52 (997) 975 09 09.

Abstract

Introduction: Bromeliads are a source of proteases that have not been fully studied.

Objectives: To evaluate the proteolytic activity of wild fruits of *Bromelia karatas* L. under different temperature, pH and NaCl conditions, and to estimate the thermal stability of their proteases.

Materials and methods: The effect of pH (6, 7, 8, 9, 10 and 12), incubation temperatures (30, 40, 50, 60 and 70 °C) and NaCl concentrations (5, 10 and 20 %) on the proteolytic activity of the fruits was compared. The thermal stability of the proteases was assessed at 30, 50 and 70 °C for 240 minutes. The molecular weights and isoelectric points of the proteases were estimated by non-reducing two-dimensional zymography. The data were analyzed using a one-factor ANOVA and Tukey's test ($\alpha = 0.05$).

Results and discussion: The proteolytic activity of *B. karatas* fruit extract (8.59 U·mg⁻¹) was greater than that of *Ananas comosus* (L.) Merr. variety *comosus* (3.42 U·mg⁻¹). The activity was higher at pH 6 and 7 and in concentrations lower than 5 % NaCl. Proteases were stable at 30 and 50 °C for 210 minutes. The two-dimensional zymogram, under non-reducing conditions, showed at least 40 light zones with apparent molecular weights between 27.3 and 290 kDa, potentially representing proteases.

Conclusion: The proteases of *B. karatas* have potential for application in the food industry.

Keywords: Bromeliaceae; proteases; karatasin; 2D zymography.

Resumen

Introducción: Las bromelias son fuente de proteasas que no se han estudiado totalmente.

Objetivos: Evaluar la actividad proteolítica de frutos silvestres de *Bromelia karatas* L. bajo distintas condiciones de temperatura, pH y NaCl, y estimar la estabilidad térmica de las proteasas.

Materiales y métodos: Se comparó el efecto del pH (6, 7, 8, 9, 10 y 12), temperaturas de incubación (30, 40, 50, 60 y 70 °C) y concentraciones de NaCl (5, 10 y 20 %) sobre la actividad proteolítica de los frutos. La estabilidad térmica de las proteasas se evaluó a 30, 50 y 70 °C durante 240 minutos. Los pesos moleculares y los puntos isoelectrónicos de las proteasas se estimaron por zimografía bidimensional no reductora. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de un factor y la prueba de comparaciones múltiples de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Resultados y discusión: La actividad proteolítica del extracto de frutos de *B. karatas* (8.59 U·mg⁻¹) fue mayor que la de *Ananas comosus* (L.) Merr. variedad *comosus* (3.42 U·mg⁻¹). La actividad fue mayor en valores de pH 6 y 7 y en concentraciones menores de 5 % de NaCl. Las proteasas se mantuvieron estables a 30 y 50 °C durante 210 minutos. El zimograma bidimensional, bajo condiciones no reductoras, mostró por lo menos 40 zonas claras con pesos moleculares aparentes entre 27.3 y 290 kDa, que representan potencialmente proteasas.

Conclusión: Las proteasas de *B. karatas* tienen potencial de aplicación en la industria alimentaria.

Palabras clave: Bromeliaceae; proteasas; karatasina; zimografía 2D.

Introduction

Biotechnological advances have contributed to the diversification of the use of proteases and to favoring their demand (Ramli, Aznan, & Illias, 2017), which has generated the need to explore new sources. Proteases of plant origin, such as papain and bromelain, are widely accepted in the cosmetics, food, pharmaceutical and alcoholic beverage industries (Arshad et al., 2014; de Lencastre et al., 2016). However, there are currently proteases that have not yet been studied in depth, but with possible biotechnological applications, such as those contained in species of the family Bromeliaceae (Natalucci et al., 2009), specifically in *Bromelia karatas* L. (synonym: *Bromelia plumieri* [E. Morren] L. B. Smith) (Espejo-Serna, López-Ferrari, & Ramírez-Morillo, 2005).

Bromelia karatas is distributed in the Neotropics from the Caribbean islands to Ecuador and Brazil, including Central America. Distribution in Mexico covers 12 of its 32 states, including Yucatán (Espejo-Serna & López-Ferrari, 2010). *Bromelia karatas* plants grow in the types of tropical rainforests described for the Yucatán peninsula (Miranda, 1958) and even in strips of secondary vegetation near roads, where soils are shallow. This species has anatomical and morphological adaptations that allow it to tolerate periods of drought (González-Salvatierra, Andrade, Orellana, Peña-Rodríguez, & Reyes-García, 2013). The fruit is a bittersweet, juicy berry with fibrous skin and yellowish white, pink or dark brown colors; average production is 77 fruits per plant, representing a total weight of approximately 1.4 kg (Montes, Terán, Zúñiga, & Caldón, 2014).

In the state of Yucatán, the fruits of *B. karatas* are consumed, usually accompanied by salt and chili and previously boiled; the latter in order to avoid mouth ulcers caused by cysteine protease. This protease has been named and described as karatasin (Montes, Amador, Cuevas, & Córdoba, 1990), which has kinetic characteristics equivalent to those contained in *Bromelia pinguin* L. (Meza-Espinoza et al., 2017), and is analogous to bromelain and papain (Montes et al., 1990); however, it is still unknown whether there are more proteases that contribute to proteolytic activity. There are also no records of *B. karatas* accessions, which would be useful for their cultivation and use as a source of proteases. For this reason, it is important to identify fruit producing plants with high proteolytic contents for breeding purposes.

In this study, the effect of temperature, pH and NaCl on the proteolytic activity of wild fruits of *B. karatas* was evaluated, the thermal stability of proteases was determined and their molecular weights and isoelectric points were estimated by means of two-dimensional

Introducción

Los avances biotecnológicos han contribuido a la diversificación de uso de las proteasas y a favorecer su demanda (Ramli, Aznan, & Illias, 2017), lo que ha generado la necesidad de explorar nuevas fuentes. Las proteasas de origen vegetal, como la papaína y la bromelina, tienen amplia aceptación en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica y de bebidas alcohólicas (Arshad et al., 2014; de Lencastre et al., 2016). No obstante, en la actualidad existen proteasas aún no estudiadas a profundidad, pero con posibles aplicaciones biotecnológicas, como las contenidas en especies de la familia Bromeliaceae (Natalucci et al., 2009), específicamente en *Bromelia karatas* L. (sinónimo: *Bromelia plumieri* [E. Morren] L. B. Smith) (Espejo-Serna, López-Ferrari, & Ramírez-Morillo, 2005).

Bromelia karatas se distribuye en el neotrópico desde las islas del Caribe hasta Ecuador y Brasil, incluso Centroamérica. La distribución en México abarca 12 de los 32 estados, entre ellos Yucatán (Espejo-Serna & López-Ferrari, 2010). Las plantas de *B. karatas* crecen en los tipos de selva descritos para la península de Yucatán (Miranda, 1958) e incluso en franjas de vegetación secundaria próximas a los caminos, donde los suelos son someros. Esta especie presenta adaptaciones anatómicas y morfológicas que le permiten tolerar periodos de sequía (González-Salvatierra, Andrade, Orellana, Peña-Rodríguez, & Reyes-García, 2013). El fruto es una baya agrídulce y jugosa con cáscara fibrosa, de colores blanco amarillento, rosado o café oscuro; la producción promedio es de 77 frutos por planta, los cuales representan un peso total de aproximadamente 1.4 kg (Montes, Terán, Zúñiga, & Caldón, 2014).

En el estado de Yucatán, los frutos de *B. karatas* se consumen, usualmente, acompañados con sal y chile y previamente hervidos; esto último con la finalidad de evitar úlceras en la boca, causadas por la cisteína proteasa. Esta proteasa ha sido nombrada y descrita como karatasina (Montes, Amador, Cuevas, & Córdoba, 1990), la cual tiene características cinéticas equivalentes a las contenidas en *Bromelia pinguin* L. (Meza-Espinoza et al., 2017), y es análoga a la bromelina y la papaína (Montes et al., 1990); sin embargo, aún se desconoce si existen más proteasas que contribuyan a la actividad proteolítica. Tampoco se cuenta con registros de accesiones de *B. karatas*, lo que sería de utilidad para su cultivo y explotación como fuente de proteasas. Por ello, es importante la identificación de plantas productoras de frutos con altos contenidos proteolíticos, para trabajos en fitomejoramiento.

En este estudio se evaluó el efecto de la temperatura, pH y NaCl sobre la actividad proteolítica de frutos silvestres de *B. karatas*, se determinó la estabilidad

zymography, with the purpose of generating information for biotechnological processes.

Materials and methods

Sampling of plant material

In December 2017 and January 2018, *B. karatas* fruits were collected in three locations in the state of Yucatán, Mexico: Oxkutzcab (collection 1), Espita (collection 2) and Mérida (collection 3). In each location, 10 fruits were obtained from each of seven plants; the fruits contained 12 °Brix at the time of cutting. Honey pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr. variety *comosus*), acquired in a local supermarket, was used as a control.

Evaluation of proteolytic activity

Of the 70 fruits collected per location, 10 fruits were randomly selected to make a homogeneous pulp in a food processor; subsequently, the pulp was centrifuged at 14 000 g for 15 min at 4 °C. The protein concentration was determined by the Bradford method using the commercial Quick Start™ Bradford Protein Assay kit from the BIO-RAD company, according to the manufacturer's instructions. The fruit juice was frozen at -80 °C until use.

Proteolytic activity was quantified following the methodology proposed by Natalucci, Brullo, Lopez, Hilal, and Caffini (1996). The reaction mixture consisted of 1.1 mL of a 1% (w/v) casein solution in 0.1 M phosphate buffer at pH 7, 5 mM of cysteine and 0.1 mL of fruit juice. This mixture was incubated at 37 °C for 20 min and 1.8 mL of 5% trichloroacetic acid (TCA) were added to stop the reaction; it was then centrifuged at 7 000 g for 20 min and the absorbance of the supernatant was measured at 280 nm. The blank was a non-incubated reaction mixture plus 1.8 mL of 5% TCA. An enzyme unit (U) was defined as one millimole of tyrosine per minute under the conditions of the described assay.

Evaluations of the effect of pH, incubation temperature, thermal stability and NaCl concentration on proteolytic activity, as well as the estimation of molecular weights and isoelectric points of proteases, were performed only for the collection with the most activity.

Effect of incubation temperature, pH and NaCl on proteolytic activity

The effect of incubation temperature (30, 40, 50, 60 and 70 °C) at a constant pH of 7 and the effect of pH (6, 7, 8, 9, 10 and 12) at a constant temperature of 37 °C were compared. To determine the effect of pH, the following buffers were used: 0.1 M 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES) for pH 6; 0.1 M phosphates for pH 7 and 12; and 0.1 M Tris-HCl for pH 8, 9 and 10. Proteolytic

térmica de las proteasas y se estimaron sus pesos moleculares y puntos isoeléctricos mediante zimografía bidimensional, con la finalidad de generar información para procesos biotecnológicos.

Materiales y métodos

Muestreo de material vegetal

En diciembre de 2017 y enero de 2018 se colectaron frutos de *B. karatas* en tres localidades del estado de Yucatán, México: Oxkutzcab (colecta 1), Espita (colecta 2) y Mérida (colecta 3). En cada localidad se obtuvieron 10 frutos de cada una de siete plantas; los frutos contenían 12 °Brix al momento del corte. Como testigo se empleó piña miel (*Ananas comosus* [L.] Merr. variedad *comosus*), adquirida en un supermercado local.

Evaluación de la actividad proteolítica

De los 70 frutos colectados por localidad, se seleccionaron 10 frutos al azar para hacer una pulpa homogénea en un procesador de alimentos; posteriormente, la pulpa se centrifugó a 14 000 g por 15 min a 4 °C. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford usando el estuche comercial Quick Star™ Bradford Protein Assay de la casa comercial BIO-RAD, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El jugo del fruto fue congelado a -80 °C hasta su utilización.

La actividad proteolítica se cuantificó siguiendo la metodología propuesta por Natalucci, Brullo, López, Hilal, y Caffini (1996). La mezcla de reacción consistió en 1.1 mL de una solución de caseína al 1% (p/v) en amortiguador de fosfatos 0.1 M a pH 7, 5 mM de cisteína y 0.1 mL de jugo de fruta. Esta mezcla se incubó a 37 °C por 20 min y se agregó 1.8 mL de ácido tricloroacético (ATA) al 5% para detener la reacción; posteriormente, se centrifugó a 7 000 g por 20 min y la absorbancia del sobrenadante se midió a 280 nm. Como blanco se empleó una mezcla de reacción sin incubar más 1.8 mL de ATA al 5%. Una unidad enzimática (U) se definió como un milimol de tirosina por minuto bajo las condiciones del ensayo descrito.

Las evaluaciones del efecto del pH, temperatura de incubación, estabilidad térmica y concentración de NaCl sobre la actividad proteolítica, así como la estimación de los pesos moleculares y los puntos isoeléctricos de las proteasas, se realizaron únicamente para la colecta con mayor actividad.

Efecto de la temperatura de incubación, pH y NaCl sobre la actividad proteolítica

Se comparó el efecto de la temperatura de incubación (30, 40, 50, 60 y 70 °C) a un pH constante de 7 y el efecto del pH (6, 7, 8, 9, 10 y 12) a una temperatura

activity was measured according to the methodology of Natalucci et al. (1996). The effect of NaCl was evaluated at 5, 10 and 20 % (w/v). The result was expressed as the percentage related to the proteolytic activity observed in the absence of NaCl (Moreno-Hernández et al., 2017).

Thermal stability of proteases

The thermal stability of the proteases of *B. karatas* fruit juice was evaluated at 30, 50 and 70 °C; residual proteolytic activity under standard conditions (Natalucci et al., 1996) was determined at 0, 30, 60, 120, 180 and 240 min, and expressed as the relative percentage to the proteolytic activity without prior incubation.

Statistical analysis

In the comparison of the three collections, the proteolytic activity response variable was measured as enzyme units per mL of juice and enzyme units per mg of protein, expressed as the mean \pm standard deviation. Proteolytic activity was evaluated at five temperatures, six pH levels, and three NaCl concentrations. Thermal stability was analyzed graphically. Experimental data were compared with the one-factor analysis of variance ($n = 4$ and $\alpha = 0.05$); subsequently, Tukey's multiple comparison test ($\alpha = 0.05$) was performed (Zar, 1999). The data analysis was done with the R program (R Core Team, 2017).

Two-dimensional zymography with casein

Proteases in *B. karatas* extract were detected by two-dimensional zymography with casein under non-reducing conditions. The protein concentration was determined according to the method described by Bradford (1976), using bovine serum albumin as the protein standard.

The isoelectrofoc (IEF) was performed with strips prefabricated with ampholines (Immobiline Dry-Strips, GE Healthcare) of 7 cm with a gradient from pH 3 to 10. The strips were rehydrated for 16 h with DeStreak solution (GE Healthcare) with 0.5 % ampholine carrier (IPG buffer, GE Healthcare) plus 100 μ g of proteins of the fruit, in a final volume of 150 μ L. The IEF was carried out in the Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing System (GE Healthcare, USA) under the conditions indicated in Table 1. After IEF, the strips were balanced for 15 minutes in 10 mL of equilibrium buffer (6 M urea, 75 mM tris-HCl, 29.3 % glycerol, 2 % SDS [sodium dodecyl sulfate], 0.002 % bromophenol blue) with 100 mg of DTT (dithiotreitol), followed by a second 15-minute incubation in 10 mL of equilibrium buffer with 250 mg of iodoacetamide.

constante de 37 °C. Para determinar el efecto del pH se utilizaron los siguientes amortiguadores: ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES) 0.1 M para el pH 6; fosfatos 0.1 M para los valores de pH 7 y 12; y Tris-HCl 0.1 M para los valores de pH 8, 9 y 10. La actividad proteolítica se midió de acuerdo con la metodología de Natalucci et al. (1996). El efecto del NaCl se evaluó a 5, 10 y 20 % (p/v). El resultado se expresó como el porcentaje relativo a la actividad proteolítica observada en ausencia del NaCl (Moreno-Hernández et al., 2017).

Estabilidad térmica de las proteasas

La estabilidad térmica de las proteasas del jugo del fruto de *B. karatas* se evaluó a 30, 50 y 70 °C; la actividad proteolítica residual en condiciones estándares (Natalucci et al., 1996) se determinó a 0, 30, 60, 120, 180 y 240 min, y se expresó como el porcentaje relativo a la actividad proteolítica sin incubación previa.

Análisis estadístico

En la comparación de las tres colectas, la variable de respuesta actividad proteolítica se midió como unidades enzimáticas por mL de jugo y unidades enzimáticas por mg de proteína, expresadas como el promedio \pm desviación estándar. La actividad proteolítica se evaluó a cinco temperaturas, seis niveles de pH y tres concentraciones de NaCl. La estabilidad térmica se analizó gráficamente. Los datos experimentales se compararon con el análisis de varianza de un factor ($n = 4$ y $\alpha = 0.05$); posteriormente, se hizo la prueba de comparaciones múltiples de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$) (Zar, 1999). El análisis de datos se hizo con el programa R (R Core Team, 2017).

Zimografía bidimensional con caseína

Las proteasas en el extracto de *B. karatas* se detectaron mediante zimografía bidimensional con caseína, bajo condiciones no reductoras. La concentración de la proteína se determinó de acuerdo con el método de Bradford (1976), empleando albúmina de suero bovino como proteína estándar.

El isoelectroenfoco (IEF) se realizó con tiras prefabricadas con anfólinas (Immobiline Dry-Strips, GE Healthcare) de 7 cm con un gradiente de pH 3 a 10. Las tiras se rehidrataron durante 16 h con la solución DeStreak (GE Healthcare) con 0.5 % de acarreador de anfólinas (IPG buffer, GE Healthcare) más 100 μ g de proteínas del fruto, en un volumen final de 150 μ L. El IEF se llevó a cabo en el equipo Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare, EUA) bajo las condiciones indicadas en el Cuadro 1. Después del IEF, las tiras fueron equilibradas por 15 minutos en 10 mL de

Table 1. Sequence and conditions to perform isoelectrofocous on *Bromelia karatas* fruit proteins.**Cuadro 1. Secuencia y condiciones para realizar el isoelectroenfoque en proteínas de frutos de *Bromelia karatas*.**

	Voltage (V)/Voltaje (V)	Duration (min)/Duración (min)	Voltage (V·h ⁻¹)/Voltaje (V·h ⁻¹)
1	400	90	300
2	1 000	60	300
3	5 000	60	4 000
4	5 000	30	3 000

In the second dimension, the proteins were separated into 12 % polyacrylamide gel copolymerized with 0.1 % (w/v) casein; the run was carried out in a vertical electrophoresis chamber (BIO-RAD) at 130V. Precision Plus Protein 161-0373 (BIO-RAD) was used as the molecular weight marker. After electrophoresis, the polyacrylamide gel was washed with a 2.5 % Triton X-100 solution for 1 h, followed by three washes with distilled water. Subsequently, the gel was incubated for 1 h at 37 °C in development buffer (1 % [w/v] Triton X-100, 100 mM phosphate buffer, pH 7.0, 4 mM DTT and 10 mM cysteine). The gel was stained with Coomassie blue (0.75 g·L⁻¹ Coomassie R-250, 0.5 g·L⁻¹ Coomassie G-250, 10 % acetic acid, 20 % methanol and 10 % ethanol) for 1 h, then it was destained in methanol (45 %) with acetic acid (10 %) and water. Proteolytic activity was detected as unstained light areas on a blue background. Finally, the gel was scanned in a GS-900 Calibrated Densitometer (BIO-RAD) and the analysis of the image for estimating its molecular weight and isoelectric point was done by 2D PDQuest Advanced software (BIO-RAD).

Results and discussion

Bromelia karatas is a wild plant with a diversity of shapes and colors in its fruits (Montes et al., 2014), which was recently typified by Monteiro and Forzza (2016). Figure 1 shows some *B. karatas* fruits collected in the state of Yucatán, belonging to three groups of plants selected according to fruit color.

Table 2 contains the results of the proteolytic activity of *B. karatas* collections. Collection 2 (Espita) had greater activity (8.59 U·mg⁻¹) than collections 1 (6.84 U·mg⁻¹) and 3 (7.2 U·mg⁻¹) from Oxkutzcab and Mérida, respectively. The same pattern of differences was observed in proteolytic activity per mL of juice, where collection 2 was approximately 50 % higher than the others. In contrast, the protein content was similar in all three cases, so it is ruled out that the level of maturity is the determinant of the variation in proteolytic activity (Moyano et al., 2012). Proteolytic activity in *B. karatas*

amortiguador de equilibrio (urea 6 M, tris-HCl 75 mM, glicerol 29.3 %, SDS [dodecilsulfato sódico] 2 %, azul de bromofenol 0.002 %) con 100 mg de DTT (ditiotreitól), seguido por una segunda incubación de 15 minutos en 10 mL de amortiguador de equilibrio con 250 mg de iodoacetamida.

En la segunda dimensión, las proteínas se separaron en gel de poliacrilamida al 12 % copolimerizado con 0.1 % (p/v) de caseína; la corrida se llevó a cabo en una cámara de electroforesis vertical (BIO-RAD) a 130 V. Como marcador de peso molecular se utilizó Precision Plus Protein 161-0373 (BIO-RAD). Después de la electroforesis, el gel de poliacrilamida se lavó con una solución de tritón X-100 al 2.5 % durante 1 h, seguido de tres lavados con agua destilada. Posteriormente, el gel se incubó durante 1 h a 37 °C en amortiguador de desarrollo (1 % [p/v] de tritón X-100, amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.0, DTT 4 mM y cisteína 10 mM). El gel fue teñido con azul de Coomasie (0.75 g·L⁻¹ de Coomassie R-250, 0.5 g·L⁻¹ de Coomassie G-250, 10 % de ácido acético, 20 % de metanol y 10 % de etanol) durante 1 h, luego se destiñó en metanol (45 %) con ácido acético (10 %) y agua. La actividad proteolítica se detectó como zonas claras no teñidas en fondo azul. Finalmente, el gel se escaneó en el equipo GS-900 Calibrated Densitometer (BIO-RAD) y el análisis de la imagen para la estimación de su peso molecular y punto isoelectrónico se hizo mediante el software 2D PDQuest Advanced (BIO-RAD).

Resultados y discusión

Bromelia karatas es una planta silvestre con diversidad de forma y color en sus frutos (Montes et al., 2014), que fue tipificada recientemente por Monteiro y Forzza (2016). La Figura 1 muestra algunos frutos de *B. karatas* colectados en el estado de Yucatán, que pertenecen a tres grupos de plantas seleccionadas según el color del fruto.

El Cuadro 2 contiene los resultados de la actividad proteolítica de las colectas de *B. karatas*. La colecta 2 (Espita) tuvo mayor actividad (8.59 U·mg⁻¹) que las



Figure 1. *Bromelia karatas* fruits collected in the state of Yucatán. A) Collection 1 (Oxkutzcab): bone-colored and brown fruit, B) collection 2 (Espita): reddish fruit, C) collection 3 (Mérida): light pink to darker pink fruit.
Figura 1. Frutos de *Bromelia karatas* colectados en el estado de Yucatán. A) Colecta 1 (Oxkutzcab): fruto de color hueso y café, B) colecta 2 (Espita): fruto de color rojizo, C) colecta 3 (Mérida): fruto de color rosa claro a rosa más fuerte.

Table 2. Proteolytic activity of the extract of *Bromelia karatas* fruits collected in the state of Yucatán, Mexico.
Cuadro 2. Actividad proteolítica del extracto de frutos de *Bromelia karatas* colectados en el estado de Yucatán, México.

Proteolytic activity/ Actividad proteolítica	Collection 1/ Colecta 1 (Oxkutzcab)	Collection 2/ Colecta 2 (Espita)	Collection 3/ Colecta 3 (Mérida)	Control
Protein (mg·mL ⁻¹)/Proteína (mg·mL ⁻¹)	1.49 ± 0.41 b	1.45 ± 0.16 b	1.50 ± 0.57 b	0.35 ± 0.02 a
Specific activity (U·mL ⁻¹)/ Actividad específica (U·mL ⁻¹)	10.02 ± 0.47 b	15.20 ± 1.04 c	10.08 ± 0.49 b	1.20 ± 0.44 a
Specific activity (U·mg ⁻¹ of protein)/ Actividad específica (U·mg ⁻¹ de proteína)	6.84 ± 0.31 b	8.59 ± 0.72 c	7.20 ± 0.32 b	3.42 ± 1.26 a

Mean ± standard deviation. Control = *Ananas comosus* var. *comosus*. Different letters represent significant differences among collections, according to Tukey's test ($\alpha = 0.05$, $n = 4$).

Media ± desviación estándar. Control = *Ananas comosus* var. *comosus*. Letras diferentes representan diferencias significativas entre colectas, de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$, $n = 4$).

was always higher than that of *A. comosus* var. *comosus*. In this regard, it is pertinent to consider *B. karatas* as a source of proteases for the food industry (Arshad et al., 2014; de Lencastre et al., 2016). Based on the results, subsequent evaluations were made only for collection 2 (Espita), which had the greatest proteolytic activity.

Figure 2 represents the effect of pH on the proteolytic activity of *B. karatas*, which was higher at pH 6 and 7,

colectas 1 (6.84 U·mg⁻¹) y 3 (7.2 U·mg⁻¹) de Oxkutzcab y Mérida, respectivamente. El mismo patrón de diferencias se observó en la actividad proteolítica por mL de jugo, donde la colecta 2 fue aproximadamente 50 % mayor que las otras. En contraste, el contenido de proteína fue similar en los tres casos, por lo que se descarta que el nivel de madurez sea el determinante de la variación en la actividad proteolítica (Moyano et al., 2012). La actividad proteolítica en *B. karatas*

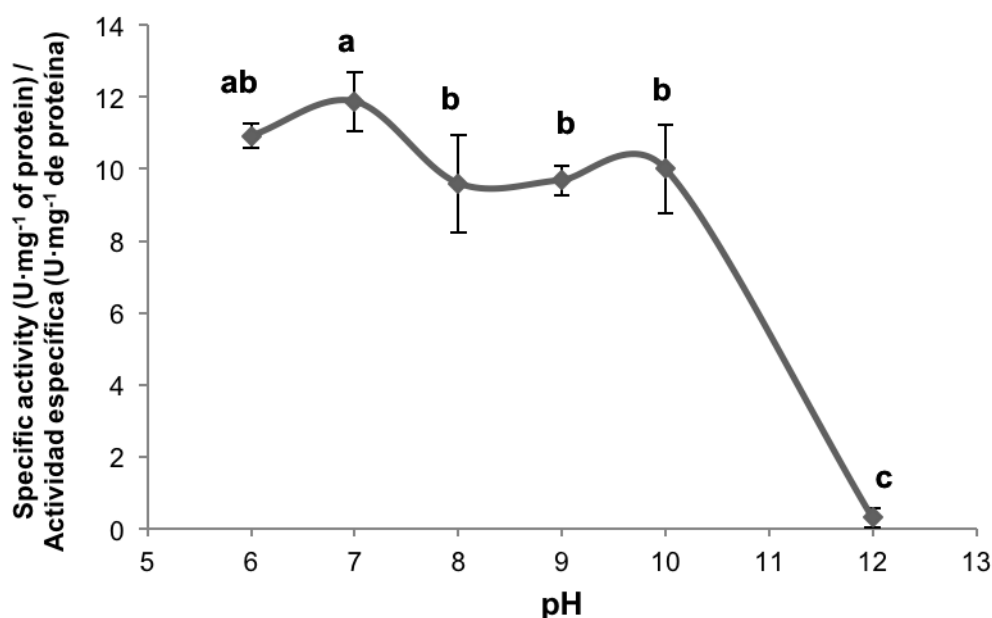


Figure 2. Effect of pH on the proteolytic activity of *Bromelia karatas* fruits collected in the state of Yucatán. Different letters indicate statistically significant differences according to Tukey's test ($\alpha = 0.05$). The bars represent the standard deviation of the mean.

Figura 2. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica de los frutos de *Bromelia karatas* colectados en el estado de Yucatán. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Las barras representan la desviación estándar de la media.

decreased slightly at pH 8, 9 and 10, and was nil at pH 12. Thus, the pH 6-10 range can be considered propitious for proteolytic activity. This pattern coincides with the pH 6-8 range for *B. karatas* and *B. pinguin* of Meza-Espinoza et al. (2017), who indicate that proteolytic activity for both species decreases when the pH is greater than 8.5.

Figure 3 shows that proteolytic activity increases as the temperature of the enzyme reaction increases from 30 to 70 °C. This temperature range would allow enzymes to adapt to the requirements of the food processes where they are used (Guadix, Guadix, Paéz-Dueñas, González-Tello, & Camacho, 2000; Li, Yu, Goktepe, & Ahmedna, 2016); however, as the incubation temperature increases, the useful life of an enzyme decreases presumably due to the denaturation of proteases (Daniel, Dines, & Petach, 1996).

The proteolytic activity of *B. karatas* juice was reduced under exposure to various temperatures and periods (Figure 4); after 210 min of incubation at 30 and 50 °C, the residual activity was around 90 %, while at 70 °C, the residual activity was about 40 %. The time that proteolytic activity is maintained at these temperatures is sufficient for protein hydrolysis processes (Guadix et al., 2000; Li et al., 2016). Meza-Espinoza et al. (2017) reported lower thermal stability; after an incubation of 37 to 60 °C for 60 minutes, proteolytic activity increased from 68 to 95 %, but decreased gradually

siempre fue mayor que la de *A. comosus* var. *comosus*. En este sentido, es pertinente considerar a *B. karatas* como fuente de proteasas para la industria alimentaria (Arshad et al., 2014; de Lencastre et al., 2016). Con base en los resultados, las evaluaciones posteriores se realizaron únicamente para la colecta 2 (Espita), la cual tuvo mayor actividad proteolítica.

La Figura 2 representa el efecto del pH sobre la actividad proteolítica de *B. karatas*, la cual fue mayor con valores de pH 6 y 7, disminuyó ligeramente con pH 8, 9 y 10, y fue nula con pH 12. De esta manera, se puede considerar el intervalo de pH 6-10 como el propicio para la actividad proteolítica. Este patrón coincide con el intervalo de pH de 6 a 8 para *B. karatas* y *B. pinguin* de Meza-Espinoza et al. (2017), quienes indican que la actividad proteolítica para ambas especies disminuye cuando el pH es mayor de 8.5.

En la Figura 3 se muestra que la actividad proteolítica aumenta conforme la temperatura de la reacción enzimática incrementa de 30 a 70 °C. Este intervalo de temperatura permitiría que las enzimas se adecuen a los requerimientos de los procesos de alimentos donde se emplean (Guadix, Guadix, Paéz-Dueñas, González-Tello, & Camacho, 2000; Li, Yu, Goktepe, & Ahmedna, 2016); sin embargo, al incrementar la temperatura de incubación, la vida útil de una enzima disminuye presumiblemente por la desnaturalización de las proteasas (Daniel, Dines, & Petach, 1996).

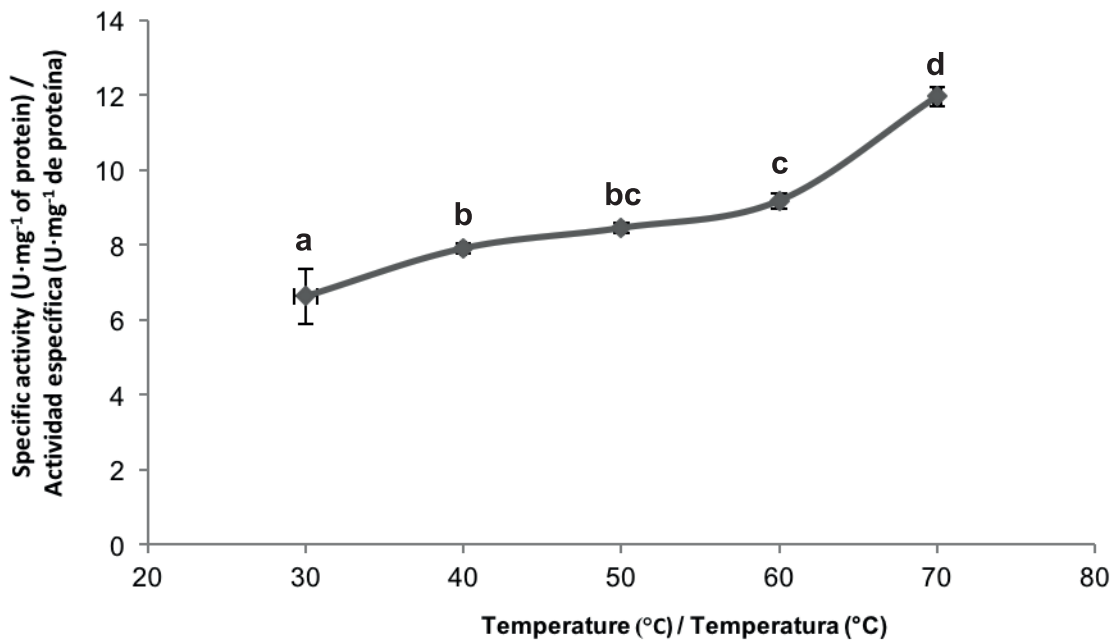


Figure 3. Effect of incubation temperature on proteolytic activity of *B. karatas* fruits. Different letters indicate statistically significant differences according to Tukey's test ($\alpha = 0.05$). The bars represent the standard deviation of the mean.

Figura 3. Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad proteolítica de los frutos de *B. karatas*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Las barras representan la desviación estándar de la media.

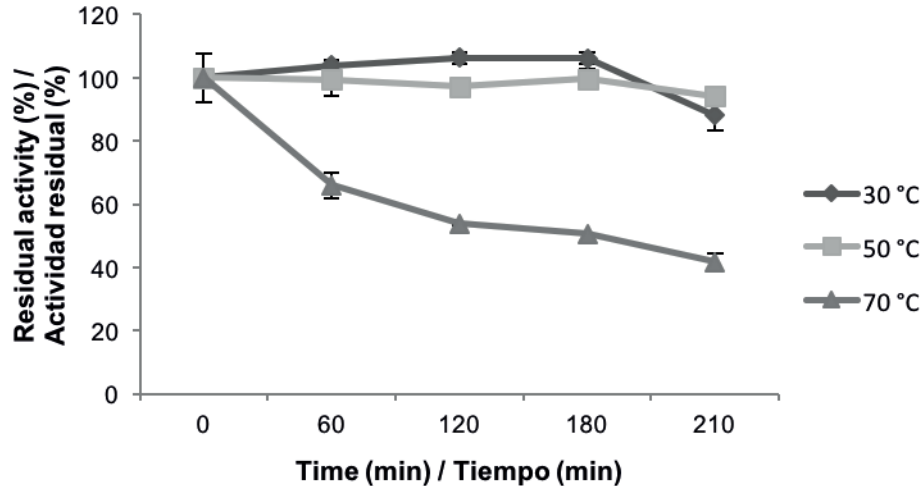


Figure 4. Evaluation of the thermal stability of proteases of *Bromelia karatas* fruits at 30, 50 and 70 °C.

Figura 4. Evaluación de la estabilidad térmica de las proteasas de los frutos de *Bromelia karatas* a 30, 50 y 70 °C.

after 120 min. The differences may be due to the fact that, in the cited work, proteins partially purified by precipitation were used, while in the present work the direct juice was used.

On the other hand, the proteolytic activity of the juice is affected by NaCl when the concentration is higher than 10 % (Figure 5). Residual activity decreases as the percentage of NaCl increases, possibly due to the

La actividad proteolítica del jugo de *B. karatas* se redujo bajo la exposición a varias temperaturas y periodos (Figura 4); después de 210 min de incubación a 30 y 50 °C, la actividad residual fue alrededor de 90 %, mientras que, a 70 °C, la actividad residual fue de aproximadamente 40 %. El tiempo en que la actividad proteolítica se mantiene a estas temperaturas es suficiente para los procesos de hidrólisis proteica (Guadix et al., 2000; Li et al., 2016). Meza-Espinoza

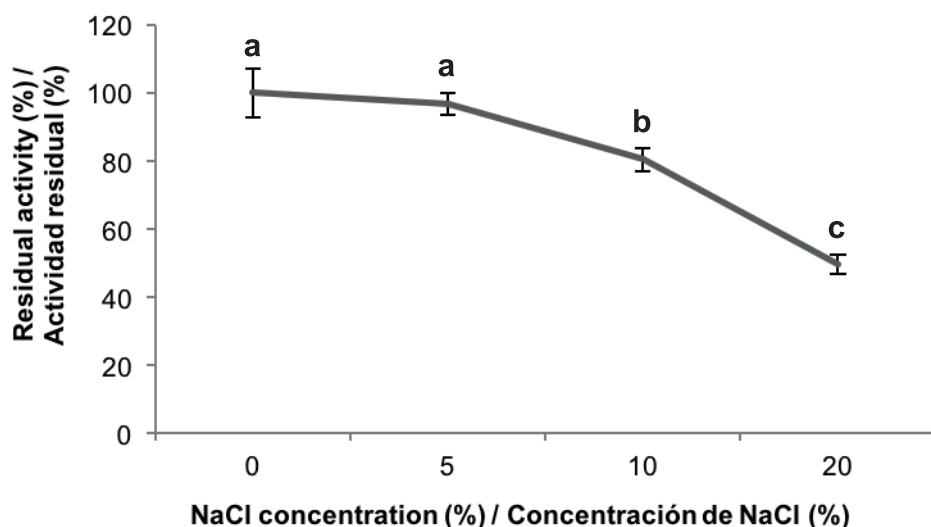


Figure 5. Effect of NaCl on the proteolytic activity of *Bromelia karatas* fruits. Different letters indicate statistically significant differences according to Tukey's test ($\alpha = 0.05$). The bars represent the standard deviation of the mean.

Figura 5. Efecto del NaCl sobre la actividad proteolítica de los frutos de *Bromelia karatas*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Las barras representan la desviación estándar de la media.

interaction of salt ions with water, which induces a loss of protease solubility (Moreno-Hernández et al., 2017). However, in concentrations of 5 to 10 % NaCl, the proteolytic activity of *B. karatas* juice is high (80 to 96 %), so its use is possible in products such as meat softeners, where marinating is done with a less than 5 % NaCl concentration (Peña, Duran, & Baleta, 2015).

Figure 6 shows the zymogram obtained for the detection of proteolytic activity in *B. karatas*. The two-dimensional zymogram of *B. karatas* fruit, under non-reducing conditions, showed at least 40 light areas with apparent molecular weights between 27.3 and 290 kDa, with isoelectric points between 4.6 and 9.7 (Table 3). The 40 detected light areas potentially represent proteases including karatasin (Montes et al., 1990) and most of the proteases (between 21 and 97 kDa under non-reducing conditions) reported by Meza-Espinoza et al. (2017). This variety of molecular weights may be due in part to the association of several karatasin units among their cysteine residues (Meza-Espinoza, 2017; Montes et al., 1990).

Two-dimensional zymography can offer a complete map of the proteases present, allow their identification, including isotypes, and provide information for their isolation (Larocca, Rossano, Santamaria, & Riccio, 2010). In the case of *B. karatas*, there are no previous studies of 2D zymograms; however, in other Bromeliad species, the isoelectric points range from 3.1 to 8.9 (Bruno, Pardo, Caffini, & López, 2002), which is similar

et al. (2017) reportaron una estabilidad térmica menor; después de una incubación de 37 a 60 °C por 60 minutos, la actividad proteolítica aumentó de 68 a 95 %, pero disminuyó gradualmente después de 120 min. Las diferencias pueden deberse a que en el trabajo citado se emplearon proteínas purificadas parcialmente por precipitación, mientras que en el presente trabajo se utilizó el jugo directo.

Por otra parte, la actividad proteolítica del jugo es afectada por el NaCl cuando la concentración es mayor de 10 % (Figura 5). La actividad residual disminuye a medida que el porcentaje de NaCl aumenta, debido posiblemente a la interacción de los iones de la sal con el agua, que inducen una pérdida de la solubilidad de las proteasas (Moreno-Hernández et al., 2017). No obstante, en concentraciones de 5 a 10 % de NaCl, la actividad proteolítica del jugo de *B. karatas* es alta (80 a 96 %), por lo que su uso es posible en productos como suavizadores de carnes, donde el marinado se realiza con menos de 5 % de concentración de NaCl (Peña, Duran, & Baleta, 2015).

La Figura 6 muestra el zimograma obtenido para la detección de actividad proteolítica en *B. karatas*. El zimograma bidimensional del fruto de *B. karatas*, bajo condiciones no reductoras, mostró por lo menos 40 zonas claras con pesos moleculares aparentes comprendidos entre 27.3 y 290 kDa, con puntos isoeléctricos entre 4.6 y 9.7 (Cuadro 3). Las 40 zonas claras detectadas representan potencialmente proteasas que

to what was found in this work. Variations in isoelectric points can be attributed to post-translational modifications (Kozłowski, 2016) or to changes in some amino acids, which are reflected in enzyme activity, as occurs in *B. pinguin* proteases (Payrol, Obregón, Trejo, & Caffini, 2008).

incluyen la karatasina (Montes et al., 1990) y la mayoría de las proteasas (entre 21 y 97 kDa en condiciones no reductoras) reportadas por Meza-Espinoza et al. (2017). Esta variedad de pesos moleculares puede deberse en parte a la asociación de varias unidades de la karatasina

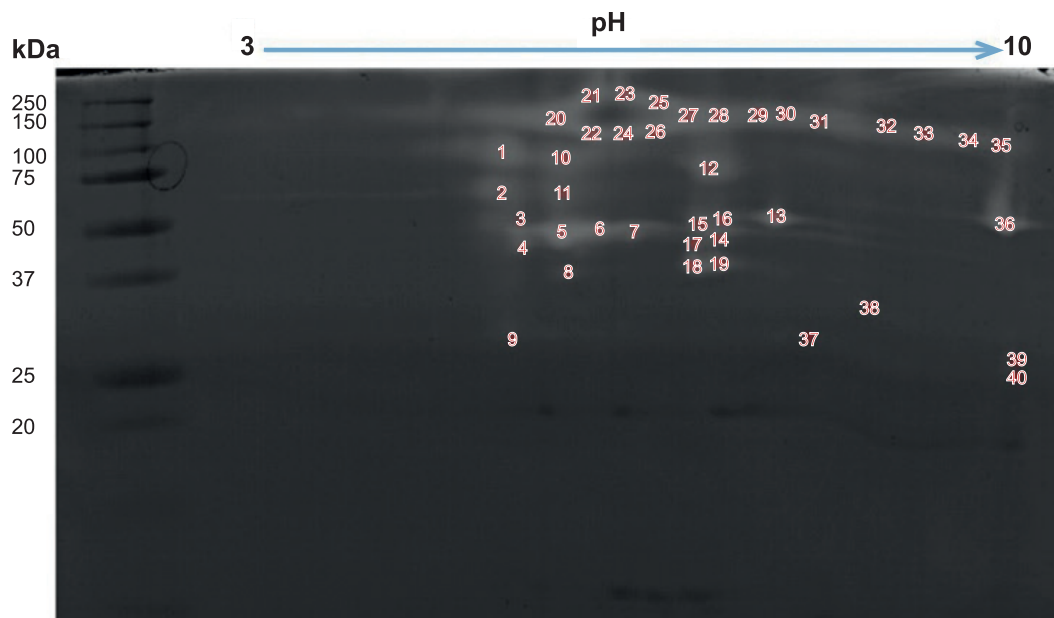


Figure 6. Two-dimensional zymogram with casein and Coomassie blue staining for the detection of proteolytic activity of *Bromelia karatas* juice under non-reducing conditions. Light areas indicate the presence of proteolytic activity.

Figura 6. Zimograma bidimensional con caseína y tinción con azul de Coomassie para la detección de actividad proteolítica del jugo de *Bromelia karatas* bajo condiciones no reductoras. Las zonas claras indican la presencia de actividad proteolítica.

Table 3. Relationship of molecular weights (MW) and isoelectric points (IP) of proteases detected by two-dimensional zymography in *Bromelia karatas* juice under non-reducing conditions.

Cuadro 3. Relación de los pesos moleculares (PM) y los puntos isoelectrónicos (PI) de las proteasas detectadas por zimografía bidimensional en jugo de *Bromelia karatas* bajo condiciones no reductoras.

Light area/ Zona clara	MW/PM	IP/PI	Light area/ Zona clara	MW/ PM	IP/PI	Light area/ Zona clara	MW/PM	IP/PI
1	102.5	4.7	15	52.6	6.5	29	169.6	7.3
2	68.9	4.6	16	56.1	6.8	30	184.7	7.6
3	50.0	4.9	17	46.5	6.5	31	170.4	7.9
4	46.3	4.9	18	41.1	6.6	32	141.1	8.5
5	48.9	5.2	19	41.0	6.8	33	130.1	8.9
6	50.4	5.6	20	187.0	5.2	34	114.9	9.3
7	49.6	6.0	21	290.5	5.6	35	105.9	9.6
8	38.9	5.3	22	141.1	5.6	36	52.9	9.6
9	29.8	4.8	23	282.5	5.9	37	29.6	7.7
10	93.1	5.2	24	142.0	5.9	38	34.0	8.2
11	68.4	5.2	25	250.7	6.2	39	29.6	9.7
12	81.7	6.7	26	142.9	6.1	40	27.3	9.7
13	55.6	7.4	27	196.4	6.5			
14	49.1	6.7	28	195.1	6.9			

The results show the potential of *B. karatas* as an alternative source of proteases. However, characterization of the proteases of this species, by sequencing the proteins with the highest proteolytic activity, is important to determine diversity, molecular weight, and isolating points accurately.

Conclusions

The proteolytic activity of the wild fruits of *Bromelia karatas* of the state of Yucatan is greater than that of *Ananas comosus* var. *comosus*. This activity is due to the effect of a mixture of proteases with variable molecular weights in non-reducing conditions. *Bromelia karatas* proteases are stable at 30 to 50 °C for at least three hours; the optimal working pH range is 6 to 10, and enzyme activity remains high (80 %) at 10 % NaCl concentration. Given the above characteristics, *B. karatas* can be considered as an alternative source of proteases for the food industry.

End of English version

References / Referencias

- Arshad, Z. I. M., Amid, A., Yusof, F., Jaswir, I., Ahmad, K., & Loke, S. P. (2014). Bromelain: overview of industrial application and purification strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(17), 7283–7297. doi: 10.1007/s00253-014-5889-y
- 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. Retrieved from http://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford_assay.pdf
- Bruno, M. A., Pardo, M. F., Caffini, N. O., & López, L. M. I. (2002). Purification of a new endopeptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 21(1), 51–56. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/267974610_Purification_of_a_New_Endopeptidase_Isolated_from_Fruits_of_Bromelia_hieronymi_Mez_Bromeliaceae
- Daniel, R. M., Dines, M., & Petach, H. H. (1996). The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperatures. *Biochemical Journal*, 317, 1-11. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1217448/pdf/8694749.pdf>
- de Lencastre, N. L. C., Jozala, A. F., Lopes, A. M., Santos-Ebinuma, C. V., Mazzola, P. G., & Pessoa, J. A. (2016). Stability, purification, and applications of bromelain: A review. *Biotechnology Progress*, 32(1), 5–13. doi: 10.1002/btpr.2190
- Espejo-Serna, A., & López-Ferrari, A. R. (2010). Flora del Bajío y de regiones adyacentes: Bromeliaceae. Retrieved from [entre sus residuos de cisteína \(Meza-Espinoza, 2017; Montes et al., 1990\).](#)
- La zimografía 2-D puede ofrecer un mapa completo de las proteasas presentes, permite su identificación, incluyendo los isotipos, y proporciona información para su aislamiento (Larocca, Rossano, Santamaria, & Riccio, 2010). Para el caso de *B. karatas*, no se cuenta con estudios previos de zimogramas 2-D; sin embargo, en otras especies de *Bromelia*, los puntos isoléctricos oscilan entre 3.1 y 8.9 (Bruno, Pardo, Caffini, & López, 2002), lo cual es similar a lo encontrado en este trabajo. Las variaciones de los puntos isoeléctricos pueden atribuirse a las modificaciones postraduccionales (Kozlowski, 2016) o a los cambios de algunos aminoácidos, que se reflejan en la actividad enzimática, como ocurre en las proteasas de *B. pinguin* (Payrol, Obregón, Trejo, & Caffini, 2008).
- Los resultados muestran el potencial de *B. karatas* como fuente alternativa de proteasas. No obstante, la caracterización de las proteasas de esta especie, mediante la secuenciación de las proteínas con mayor actividad proteolítica, es importante para determinar la diversidad, el peso molecular y los puntos isoléctricos con exactitud.

Conclusiones

La actividad proteolítica de los frutos silvestres de *Bromelia karatas* del estado de Yucatán es mayor que la de *Ananas comosus* var. *comosus*. Dicha actividad se debe al efecto de una mezcla de proteasas con pesos moleculares variables en condiciones no reductoras. Las proteasas de *B. karatas* son estables de 30 a 50 °C hasta por lo menos tres horas; el intervalo de pH óptimo de trabajo es de 6 a 10; y la actividad enzimática se mantiene alta (80 %) en concentración de 10 % de NaCl. Dadas las características indicadas, *B. karatas* puede considerarse como fuente alternativa de proteasas para la industria alimentaria.

Fin de la versión en español

- [http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumenes/FLOBA/Bromeliaceae_165\(1\).pdf](http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumenes/FLOBA/Bromeliaceae_165(1).pdf)
- Espejo-Serna, A., López-Ferrari, A. R., & Ramírez-Morillo, I. (2005). Bromeliaceae. *Flora de Veracruz*, 136, 1–103. Retrieved from http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumenes/FLOVER/136-Espejo_I.pdf
- González-Salvatierra, C., Andrade, J. L., Orellana, R., Peña-Rodríguez, L. M., & Reyes-García, C. (2013). Microambiente lumínico y morfología y fisiología foliar de *Bromelia karatas* (Bromeliaceae) en una selva baja caducifolia de Yucatán, México. *Botanical Sciences*, 91(1), 75–84. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-42982013000100006&script=sci_arttext
- Guadix, A., Guadix, E. M., Paéz-Deñás, M. P., González-Tello, P., & Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79–89. Retrieved from <http://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/5735>
- Kozłowski, L. P. (2016). IPC – Isoelectric point calculator. *Biology Direct*, 11, 55. doi: 10.1186/s13062-016-0159-9
- Larocca, M., Rossano, R., Santamaria, M., & Riccio, P. (2010). Analysis of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] fruit proteinases by 2-D zymography and direct identification of the major zymographic spots by mass spectrometry. *Food Chemistry*, 123(4), 1334–1342. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.06.016
- Li, Y., Yu, J., Goktepe, I., & Ahmedna, M. (2016). The potential of papain and alcalase enzymes and process optimizations to reduce allergenic gliadins in wheat flour. *Food Chemistry*, 196(1), 1338–1345. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.10.089
- Meza-Espinoza, L., Vivar-Vera, M. A., García-Magaña, M. L., Sáyago-Ayerdi, S., Chacón-López, A., Becerra-Verdín, E., & Montalvo-González, E. (2017). Enzyme activity and partial characterization of proteases obtained from *Bromelia karatas* fruit and compared with *Bromelia pinguin* proteases. *Food Science and Biotechnology*, 27(2), 509–517. doi: 10.1007/s10068-017-0244-6
- Miranda, F. (1958). Estudios acerca de la vegetación. In Beltrán, E. (Ed.), *Los recursos naturales del sureste y su aprovechamiento* (pp. 215–271). México: Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables, A. C.
- Monteiro, R. F., & Forzza, R. C. (2016). Typification of *Bromelia karatas*, the type of the genus *Bromelia* (Bromeliaceae). *Taxon*, 65(5), 1101–1106. doi: 10.12705/655.12
- Montes, C., Amador, M., Cuevas, D., & Córdoba, F. (1990). Subunit structure of karatasin, the proteinase isolated from *Bromelia plumieri* (karatas). *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(1), 17–24. Retrieved from https://www.jstage.jst.go.jp/article/abb1961/54/1/54_1_17/_pdf
- Montes, R. C., Terán, G. V. F., Zuñiga, B. R. A., & Caldón, Y. E. (2014). Descripción morfológica de *Bromelia karatas*, recurso genético promisorio. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(1), 62–70. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v12n1/v12n1a08.pdf>
- Moreno-Hernández, J. M., Hernández-Mancillas, X. D., Navarrete, E. L. C., Mazorra-Manzano, M. A., Osuna-Ruiz, I., Rodríguez-Tirado, V. A., & Salazar-Leyva, J. A. (2017). Partial characterization of the proteolytic properties of an enzymatic extract from “Aguama” *Bromelia pinguin* L. fruit grown in Mexico. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(1), 181–196. doi: 10.1007/s12010-016-2319-x
- Moyano, D. D., Osorio, R. M., Murillo, P. E., Murillo, A. W., Solanilla, D. J., Méndez, A. J., & Aristizabal, S. J. (2012). Evaluación de parámetros bromatológicos, fitoquímicos y funcionalidad antioxidante de frutos de *Bromelia karatas* (Bromeliaceae). *Vitae*, 19(1), S439–S441. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/1698/169823914138.pdf>
- Natalucci, C. L., Brullo, A., López, L. M. I., Hilal, R. M., & Caffini, N. O. (1996). Macrodontin, a new protease isolated from fruits of *Pseudananas macrodentes* (Morr) Harms (Bromeliaceae). *Journal of Food Biochemistry*, 19(6), 443–454. doi: 10.1111/j.1745-4514.1995.tb00547.x
- Natalucci, C. L., Payrol, J. A., Bruno, M. A., Martín, M. I., Pardo, M. F., Pérez, A. T., ...Caffini, N. O. (2009). Fuentes naturales de fitoproteasas: proteasas de Bromeliaceae. In Ciencia y Tecnología para el Desarrollo – CYTED (Ed.), *Enzimas proteolíticas de vegetales superiores. Aplicaciones industriales* (pp. 41–50). Buenos Aires, Argentina: Mariscal & Asociados.
- Payrol, J. A., Obregón, W. D., Trejo, S. A., & Caffini, N. O. (2008). Purification and characterization of four new cysteine endopeptidases from fruits of *Bromelia pinguin* L. grown in Cuba. *The Protein Journal*, 27(2), 88–96. doi: 10.1007/s10930-007-9111-2
- Peña, F., R., Duran, O. D. S., & Baleta, M. L. C. (2015). Efecto del marinado con NaCl y tripolifosfato-sódico sobre las propiedades bromatológicas en carne de cabra. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(1), 64–72. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v13n1/v13n1a08.pdf>
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Ramli, A. N., Aznan, T. N., & Illias, R. M. (2017). Bromelain: from production to commercialization. *Journal of the Science of Food Agricultural*, 97(5), 1386–1395. doi: 10.1002/jsfa.8122
- Zar, J. H. (1999). *Biostatistical analysis* (4th ed.). New Jersey: Prentice Hall.