



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS
Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Especialidad en Conservación y Procesamiento de Productos Marinos

**"Estudio comparativo de la estabilidad térmica de tripsina III
recombinante de sardina Monterey y tripsina bovina"**

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Brisa Giovanna Ibarra Hernandez

Hermosillo, Sonora

Enero de 2019

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Estudio comparativo de la estabilidad térmica de tripsina III recombinante de sardina Monterey y tripsina bovina”

Brisa Giovanna Ibarra Hernandez



Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores

Director de tesis



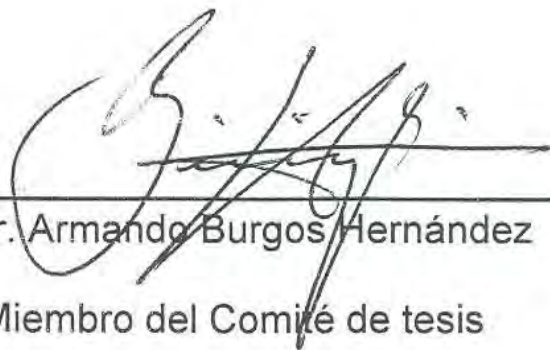
Dra. Josafat Marina Ezquerro Brauer

Miembro del Comité de tesis



Dr. José Luis Cárdenas López

Miembro del Comité de tesis



Dr. Armando Burgos Hernández

Miembro del Comité de tesis

Hermosillo, Sonora

Enero del 2019

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestro en Ciencias y Tecnología de Alimentos** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente



Q.A. Brisa Giovanna Ibarra Hernandez



Dr. Francisco Rodríguez Félix

Coordinador del Programa de Posgrado

Hermosillo, Sonora

Enero del 2019

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad de Sonora**, la cual me abrió sus puertas y me dio la oportunidad de avanzar en mi formación profesional.

Al **Departamento de Investigación y Posgrado en alimentos (DIPA)**, por aceptarme en su programa y darme la oportunidad de seguir preparándome.

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo financiero a través del proyecto CB0212/ 180498: "Determinantes moleculares de la adaptación al frío en tripsinas de sardina (*Sardinops sagax caerulea*): funciones de residuos específicos mediante mutagénesis dirigida.

A mi director de tesis, **Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores**, por permitirme trabajar a su lado durante estos dos años y contribuir en mi formación profesional y humana.

A los miembros del comité de tesis, mi codirectora, **Dra. Josafat Marina Ezquerra Brauer** y sinodales, el **Dr. José Luis Cárdenas López** y **Dr. Armando Burgos Hernández**, por sus valiosas observaciones y apoyo académico, así como contribución en mi trabajo.

A la Dra. **Ofelia Rozaud Sáñez** por su preparación y asesoría en la técnica de calorimetría de barrido diferencial utilizada en el presente trabajo.

Al **laboratorio de Investigación en alimentos, laboratorio de generales y laboratorio de cereales**, por permitirme realizar mi trabajo en sus instalaciones.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación en Alimentos, del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de Sonora. El apoyo financiero para su realización fue proporcionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto CB-2012-01/180498 "DETERMINANTES MOLECULARES DE LA ADAPTACIÓN AL FRÍO EN TRIPSINA DE SARDINA (*Sardinops sagax caerulea*): FUNCIÓN DE RESIDUOS ESPECÍFICOS MEDIANTE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA" y una beca para estudios de posgrado.

A mis compañeros en el laboratorio, Elena Moreno, Machuy Moreno, Manuel Carretas y Luis Morado. No hay palabras para describir lo mucho que les agradezco por todo. Me ayudaron a crecer tanto. Siempre estuvieron ahí, apoyándome en todo momento. Sin duda hicieron de mi estancia en el laboratorio una de las mejores experiencias en mi vida. Chicos quiero ser como ustedes cuando sea grande.

También a los frikis y no frikis, Emma Valenzuela, Rosa López, Claudia Murrieta, Jesús Encinas, Iván Tolano, Iván Gonzales, Samara Solorio, Leslie Chaidez, Isabel Arredondo, Francisco Cadenas, Rafael Dávila, Ángel Tapia, por todos los momentos agradables juntos.

A mis compañeros del programa de posgrado, Perla Armenta, Alma Salazar, Jaqueline Muñoz, Aida Fenech (casi una de nosotros), Cindy Padilla, Carolina Sosa, Roberto Salazar, Iliana Campa, Carolina Watanabe, Marlene Cota, Sócrates Almirudis, Martín Hernández, José Luis López y Carlos Muñoz, que, aunque todos sudamos la gota gorda, también nuestra etapa en el programa estuvo cargada de muy buenos momentos juntos.

También quiero agradecer a otros amigos que, aunque no todos fueron parte de la carrera de posgrado son una parte muy importante en mi vida, Flor Villalba, Joan Ibarra, Rocío Villegas, Julián Rodríguez, Valeria Molina, Laura Portillo, Héctor Bustamante, Guadalupe Rodríguez y Manuel Lizárraga.

¡A todos muchas gracias!

DEDICATORIA

Este trabajo lo quiero dedicar con mucho cariño a mi familia y amigos, por siempre estar allí apoyándome, animándome y ayudándome a crecer.

RESUMEN

La tripsina (EC 3.4.21.4) es una de las enzimas digestivas más importantes en muchos vertebrados. Su función es hidrolizar proteínas y péptidos en el lado carboxilo de los aminoácidos básicos Arg y Lys y su participación es fundamental en procesos biológicos de digestión. El estudio de tripsinas de peces que habitan en aguas frías se ha incrementado, debido a que para contrarrestar el efecto de las bajas temperaturas sus enzimas poseen características de adaptación al frío, tales como una alta eficiencia catalítica y una baja estabilidad térmica; particularidades que pueden ser aprovechadas para aplicaciones industriales y biotecnológicas. La adaptación al frío sugerida para la tripsina de sardina Monterey hace que sus enzimas digestivas sean únicas, por ello se utilizó como modelo de estudio para para la isoforma de tripsina III recombinante de sardina Monterey.

En el presente trabajo, se purificó la enzima por medio de una serie de pasos cromatográficos, se evaluaron los perfiles de actividad residual contra temperatura y se determinó la estabilidad térmica por las técnicas de calorimetría de barrido diferencial y espectroscopía de dicroísmo circular. Como resultado, se logró obtener una tripsina III recombinante de sardina Monterey de 24 kDa, cuyos parámetros termodinámicos mostraron una Tiempo de vida media de 47 min a 50 °C, T_m de 60 °C y 58.40 °C por diversas técnicas, y $\Delta H = 41.65$ kcal/mol. Estos valores indicaron que la sardina Monterey presenta características de una enzima adaptada al frío y muestra una mayor estabilidad térmica en relación a su estructura global que su contraparte bovina y sugiere menor estabilidad en regiones relacionadas con su sitio activo.

CONTENIDO

APROBACIÓN	ii
DERECHOS DE AUTOR.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA.....	v
RESUMEN	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS.....	x
ANEXOS	xi
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
Estabilidad de Enzimas Globulares.....	3
Adaptación al Frío	4
Enzimas Serina Proteasas	7
Tripsina	8
Mecanismo de Acción de Tripsina	10
Mecanismos de Adaptación de Tripsinas.....	13
Generalidades de Sardina Monterey.....	16
Sardina Monterey como Fuente de Proteasas.....	19
Estado del Arte de Tripsina III de Sardina Monterey.....	19
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	22
Objetivo General	22
Objetivos Particulares	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Purificación de Tripsina III	23

Electroforesis SDS PAGE	24
Determinación de la Estabilidad Térmica	25
Ensayo de Estabilidad Térmica en Función del Tiempo	25
Estabilidad Térmica por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	25
Análisis Estructural por Dicroísmo Circular	27
RESULTADOS Y DISCUSIONES	29
Purificación de la Tripsina III Recombinante de Sardina Monterey	29
Estabilidad Térmica en Función del Tiempo.....	31
Dicroísmo Circular	35
Calorimetría de Barrido Diferencial	39
CONCLUSIÓN	43
ANEXOS	45

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Inactivación y desplegamiento de enzima adaptada al frío y homóloga mesófila.....	6
Figura 2. Estructura in silico de la tripsina III de sardina Monterey (Sardinops sagax).	9
Figura 3. Mecanismo de catálisis de tripsina.	11
Figura 4. Alineamiento de secuencias deducidas de aminoácidos de tripsinas del grupo I y grupo III.	14
Figura 5. Distribución de sardina Monterey.	17
Figura 6. Sardina Monterey (Sardinops Caeruleus).	18
Figura 7. Purificación de tripsina III de sardina Monterey.	30
Figura 8. Estabilidad térmica por efecto de la temperatura de tripsina III de sardina Monterey y tripsina bovina. Actividad residual a pH de 7.5 después de la incubación con 1mM de BAPNA por 60 min en temperaturas de 30, 50 y 60 °C.	33
Figura 9. Determinación de los sitios de corte Identificación de los sitios de corte dentro de la secuencia de aminoácidos que son susceptibles a la autólisis de la tripsina III de sardina Monterey y la tripsina bovina.....	34
Figura 11. Curva de desplegamiento térmico ajustada de la tripsina III de sardina Monterey obtenida por dicroísmo circular (CD).	37
Figura 12. Curva de desplegamiento térmico ajustada de la tripsina III de la tripsina bovina obtenida por dicroísmo circular (CD).	38
Figura 10. Termograma de tripsina III de sardina Monterey y tripsina bovina.	40

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Parámetros termodinámicos de la tripsina III de sardina Monterey y tripsina bovina.....	41

ANEXOS

Página

Anexo 1. Purificación de tripsina III de sardina Monterey por cromatografía de afinidad a benzamidina	45
--	----

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, un factor determinante para el desarrollo y supervivencia de los organismos es la temperatura. Este factor influye grandemente en los diferentes procesos metabólicos de los seres vivos. Así se ha establecido que un incremento o una disminución de la temperatura induce diversos mecanismos de adaptación, los cuáles están íntimamente vinculados con la actividad enzimática. Uno de estos mecanismos de adaptación es a través de la síntesis de enzimas que tengan la capacidad de ejercer su acción catalítica en ausencia de calor, denominándoseles enzimas adaptadas al frío. Estas enzimas además de presentar estabilidad a temperaturas inferiores a las del medio ambiente, poseen ciertas propiedades que las distinguen de sus homólogas de sangre caliente (Georlette *et al.*, 2004; Gerday *et al.*, 1997; Haard, 1992). Dentro de estas, se encuentra una alta actividad catalítica acompañada de una baja estabilidad térmica de su estructura. Para una mejor comprensión de su estabilidad estructural y mecanismos de adaptación, en diversos estudios se han realizado estudios comparativos entre las enzimas adaptadas al frío con sus contrapartes de sangre caliente, abordándose sobre todo los parámetros antes mencionados, actividad catalítica y la estabilidad térmica.

Dentro del amplio grupo de enzimas presentes en los diferentes organismos, están las serina proteasas, que son un grupo muy diverso e importante, que además poseen diferentes aplicaciones en la industria de los alimentos. En este grupo se encuentran las tripsinas, la cuál ha sido ampliamente estudiada tanto en organismos de origen terrestre como marino. Su función es hidrolizar proteínas y péptidos en el lado carboxilo de los aminoácidos básicos arginina y lisina. Su participación es fundamental para procesos biológicos de digestión (Kim *et al.*, 1992; Klomklao *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 1998).

Estudios recientes han evidenciado un grupo de isoformas denominado tripsina III en peces, las cuales presentan una mayor cercanía evolutiva con respecto a las tripsinas de organismos de sangre caliente (Roach, 2002; Spilliaert y Gudmundsdóttir, 1999). Sin embargo, muestran algunas diferencias que las caracterizan en cuanto a su estructura y secuencia de aminoácidos, tales como, una menor carga neta, modificaciones importantes en la superficie de sus lazos, una menor cantidad de aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos, así como un

elevado número de prolina. Estas diferencias han sido atribuidas una estructura más flexible y con mayor eficiencia catalítica, típica de enzimas adaptadas al frío. Sin embargo, se sugiere que las tripsinas del grupo III poseen tendencia opuestas a las isoformas de tripsina I adaptadas al frío de peces (Spilliaert y Gudmundsdóttir, 1999).

Derivado de las propiedades atribuidas a la enzimas adaptadas al frío de origen marino, y partiendo de que la sardina Monterey es una de las especies de mayor producción en México, en estudios previos se clonó y sobreexpresó en forma recombinante el tripsinógeno III de este pez, el cual mostró actividad tipo tripsina con el sustrato BApNa y presentó evidencias de su posible adaptación al frío (Castillo-Yáñez *et al.*, 2005). En estudios más recientes se logró purificar la tripsina III y se establecieron sus parámetros cinéticos y termodinámicos en relación al complejo enzima-sustrato, (Carretas-Valdez, 2013, 2018). Estos parámetros fueron muy similares a aquellos que caracterizan a una enzima adaptada al frío. Sin embargo, se encontró que la enzima presentó una reducida eficiencia catalítica al ser comparada con las tripsinas de la mayoría de los peces estudiados. Más aún, la estabilidad térmica de la tripsina III de sardina Monterey no ha sido estudiada.

La adaptación a hábitats fríos sugerida para la sardina Monterey hace que sus enzimas digestivas sean únicas. Por ello, la determinación de la estabilidad térmica de la tripsina III de sardina Monterey, así como su comparación, permitirá comprender si su estabilidad en altas temperaturas difiere de su homóloga bovina, lo que sugerirá su posible adaptación al frío. Además, la adquisición de tales conocimientos resulta esencial para aplicaciones biotecnológicas e industriales. Tales como, los procesos de hidrólisis enzimática requerido a bajas temperaturas, así como la fácil inactivación de estas enzimas en temperaturas moderadas con el fin de evitar daños en el alimento.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Estabilidad de Enzimas Globulares

Las proteínas son polímeros compuestos generalmente de 20 L-aminoácidos diferentes, unidos covalentemente por medio del enlace peptídico. Las proteínas pueden formar desde pequeñas estructuras con un dominio único, hasta grandes estructuras conformadas por múltiples cadenas polipeptídicas (Dill y MacCallum, 2012). La estructura de las proteínas globulares es dependiente de su estructura primaria; es decir, por las propiedades del enlace peptídico y las distintas cadenas laterales, las cuales restringen el movimiento alrededor del carbono α , dando origen a ciertas estructuras secundarias como hélices- α y láminas- β , conectadas frecuentemente conectadas por giros y lazos de aminoácidos (Nelson *et al.*, 2008). Las proteínas globulares necesitan estructuras terciarias y cuaternarias relativamente compactas, donde los giros y lazos forma casi la tercera parte de los aminoácidos disponibles. Como resultado, el estado globular nativo es altamente ordenado, pero también debe ser dinámico. En términos termodinámicos, la estabilidad de la estructura proteica surge de la competencia de dos factores: la entalpía (ΔH) y entropía (ΔS).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Las fuerzas que contribuyen a la entalpía son la suma de las interacciones no covalentes, tales como puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones electrostáticas y las interacciones hidrofóbicas. Mientras que la entropía, también es otro factor definido por la ecuación de la segunda ley de la termodinámica, la cual establece que es necesario la energía para crear un orden y dado que las proteínas se encuentran muy ordenadas en su estado nativo, sin las fuerzas que contribuyen a la entalpía, el estado desplegado (desnaturalizado) es mucho más entrópicamente favorable. Existe una pequeña diferencia de entropía entre el estado desplegado y el nativo de la proteína, de alrededor de 8-42 J mol⁻¹ K⁻¹. Esto resulta en una baja estabilidad del plegamiento nativo, de alrededor de 5-15 kcal/mol en términos de energía libre (Abraham y Breuil, 1995; Branden, 1999; Daniel, 1996; Nelson *et al.*, 2008).

La proteína en el estado nativo presenta el estado termodinámicamente más estable. Cualquier cambio de condiciones, tales como calor, presión, pH, solvente, alteraciones química o proteólisis, etc., puede conducir a modificaciones importantes dentro de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, proceso al cual se le denomina desplegamiento. El desplegamiento térmico es un proceso complejo, que involucra dos pasos: El estado nativo y desplegado reversible. La proteína desplegada puede resultar en agregación de la proteína, plegamiento incorrecto y cambios covalentes (Branden, 1999; Fennema, 1992; Nelson *et al.*, 2008).

La estabilidad térmica se refiere a la resistencia de la proteína para alcanzar el estado de desplegamiento irreversible y está determinada por estabilidad termodinámica y estabilidad cinética. La estabilidad termodinámica está definida por su energía libre de estabilización (ΔG) y por la temperatura de fusión (T_m). La estabilidad cinética depende de una barrera de energía para la inactivación irreversible a una determinada temperatura y tiempo (Bischof y He, 2006; Brissos *et al.*, 2014; Saqib y Siddiqui, 2018).

Adaptación al Frío

La mayoría de los hábitats en el planeta son fríos con temperaturas cercanas a los 0 °C. Estas bajas temperaturas se deben principalmente a que el 71 % de la tierra está cubierto de océanos con temperaturas constantes de 2-4 °C, por debajo de 1000 m de profundidad. A pesar de ello, un gran número de organismos, tales como bacterias, levaduras, algas, invertebrados marinos e insectos, son capaces de crecer en este tipo de hábitats (Feller, 2013; Hoyoux *et al.*, 2004). La temperatura es uno de los principales factores ambientales fundamentales para la vida, debido a su fuerte influencia en muchos procesos fisiológicos, tales como la fluidez de la membrana celular, la viscosidad del agua, las interacciones proteína-proteína, las velocidades de todas las reacciones enzimáticas, etc. (Wintrode y Arnold, 2001). En el caso de las reacciones enzimáticas, los organismos requieren compensar el efecto de las bajas temperaturas por medio de la adaptación de ciertos componentes moleculares para funcionar de manera óptima (Georlette *et al.*, 2004; Wintrode y Arnold, 2001). Entre los distintos mecanismos adoptados, se encuentra

el aumento de la concentración de enzima en la célula, la cual puede significar una estrategia energéticamente costosa. También, el cambio en la expresión de isoenzimas con distintas temperaturas óptimas, el cual es un proceso útil para los mecanismos de adaptación reversibles estacionales, tal como el caso de los peces. Otra alternativa, es la síntesis de enzimas que presenten adaptación al frío (Georlette *et al.*, 2004; Haard, 1992).

En particular, las enzimas adaptadas al frío presentan estabilidad a temperaturas por arriba de la temperatura ambiental. Sin embargo, exhiben ciertas características que las distinguen de sus homólogas de mamíferas de sangre caliente. Generalmente, muestran alta actividad específica en bajas temperaturas, posiblemente por efecto de una presión selectiva con mayor desplazamiento hacia la actividad específica que a factores de estabilidad. Este logro puede requerir una adaptación conformacional que posiblemente pueda dar lugar a una estabilidad limitada incluso a temperaturas moderadas (Gerday *et al.*, 1997). Un ejemplo de ello es mostrado en la figura 1, la cual ilustra la estabilidad de la estructura determinada por fluorescencia para una enzima adaptada al frío y su contraparte de hábitat cálido. La enzima adaptada al frío es la primera en perder la actividad, incluso un poco antes de que la proteína comience a desnaturalizarse, sugiriéndose entonces, un sitio activo con menor estabilidad térmica que la estructura completa de la proteína. Esto coincide con el concepto central de la adaptación al frío, el cual dicta que las enzimas presentan estabilidad y flexibilidad (menor rigidez) en regiones como el sitio activo, que resultan en un alta labilidad térmica de la actividad, mientras que otras regiones de la proteína pueden o no mostrar baja estabilidad aún cuando no están involucradas en la catálisis (Fields y Somero, 1998; Lonhienne *et al.*, 2000).

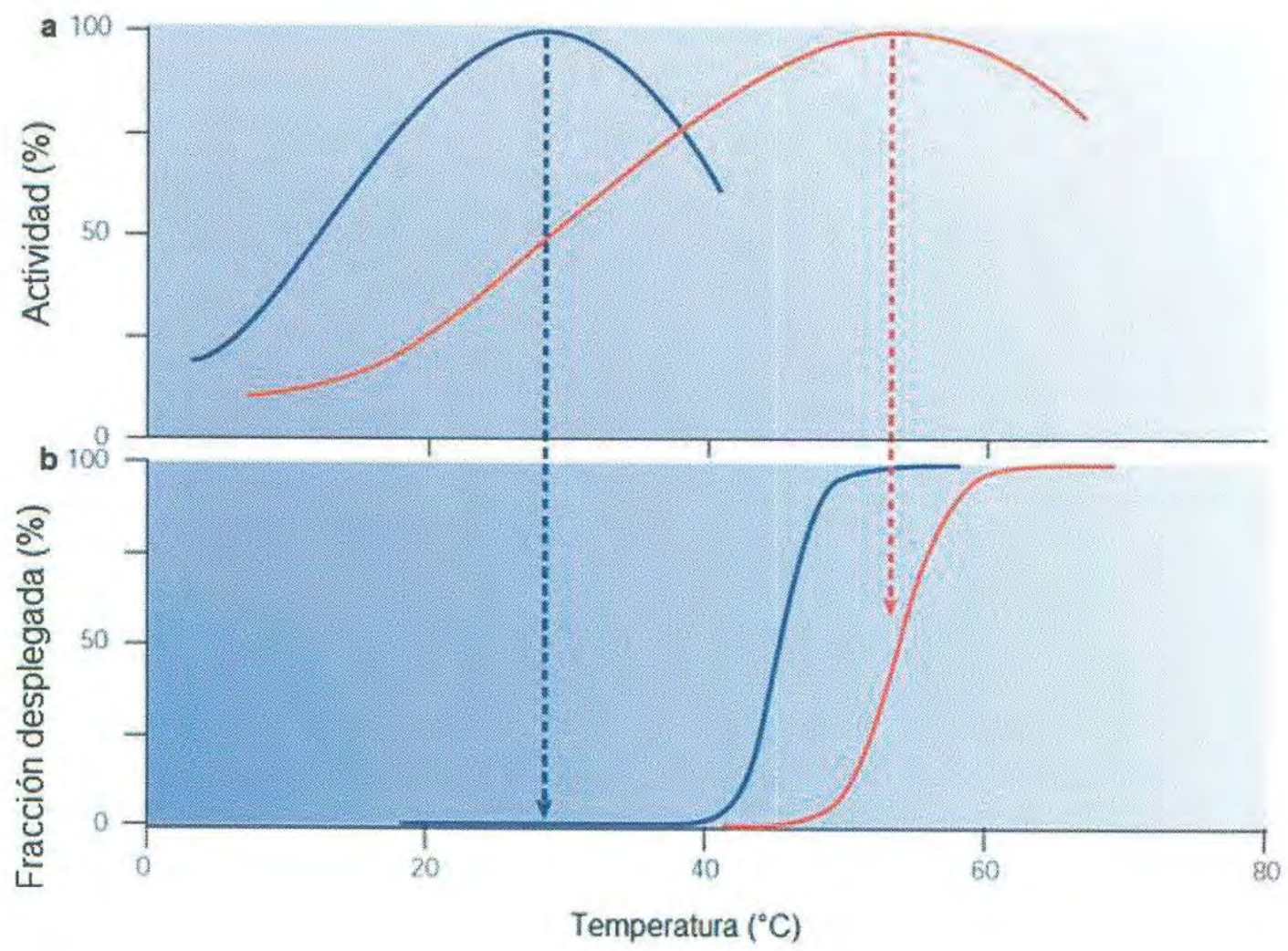


Figura 1. Inactivación y desplegamiento de enzima adaptada al frío y homóloga mesófila.

Fuente: Feller y Gerday (2003).

Los diversos conocimientos de la estrecha relación entre la actividad y la estabilidad térmica de enzimas adaptadas al frío han llevado al estudio comparativo de las enzimas adaptadas al frío y sus homólogas mesófilas para una mejor comprensión de su estabilidad conformacional, así como sus mecanismos de adaptación.

La estabilidad térmica de enzimas adaptadas al frío puede ser medido por diversas técnicas, tales como la desactivación de la actividad en función de la temperatura (perfiles de actividad-temperatura o tiempo de vida media de desactivación en diferentes temperaturas), o bien, puede determinarse a partir de la transición nativo-desplegado de la estructura de las proteínas, a través técnicas directas como la calorimetría de barrido diferencial, dicroísmo circular, fluorescencia etc. Obteniéndose parámetros termodinámicos que caracterizan dicha estabilidad, como entalpía (ΔH), entropía (ΔS) y energía libre (ΔG), así como temperatura de fusión (T_m). (Feller, 2013; Hoyoux *et al.*, 2004; Leiros *et al.*, 2000).

Enzimas Serina Proteasas

Las enzimas serina proteasas son un grupo de proteínas muy numerosos y ampliamente diversos. Las enzimas se encuentran presentes en virus, bacterias y eucariontes. Abarcan distintos grupos como endopeptidasas, exopeptidasas, oligopeptidasas y omega peptidasas. Son clasificadas con base en sus similitudes estructurales, agrupándose en 20 familias. (Polgár, 2005; Rao *et al.*, 1998).

Las serinas proteasas se caracterizan por poseer un residuo de serina en su sitio activo. La mayoría de estas enzimas llevan a cabo el mismo tipo de mecanismos de reacción con la participación de la triada catalítica de serina (nucleófilo), aspartato (electrófilo) e histidina (base), para hidrolizar selectivamente los enlaces peptídicos (Fastrez y Fersht, 1973; Rao *et al.*, 1998; Volz *et al.*, 2005). Generalmente, estas proteasas son catalíticamente activas en pH neutros y alcalinos con pH óptimos entre 7-11, donde muestran amplia especificidad, incluyendo actividad esterolítica y amidasa (Rao *et al.*, 1998).

La función que cumplen es muy importante para los procesos fisiológicos de los organismos, tales como la digestión, respuesta inmune, coagulación de la sangre, reproducción, etc (Polgár, 2005). Dentro de este grupo, las más importantes son las tripsinas, quimotripsinas y elastasas. Las tripsinas han sido altamente

estudiadas a nivel de secuencia, estructura y función tanto en organismos mamíferos como marinos, convirtiéndose en un excelente modelo de estudio (Ágeirsson *et al.*, 1989; Haard y Simpson, 2000; Male *et al.*, 1995).

El estudio de tripsinas dirigido principalmente a especies marinas, se ha incrementado de forma significativa, especialmente en peces que habitan en aguas frías, debido a que al ser organismos poiquiloterms, utilizan como estrategia de adaptación la alta eficiencia catalítica para poder sobrevivir a las bajas temperaturas; dicha catálisis ha mostrado ser generalmente mayor que en tripsinas caracterizadas de especies terrestres (Ágeirsson *et al.*, 1989; Bougatef, 2013; Haard, 1992; Khangembam y Chakrabarti, 2015). Esta alta eficiencia catalítica a bajas temperaturas de proteasas de peces puede ser de gran ventaja para varias aplicaciones en la industria de alimentos, especialmente en procesos que requieren bajas temperaturas (Bougatef, 2013).

Tripsina

La tripsina (EC 3.4.21.4) es una de las enzimas digestivas más importantes en muchos vertebrados. Su función es hidrolizar proteínas y péptidos en el lado carboxil de los aminoácidos básicos Arg y Lys y su participación es fundamental para procesos biológicos de digestión, activación de zimógenos de quimiotripsina y otras enzimas (Kim *et al.*, 1992; Klomklao *et al.*, 2006). La producción de la enzima se realiza en el páncreas, donde es secretado en forma inactiva como tripsinógeno, posteriormente es activada por una enteropeptidasa, mediante un corte específico entre la Lys15 y la Ile16, la Ile pasa a formar el nuevo extremo amino, cuya interacción con aminoácidos internos permite el plegamiento de la enzima activa (Gildberg *et al.*, 2000).

La tripsina se encuentra formada por un solo monómero con un peso molecular generalmente de 22-30 kDa. La estructura de tripsina (Figura 2), se caracteriza por poseer dos dominios N- y C-terminal, donde cada uno presenta un plegamiento de del tipo barril- β , conformado por seis láminas β dispuestas antiparalelamente.

Dentro de la estructura también se encuentra una pequeña proporción de hélices- α , especialmente en el dominio C-terminal y la presencia de seis enlaces disulfuro que estabilizan la estructura.

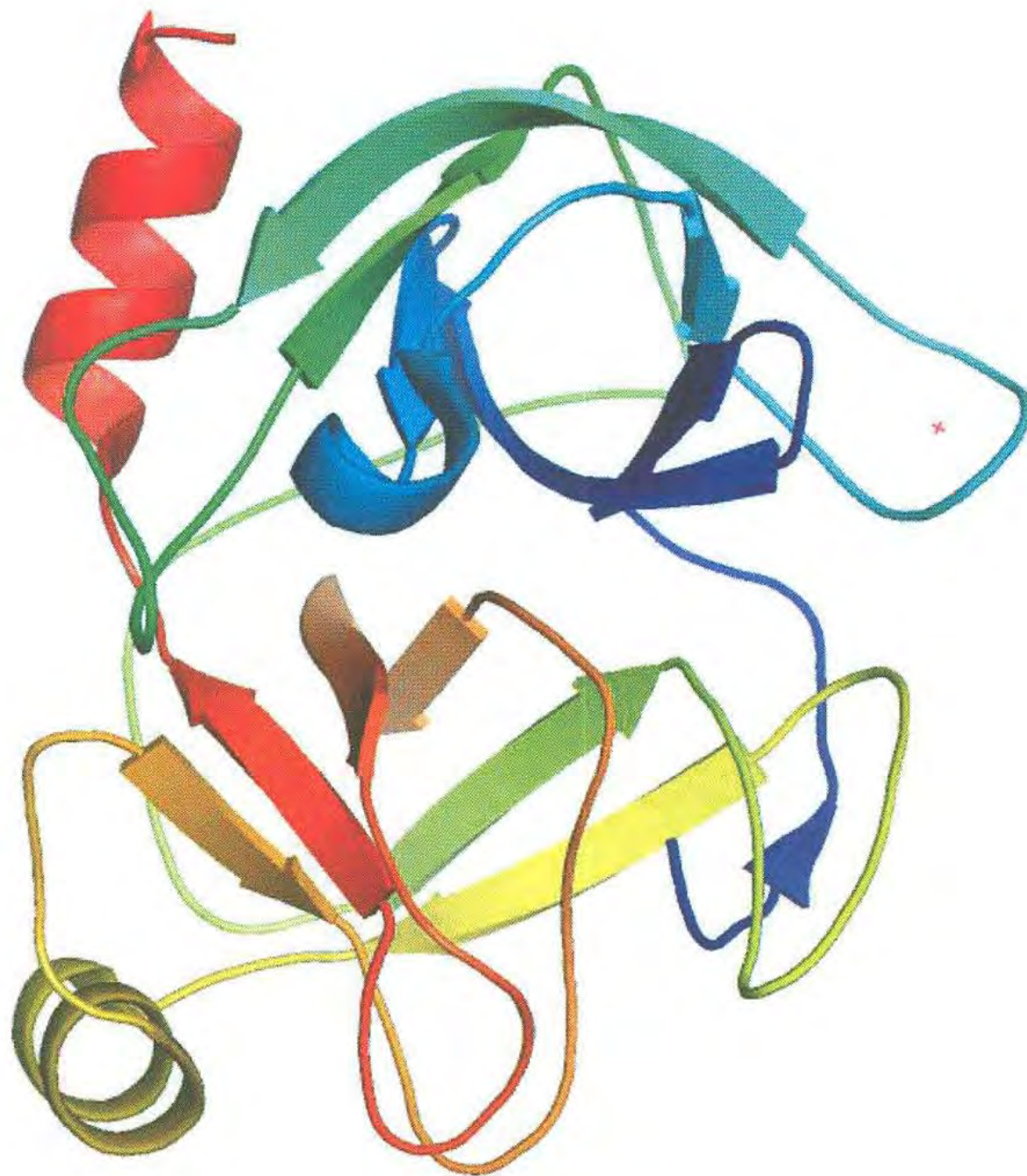


Figura 2. Estructura *in silico* de la tripsina III de sardina Monterey (*Sardinops sagax*).

Fuente: Elaboración propia.

El sitio activo se ubica en la interfase formada entre los dos dominios, dentro de este se ubica la tríada catalítica formada por los aminoácidos His 75 y Asp 102, provenientes del dominio N-terminal, y la Ser 195, que surge del dominio C-terminal (Bode *et al.*, 1976; Helland *et al.*, 1998; Huber y Bode, 1978; Vandermarliere *et al.*, 2013).

Mecanismo de Acción de Tripsina

El mecanismo de acción de la tripsina es el mismo que llevan a cabo las enzimas serina proteasas (Figura 3). Este consiste en la hidrólisis del péptido a través de una serie de pasos. La reacción inicia con el hidroxilo (nucleófilo) de la serina que ataca al átomo de carbono del carbonilo del sustrato (paso 1), esto provoca un reordenamiento que va a permitir la formación de un complejo intermediario (paso 2), el cual es principalmente estabilizado por el oxígeno del carbonilo del sustrato, debido a la unión que forma con un grupo NH dentro de la cavidad, estas interacciones también estabilizan los estados de transición que adquiere la enzima. En el siguiente paso, este complejo intermediario se desestabiliza para colapsar y generar dos cadenas, un componente acil-enzima y una amina primaria (paso 3). Dicha etapa es facilitada por la transferencia del protón del grupo histidina (cargado positivamente) a la amina primaria recién formada. De esta manera, el componente amina sale de la molécula (paso 4) y es remplazada por una molécula de agua (paso 5). La molécula de agua ataca al grupo carbonilo y a la vez, el grupo amino de la histidina le roba un protón a esta molécula de agua. Esto permite que en el paso siguiente se forme nuevamente un intermediario (paso 6), que una vez desestabilizado, dará lugar a la formación de un producto de ácido carboxílico. Finalmente, el grupo amino de la histidina estabilizará por medio de un protón al hidroxilo de la serina para facilitar así la salida del producto del ácido carboxílico (paso 7). Esto prepara a la enzima para la unión con un nuevo sustrato (Berg *et al.*, 2002; Vandermarliere *et al.*, 2013).

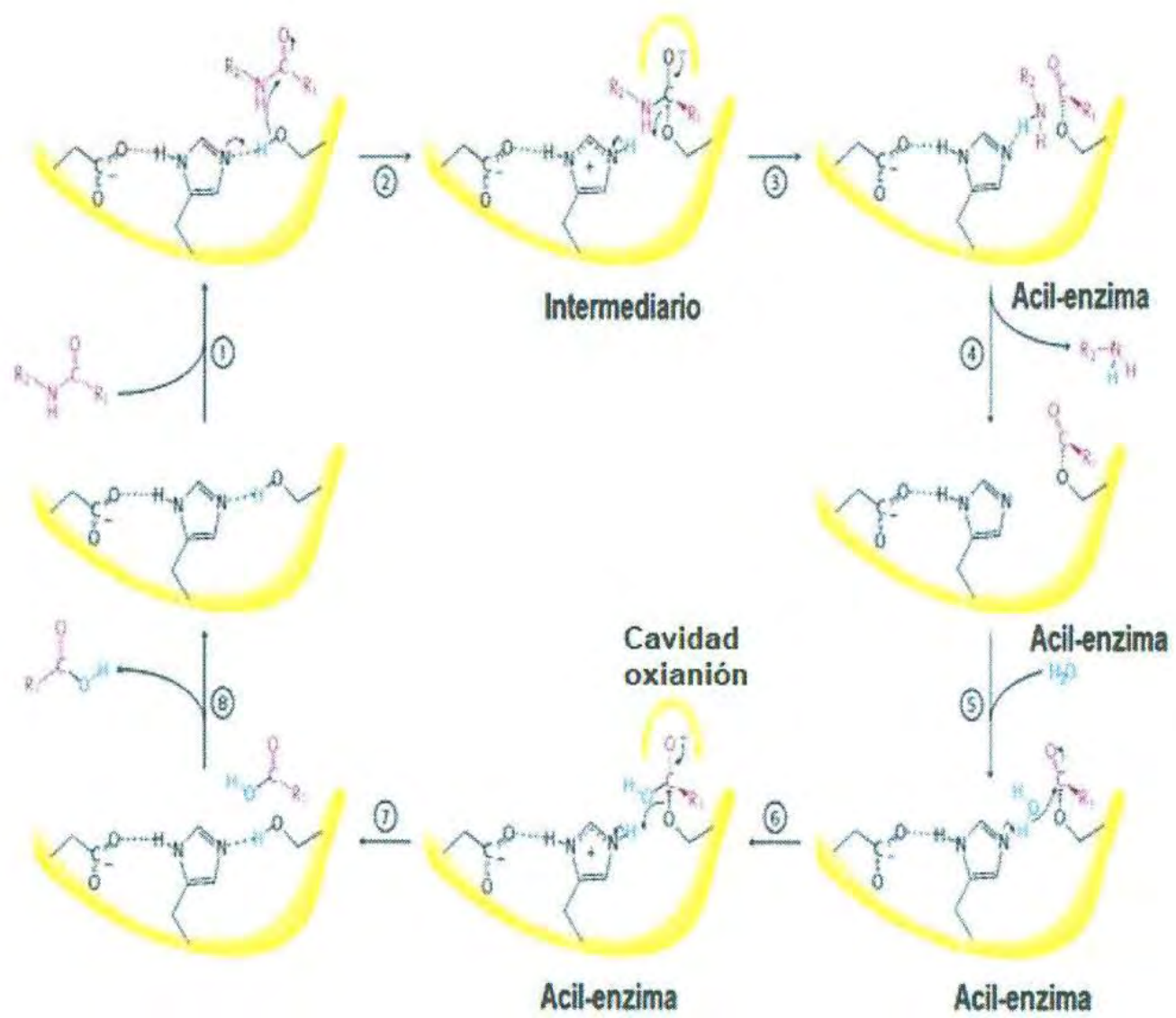


Figura 3. Mecanismo de catálisis de tripsina.

Fuente: Berg *et al.* (2002).

Isoenzimas de Tripsinas Marinas

Las tripsinas presentan diversas isoformas dentro de los organismos. Se ha sugerido que por lo menos dos genes del tripsinógeno se encuentran ubicados en sitios distantes dentro del genoma, lo cual ha dado lugar a diferentes formas de tripsina que llegaron a evolucionar por separado. En consecuencia, se han producido diferentes formas del tripsinógeno con baja identidad de secuencia dentro una misma especie (Roach *et al.*, 1997).

Originalmente, las tripsinas fueron clasificadas con base en la carga neta que presentarían, dividiéndose en tripsinas catiónicas y aniónicas. Actualmente, la clasificación más apropiada para agrupar a las tripsinas de peces es con base en su identidad de secuencia; esto, debido a que generalmente las tripsinas de peces se encuentran predominantemente en su forma aniónica. La clasificación se divide en los grupos I y II. El grupo I, se encuentra integrado principalmente por las formas aniónicas de las tripsinas, mientras que el grupo II lo conforman en su mayoría las formas catiónicas (Spilliaert y Gudmundsdóttir, 1999).

En *Gadus morhua* se reportó que una isoforma de su tripsina, tripsina Y, la cual mostraba características completamente diferentes a las tripsinas previamente reportadas en los grupos I y II, lo cual llevó a la adición del grupo III para agrupar estas secuencias restantes (Spilliaert y Gudmundsdóttir, 1999). Actualmente, se han identificado dentro del grupo III varias secuencias de ADN complementario que comparten hasta un 97 % de identidad de secuencia (Gudmundsdóttir y Pálsdóttir, 2005). Este grupo de tripsinas principalmente lo conforman especies de peces que pasan parte de su vida en ambientes fríos (Pálsdóttir y Gudmundsdóttir, 2007). Entre ellos se encuentran, *Pleuronectes platessa*, *Pleuronectes americanus* (Douglas y Gallant, 1998), *Dissostichus mawsoni* (L. Chen *et al.*, 1997), *Notothenia coriiceps* (J. Chen *et al.*, 2000), *Paralichthys olivaceus*, *Fugu rubripes* (Suzuki *et al.*, 2002), *S. sagax caerulea* (Castillo-Yáñez *et al.*, 2005).

Los estudios de caracterización y modelación revelan que las tripsinas del grupo III comparten la misma estructura terciaria que las tripsinas del grupo I, a pesar de la baja identidad de secuencia entre ellas. El grupo de tripsinas III (Figura 4) poseen una menor carga neta, modificaciones importantes en la superficie de los lazos, una menor cantidad de aminoácidos polares y mayor cantidad de aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos, así como bajo número de aminoácidos formadores de

puentes de hidrógenos y un elevado número de prolinas. La importancia de estas prolinas en regiones flexibles aún no es clara, pero se cree que podrían incrementar la rigidez de ciertas regiones de la estructura de la proteína, alterando la elevada eficiencia catalítica que distingue a las enzimas adaptadas al frío (Gudmundsdóttir y Pálsdóttir, 2005; Papaleo *et al.*, 2008; Spilliaert y Gudmundsdóttir, 1999). Estas comparaciones revelan que las tripsinas del grupo III muestran una tendencia opuesta a las tripsinas adaptadas al frío clasificadas como tripsinas del grupo I (Spilliaert y Gudmundsdóttir, 1999).

Se ha sugerido que las tripsinas del grupo III presentan mayor similitud evolutiva con las tripsinas de vertebrados que cualquier otra proteína. Dicha adaptación al frío podría deberse a que las tripsinas III evolucionaron a partir de estas tripsinas, por efecto de la presión originada por factores medioambientales (Gudmundsdóttir y Pálsdóttir, 2005; Pálsdóttir y Gudmundsdóttir, 2007).

Mecanismos de Adaptación de Tripsinas

Las enzimas adaptadas al frío utilizan ciertas estrategias para mantener una alta actividad en bajas temperaturas, dentro de las principales, se encuentra la producción de cambios conformacionales necesarios para reducir la barrera de energía durante la catálisis, así como la dependencia de la temperatura en la velocidad de la reacción. Se ha postulado que el incremento de esta flexibilidad puede ser logrado a través de un debilitamiento de las interacciones intramoleculares que estabilizan la estructura terciaria de la proteína, que resulta en una menor estabilidad de la proteína nativa (Collins *et al.*, 2002; Lonhienne *et al.*, 2000). Esta flexibilidad puede encontrarse localizada en regiones involucrados con la catálisis en combinación con la estabilidad molecular en un balance adecuado para que la proteína mantenga su función y evitar su desplegamiento (Hoyoux *et al.*, 2004).

```

S. sagax T3 AEGPGQLIKR YLMIFIYLVA FTLVGA AVAA PLDDKIVGGY ECAAHSQPWQ VSLNIGYHYC GGSLINDQWV TSAAHC-WMN
B. taurus ----- --MIGLALL MLLGAAA AVP REDGRIIGGQ DCEPRSRPFM ASLNYGYHFC GGSLVNDQWV VSAAHC-YK-
S. sagax T1 ----- --MNPFLILT FVAAALAAPF DDDDKIVGGY ECKAYSQWQ VSLNSGYHFC GGSLVNDQWV VSAAHC-YK-
G. morhua T3 ----- --MIGLALL MLLGAAA AVP REDGRIIGGQ DCEPRSRPFM ASLNYGYHFC GGSLVNDQWV VSAAHC-YK-
G. morhua T1 ----- --MNPFLILT FVAAALAAPF DDDDKIVGGY ECKAYSQWQ VSLNSGYHFC GGSLVNDQWV VSAAHC-YK-
H. sapiens ----- --MNPFLILT FVAAALAAPF DDDDKIVGGY ECKAYSQWQ VSLNSGYHFC GGSLVNDQWV VSAAHC-YK-
S. salar T1 ----- --MNPFLILT FVAAALAAPF DDDDKIVGGY ECKAYSQWQ VSLNSGYHFC GGSLVNDQWV VSAAHC-YK-
S. salar T3 ----- --MNPFLILT FVAAALAAPF DDDDKIVGGY ECKAYSQWQ VSLNSGYHFC GGSLVNDQWV VSAAHC-YK-

S. sagax T3 PFSQ-IAT-L GDHIIWEYEG TEQYMAVD AI YWQSYD-YQ TLDHDIIMLMK LAHPVTVNEF VKPISLPTAC AN-PGDMCVV
B. taurus --SG-IQVRL GEDNINVVEG NEQETISASKS IVHPSYNSNT -LNNDIIMLIK LKSAASINSR VASISLPTSC AS-AGTQCLI
S. sagax T1 --SR-VQVRM GEHDITYSEG SEQETISSRV IRHPNYSSYN -IDNDIIMLIK LSSPVTINQY VQFVALPTSC AP-AGTMCTV
G. morhua T3 --PYMQVML GEHDLRVFEG TEQYVKTINTI FWHEQYDYQT -LDYDMMIK LYHPVEVTS VAPISLPTG- PPDGGMCLSV
G. morhua T1 --SV-LRVRL GEHHIRVNEG TEQYISSSSV IRHPNYSSYN -INNDIIMLIK LTKPATINQY VHAVALPTEC AA-DATMCTV
H. sapiens --SR-IQVRL GEHNIKVTEG SEQETISSRV IRHPNYSSYN -IDNDIIMLIK LSKPATINTY VQFVALPTSC AP-AGTMCTV
S. salar T1 --SR-VEVRL GEHNIKVTEG SEQETISSRV IRHPNYSSYN -IDNDIIMLIK LSKPATINTY VQFVALPTSC AP-AGTMCTV
S. salar T3 --SR-IQVRL GEHNIKVTEG SEQETISSRV IRHPNYSSYN -IDNDIIMLIK LSKPATINTY VQFVALPTSC AP-AGTMCTV

S. sagax T3 SGWGNIIYT-- ---D-SVFNP FNLCQVEVPI LSHKDCDVS Y PGRITFMVC AG-YPEGGRD ACQGDGSGPL VONGELQGVV
B. taurus SGWGNTKSSG --TSYP--D- -VLRCLKAPI LSDSSCKSAY PGQITSNMFC AGYL-EGGKD SCQGDGSGPV VCSGKLOGIV
S. sagax T1 SGWGNMTSSV --S--G--D- -RLQCLQIPI LSDRD CNNSY PGMITDAMFC AGYL-EGGKD SCQGDGSGPV VONGELQGVV
G. morhua T3 SGWGN-MAMG EEVNLP---- TRLQCLDVPI VETVDCEAAY PGMISPRMVC AGYM-DGGRD ACNGDGS SPL VCEGVLTGLV
H. sapiens SGWGNMTSSV --AD-G--D- -KLQCLSLPI LSHADCAN Y PGMITQSMFC AGYL-EGGKD SCQGDGSGPV VONGVLOGVV
S. salar T1 SGWGN TASSG --ADYP--D- -ELQCLDAPV LSQAKCEASY PGKITSNMFC VGFL-EGGKD SCQGDGSGPV VONGQLOGVV
S. salar T1 SGWGN TMSST --AD-S--N- -KLQCLNIPI LSYSDCNNSY PGMITNAMFC AGYL-EGGKD SCQGDGSGPV VONGELQGVV
S. salar T3 SGWGNLSGSS --SNYP--D- -TLRCLDLPI LSSSSCN SAY PGQITSNMFC AGFM-EGGKD SCQGDGSGPV VONGQLOGVV

S. sagax T3 SWGYGYAQP- NYPGVYTRVC ALMPWINEIL SSYPWSSWRA ALTAFR
B. taurus SWGSGCAQK- NKPGVYTRVC NYVSWIKQTI ASN-----
S. sagax T1 SWGYGCA-ER DHPGVYARVC LFNDWLTQTM ASY-----
G. morhua T3 SWGQGCALP- NYPGVYTRVY EYLSWIQTTL DANP-----
G. morhua T1 SWGYGCA-ER DHPGVYARVC VLSGTVRDTM ANY-----
H. sapiens SWGDGCAQK- NKPGVYTRVY NYVSWIKNTI AANS-----
S. salar T1 SWGYG A-EP GNPGVYARVC IFNDWLTSTM ASY-----
S. salar T3 SWGYGCAQR- NKPGVYTRVC NYRSWISSTM SSN-----

```

Figura 4. Alineamiento de secuencias deducidas de aminoácidos de tripsinas del grupo I y grupo III.

Fuente: Di Tommaso *et al.* (2011).

Estudios comparativos de diferentes secuencias y estructuras de tripsinas adaptadas al frío han permitido identificar algunas modificaciones importantes con respecto a tripsinas homólogas de sangre caliente (mesófilas), que podrían estar implicadas en los mecanismos de adaptación de las tripsinas adaptadas al frío. Por ejemplo, el análisis estructural cristalográfico de la tripsina adaptada al frío del salmón mostró una menor cantidad de puentes de hidrógeno entre los dominios- β y la hélice- α del carboxilo terminal. A diferencia de las tripsinas mesófilas, estos puentes de hidrógenos no se forman en estas regiones catalíticas, puesto que las tripsinas adaptadas al frío poseen en sustitución aminoácidos no polares que evitan que se forme esta red de puentes de hidrógeno, que en consecuencia puede afectar significativamente la estabilidad general (Leiros *et al.*, 2000). Otras regiones que se han identificado con grandes diferencias entre tripsinas adaptadas al frío y de sangre caliente son los lazos, estructuras caracterizadas como altamente flexibles, que curiosamente se encuentran cercanas al sitio activo. Entre estas regiones se pueden distinguir algunos lazos que abarcan los residuos 90-99 y 173-179 y la ausencia de lisina ubicado en la posición 145 (sitio de corte) del lazo de autólisis, el cual no existe en ninguna tripsinas de peces (Sabine Genicot *et al.*, 1996; Papaleo *et al.*, 2008).

Los atributos anteriormente mencionados podrían permitir el aumento de la flexibilidad de la tripsinas, pero afectarían la estabilidad térmica, desplazándola a temperaturas menores en comparación con contrapartes de sangre caliente (Sabine Genicot *et al.*, 1996). Esto concuerda con las investigaciones reportadas para las tripsinas de peces de agua fría, donde las enzimas presentan menor estabilidad térmica en temperaturas por arriba de los 50 °C en especies como el pez carpa migratoria (*Cirrhinus mrigala*) (Khangembam y Chakrabarti, 2015), lubina japonesa (*Lateolabrax japonicus*) (Cai *et al.*, 2011), pez cabeza de víbora (*Channa argus*) (Zhou *et al.*, 2012) y pez ballesta gris (*Balistes capriscus*) (Jellouli *et al.*, 2009).

Generalidades de Sardina Monterey

Las sardinas son pequeños peces pelágicos miembros de la familia de arenques *Clupeidae* (Leet, 2001). El género *Sardinops* agrupa 18 especies distribuidas alrededor del mundo, principalmente en la zona este del océano Atlántico y Pacífico (Schweigert, 2002). La sardina Monterey (*Sardinops Caeruleus*) es una de las especies de pelágicos más importantes para el ecosistema y la pesca (García-Rodríguez *et al.*, 2011; Hannesson *et al.*, 2009).

La sardina Monterey también es comúnmente llamada sardina del Pacífico. Es un pez costero que forma grandes bancos de hasta 10 millones de individuos y se distribuye desde la costa sureste de Alaska a la costa noreste de México, incluyendo el golfo de California (Figura 5). La sardina habita en agua templadas con temperaturas alrededor de 7 a 28 °C y durante la etapa de reproducción de 13 a 22 °C (García-Rodríguez *et al.*, 2011; Martínez-Porchas *et al.*, 2009).

El cuerpo de sardina Monterey (Figura 6) es cilíndrico y alargado. Posee aletas especializadas y aleta caudal. Su color es azul-verdoso en el torso con flancos blancos, con 1 a 3 series de manchas a lo largo de la línea medio-lateral del cuerpo en el centro y unas estrías óseas radiantes en las agallas, distintivas (Baker, 1972; Jiménez Prado y Béarez, 2004; Whitehead *et al.*, 1988).

La sardina Monterey es el principal sustento de la pesquería en México, debido a que junto con la sardina cornuda aportan el 90 % de la captura a nivel nacional. Las sardinas son el producto pesquero comercial más importante, ya que aportan el 34 % de la producción total con 487,593.35 toneladas y un valor de producción de 416 millones de pesos, lo cual coloca a México como el décimo productor a nivel mundial. Entre las entidades más importantes en el país, Sonora figura como el principal productor, seguido por Baja California, Baja California Sur y Sinaloa (SAGARPA, 2017).

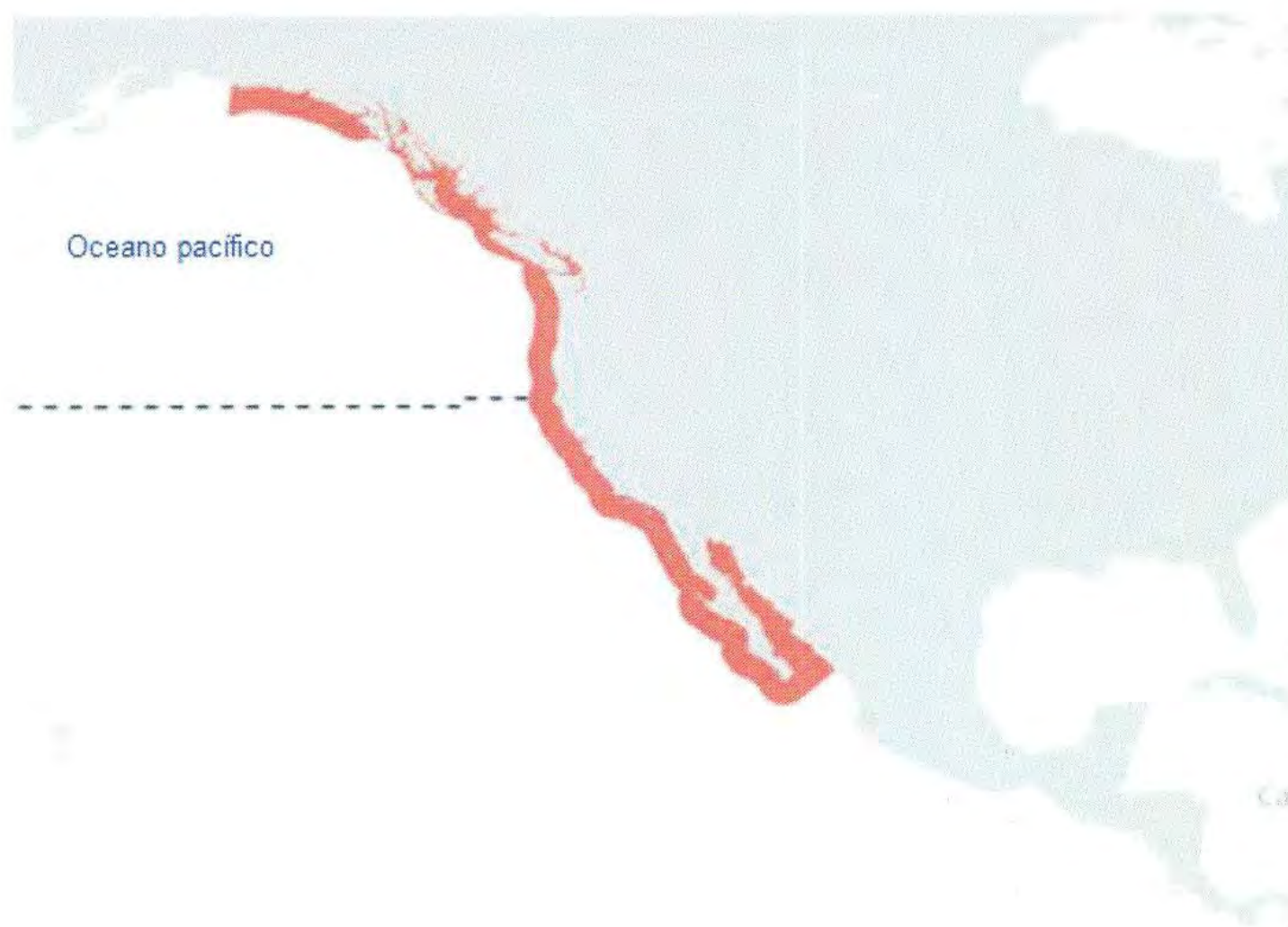


Figura 5. Distribución de sardina Monterey.

Fuente: FAO (1985).

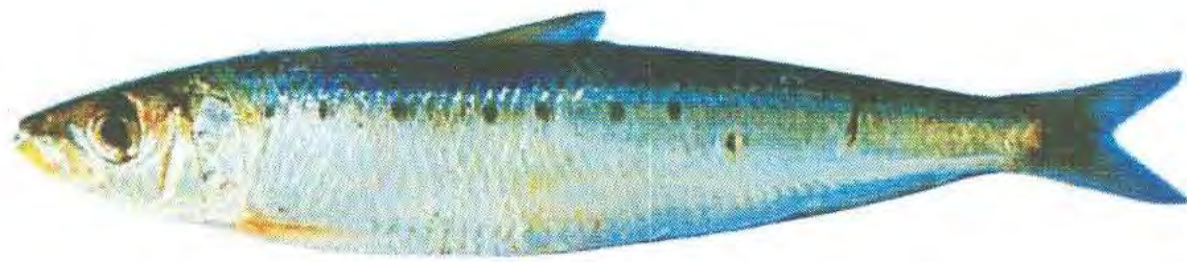


Figura 6. Sardina Monterey (*Sardinops Caeruleus*).

Fuente: New Zealand Seafood Industry Council (2000).

Sardina Monterey como Fuente de Proteasas

La sardina Monterey es susceptible a la rápida degradación autolítica de sus tejidos abdominales después de su captura. Este proceso es causado por la acción de enzimas digestivas, principalmente de serina proteasas secretadas principalmente por mucosa gástrica, páncreas, ciego pilórico e intestinos. Diversas investigación (Castillo-Yáñez *et al.*, 2005), (Castillo-Yáñez *et al.*, 2009), han demostrado que el pez es fuente importante de enzimas hidrolíticas con alta actividad catalítica a bajas temperaturas. Esto, en conjunto con sus características de adaptación , permite que el organismo pueda ser utilizado como modelo de estudio para la caracterización de sus proteasas adaptadas a ambientes fríos (Castro-Ceseña *et al.*, 2012; Gildberg *et al.*, 2000; Martínez y Gildberg, 1988).

Estado del Arte de Tripsina III de Sardina Monterey

La tripsina I y III fueron inicialmente identificadas a partir del ciego pilórico de sardina Monterey. Estos estudios permitieron la obtención del ADN complementario de los tripsinógenos y el análisis de las secuencias deducidas de aminoácidos, mismo que sugirió una posible adaptación de estas enzimas al frío (Anaya-Barragán, 2008; Félix-López, 2006).

La tripsina I se logró purificar por medio de una serie de cromatografías, a partir del ciego pilórico del pez sardina Monterey (*Sardinops sagax*). Este estudio mostró una tripsina de 25 kDa con temperatura óptima de 50 °C, estable a temperaturas por debajo de los 30 °C, temperaturas similares a las reportadas por peces de agua fría. Además, se estableció que poseía una eficiencia catalítica mucho mayor que la reportada en mamíferos, sugiriéndose una posible adaptación al frío (Castillo-Yáñez *et al.*, 2005). Posteriormente, se analizaron los parámetros cinéticos y termodinámicos de la tripsina I. Este análisis, mostró una eficiencia catalítica mayor a bajas temperaturas que las de tripsinas de sangre caliente, característica que distingue a las enzimas adaptadas al frío. Esto datos, en conjunto con la flexibilidad estructural reportada en el modelo *in silico*, demostraron que la tripsina I de sardina Monterey es una enzima adaptada al frío (Arvizu-Flores *et al.*, 2012).

En cuanto la tripsina III de sardina Monterey, se ha logrado clonar y sobreexpresar el constructo de tiorredoxina-His-tripsinógeno III, precursor de la tripsina, en la cepa *E. coli* Rosetta gami (DE3) a 25 °C, donde observó que la tripsina se obtiene de

forma activa, pero en bajos rendimientos (Lopez-Dick, 2010), posiblemente por la escasez en el ciego pilórico del organismo y la baja estabilidad que presentan estas tripsinas adaptadas al frío, dificultándose así su obtención (Stefansson *et al.*, 2010). Posteriormente se logró purificar la tripsina III de sardina Monterey en un alto grado de pureza (13.1 veces), por medio de una serie de tres pasos cromatográficos. La caracterización parcial mostró una tripsina de peso molecular de 24 kDa, con una temperatura óptima de 45 °C, similar a los valores reportados por otras tripsinas de peces. También permitió determinar sus respectivos valores cinéticos K_M y k_{cat} , de 0.40 mM y 0.022 s^{-1} , a partir del sustrato N α -Benzoil-L-arginina 4-nitroanilida (BAPNA).

Posteriormente, se utilizó mutagénesis dirigida para la obtención de la mutante sitio-dirigida A233N de tripsina III de sardina Monterey (mutación del aminoácido Ala por Asn en la posición 233) y se comparó sus parámetros cinéticos y termodinámicos con la tripsina III recombinante de sardina Monterey. Estos análisis mostraron que la tripsina A233N podría promover la formación de una red de puentes de hidrógenos entre los dos dominios, en una región cercana al sitio activo, otorgándole mayor estabilidad térmica y menor eficiencia catalítica en comparación con la tripsina III de sardina Monterey (Carretas-Valdez, 2018).

Con base a lo anterior, se ha logrado identificar y purificar la tripsina III de sardina Monterey en su forma recombinante. Esto ha permitido el análisis de los parámetros cinéticos y termodinámicos de activación, pero solo en relación al complejo enzima-sustrato. A pesar de que la eficiencia catalítica es un parámetro característico de enzimas adaptadas al frío, los parámetros en relación a su estabilidad estructural aún no se conocen para la tripsina III de sardina Monterey. La determinación de la estabilidad térmica y su comparación con su homóloga de sangre caliente puede permitir relacionar mejor la actividad catalítica y la estabilidad estructural con el fin de determinar su posible adaptación al frío, así como su posible mecanismo de adaptación. La adquisición de tales conocimientos resulta esencial para aplicaciones biotecnológicas e industriales. Tales como, los procesos de hidrólisis enzimática requerido a bajas temperaturas, así como la fácil inactivación de estas enzimas en temperaturas moderadamente altas, para evitar daños en el alimento.

HIPÓTESIS

La enzima tripsina III de sardina Monterey recombinante presenta menor estabilidad térmica en comparación con la tripsina bovina.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar la estabilidad térmica de tripsina III recombinante y compararla con la tripsina bovina.

Objetivos Particulares

1. Purificar la tripsina III recombinante de sardina Monterey (*Sardinops sagax caeruea*).
2. Determinar la estabilidad térmica de la tripsina III recombinante de sardina Monterey (*Sardinops sagax caeruea*).
3. Comparar con la estabilidad térmica de la tripsina III recombinante de sardina Monterey con la tripsina bovina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Purificación de Tripsina III

La materia prima empleada fue la tripsina III previamente obtenida en el grupo de trabajo por Carretas-Valdez (2018). La tripsina III de sardina Monterey primeramente fue purificada acorde a la metodología establecida por Carretas-Valdez (2018). Los pasos de purificación se describen a continuación.

El primer paso consistió en la sobreexpresión de tripsina III, unida a la proteína de fusión tioredoxina y una etiqueta de polihistidinas, dentro de la cepa bacteriana *E. coli* Rosetta gami BL21 (DE3) pLysS. Las bacterias fueron inoculadas en 1L de medio de cultivo Luria Bertani (LB) e incubadas a 25 °C a 250 x g en un agitador orbital refrigerado (Sorvall, Thermo Scientific), hasta alcanzar una absorbancia de 0.6 a 600 nm. El gen heterólogo fue inducido al añadirse al medio de cultivo el inductor isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) en una concentración de 40 mM y se dejó por 12 h.

En la siguiente etapa, la biomasa fue recuperada por centrifugación a 7,500 x g a 4 °C por 15 min. Al pellet bacteriano resultante se le adicionó buffer de lisis (Tris-HCl 25 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM), a una relación de 8 mL por g y se lisó con un sonicador de corneta a amplitud de 30 %, con cuatro ciclos de 20 s cada uno, en presencia de hielo. La proteína soluble fue recuperada por centrifugación a 7,500 x g por 20 min.

El tercer paso consistió en un fraccionamiento del extracto crudo de la tripsina III de sardina Monterey con sulfato de amonio en un rango de saturación del 30-70 %. El precipitado resultante fue resuspendido en buffer A (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 20 mM y sulfato de amonio al 25 %) y se colocó en una bolsa de diálisis de 6 - 8 kDa, donde se dejó agitando durante 4 h, con recambios de buffer A cada 2 h. Se tomaron 6 mL de la fracción de tripsina III dializada y se pasó a través de una columna de hidrofobicidad con una matriz de fenil-sefarosa Cl-4B, previamente equilibrada con buffer A. Las fracciones fueron eluidas con 24 mL de buffer B (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 20 mM y etilenglicol al 20 %) colectándose fracciones de 3 mL por medio del sistema ÄKTA prime plus (GE Healthcare). Las fracciones con mayor de pureza y actividad se colectaron en una sola fracción y se inyectaron en

una columna cromatográfica de exclusión molecular Sephacryl S-100 HR (16 cm x 60 cm) (Healthcare, 2014), previamente equilibrada. Las fracciones se eluyeron con buffer C (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 20 mM) y se colectaron volúmenes de 3 mL. Se seleccionaron aquellas fracciones con mayores porcentajes de pureza y actividad, para ser posteriormente dializadas en una membrana de diálisis de 6-8 kDa, con cuatro recambios de buffer diálisis (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5), con espacios de 3 h cada uno.

El último paso cromatográfico consistió en purificar por cromatografía de intercambio iónico, con una columna Q sefarosa (Healthcare, 2010) de 1 mL, donde se inyectaron 5 mL de la tripsina III a la columna previamente equilibrada con buffer de diálisis. La proteína fue recuperada por medio de un gradiente de concentración del buffer D (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, NaCl 0.4 M).

La actividad enzimática de las fracciones se estableció por medio de un ensayo cualitativo. En el ensayo se colocaron 50 µL de cada una de las fracciones de enzima y 200 µL de buffer de actividad (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 20 mM, CaCl₂ 5 mM) con sustrato BAPNA 1 mM.

Electroforesis SDS PAGE

El grado de pureza y la integridad de la tripsina III de sardina Monterey fue determinada por medio de geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y reductoras SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Las muestras se prepararon con buffer de carga (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 4 %, glicerol 20 %, 2-mercaptoenanol 20 %, azul de bromofenol 0.5 %) y se calentaron a 100 °C por 5 min para después ser inyectadas en los pozos de geles al 12 % de poliacrilamida. Las muestras de proteínas se corrieron con buffer de corrida (Tris-HCl 120 mM a pH 8.3, glicina 190 mM y SDS 1 %) en una cámara de electroforesis vertical Miniprotean II de BioRad, y se sometieron a una corriente de 15 mA por cada gel. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250.

Determinación de la Estabilidad Térmica

Ensayo de Estabilidad Térmica en Función del Tiempo

Existen diferentes métodos para determinar si la enzima presenta baja o elevada estabilidad térmica. Uno de los más utilizados es incubar la enzima durante un tiempo establecido, a diferentes temperatura y después determinar su actividad residual mediante un ensayo espectrofométrico (Saqib y Siddiqui, 2018).

$$\% \text{ Actividad residual} = \frac{\text{Actividad enzimática final}}{\text{Actividad enzimática inicial}} \times 100$$

Los ensayos de estabilidad de las tripsinas III de sardina Monterey y tripsina bovina fueron realizadas de acuerdo con Castillo-Yáñez *et al.* (2005). Para comparar la estabilidad térmica de la tripsina III de sardina Monterey y la tripsina bovina comercial, se incubaron las enzimas en un termobloque seco a temperaturas de 30, 50 y 60 °C por 60 min y la actividad residual se midió cada 20 min en un lector de microplaca a una longitud de onda de 410 nm. El sustrato utilizando fue BApNA a 1 mM en buffer de actividad (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 200 mM, CaCl₂ 5 mM). Para el control negativo, se añadieron los mismos componentes sin la enzima. Posteriormente, se midió actividad residual a las temperaturas de 30, 50 y 60 °C por 60 min. Para la tripsina bovina comercial se pesaron 5 mg y se diluyeron en 1 mL de buffer de actividad y el ensayo se realizó bajo las mismas condiciones utilizadas para la tripsina III de sardina Monterey.

Estabilidad Térmica por Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC)

La medición del desplegamiento térmico de la tripsina III de sardina Monterey requirió que la enzima tuviera un alto grado de pureza (> 90%). Por ello, la enzima fue purificada por un método alternativo, donde se utilizó la cromatografía de afinidad a benzamidina, la cual fue eluída con benzamidina 20 mM. El gel de electroforesis de la enzima pura se encuentra en el apartado de anexos (Anexo 1). Los experimentos de calorimetría diferencial de barrido fueron realizados en un nanocalorímetro nano-DSC (modelo CSC 6100), con el fin de determinar a partir de

las curvas de desplegamiento térmico los parámetros termodinámicos: temperatura media de fusión (T_m) y entalpía (ΔH) (CSC, 2005; Santos *et al.*, 2008).

El primer paso fue correr la línea base mediante el llenado de la celda de referencia y la celda de la muestra con el buffer de corrida (fosfato de potasio 20 mM, pH 7.5, NaCl 20 mM y benzamidina 1 mM). Esta línea base representó la señal introducida por la diferencia que existe entre los dos capilares, a fin de eliminar del termograma las contribuciones instrumentales. Una vez que se obtuvo la línea base, se llenó la celda de la muestra con la tripsina III de sardina Monterey, previamente dializada, desgasificada y diluida en el mismo buffer de corrida de la línea base, en un volumen de 0.5 mL y a una concentración de 0.5 mg/mL. Mientras que en la celda de referencia se llenó con 0.5 mL de buffer de corrida. Las dos celdas se calentaron a un intervalo de temperatura de 25 °C a 80 °C, con una velocidad de barrido de 1°C/min y una presión constante de 3 atm.

El instrumento mide continuamente el potencial eléctrico necesario para mantener las dos celdas a la misma temperatura a lo largo del barrido. La diferencia de energía entre las dos celdas es detectada por el equipo. De modo que cuando aparecieron diferencias en el proceso fisicoquímico (transición del estado nativo al estado desnaturalización de la tripsina III) dentro de las celdas, se observó una señal proporcional a los cambios dados por esta manifestación. El cambio de potencia eléctrica detectado ($\mu W = \mu cal s^{-1}$), fueron normalizados y transformados en función de la velocidad de barrido en diferencia de capacidad calorífica molar entre las dos celdas ($kcal K^{-1} mol^{-1}$). Finalmente, la línea base fue sustraída del termograma resultantes y mediante el software CpCalc se realizó un ajuste de la curva con el modelo lineal-polinomial para determinar los parámetros termodinámicos de la transición calorimétrica.

Para la muestra de tripsina bovina comercial se utilizaron las mismas condiciones experimentales de corrida, que las utilizados para la tripsina III de sardina Monterey, así como las herramientas utilizadas para determinar los parámetros termodinámicos resultantes.

Análisis Estructural por Dicroísmo Circular

El desplegamiento de la tripsina III recombinante inducido por efecto del tratamiento térmico fue determinado por las mediciones de dicroísmo circular fueron realizadas en un espectropolarímetro (Jasco J-810), siguiendo el cambio del valor de elipticidad molar a 222 nm con respecto a la temperatura. Para llevar a cabo el calentamiento entre 20 - 85 ° C, se utilizó un baño termostático, a una velocidad de calentamiento de 2 °C/min. La celda de paso óptico fue de 0.1 cm, en esta se añadió la tripsina III de sardina Monterey, diluida en buffer acetato de sodio, a una concentración final de 0.25 M, a un pH 4. Los datos crudos fueron convertidos en elipticidad molar a una longitud de 222 nm a partir de la siguiente ecuación:

$$[\theta]_{molar\lambda} = \theta_A \times MRW \times 10 \times d \times C$$

donde:

θ_A = elipticidad en degree a 222 nm

MRW = masa molecular media por residuo, donde M es la masa molecular y N es el número de aminoácidos de la proteína.

Los datos de temperatura y elipticidad molar fueron exportados y analizados en el programa Prism 5 (Erithacus Software) para el cálculo de la temperatura media de desnaturalización (T_m) por ajuste no lineal, utilizando la ecuación de Boltzmann:

$$y = \frac{Y_f - Y_u}{1 + e^{\frac{x - T_m}{dx}}} + Y_u$$

Donde, los valores Y_f y Y_u , se refieren a las intersecciones de las líneas base nativa y desnaturalizada, respectivamente; x es la temperatura en °C; T_m , es la temperatura de transición en el punto medio, y dx , es $\frac{1}{4}$ de la amplitud (intervalo de temperatura de transición, ΔT) (Lacerda *et al.*, 2014).

Para la muestra de tripsina bovina comercial se utilizaron las mismas condiciones experimentales de corrida que las utilizadas para la tripsina III de sardina Monterey, así como las herramientas utilizadas para analizar los espectros y determinar la T_m del desplegamiento térmico.

Análisis de Datos

Los parámetros resultantes fueron analizados mediante estadística descriptiva, tomando el promedio de dos determinaciones para las variables cuantitativas como media y desviación estándar. Tratando siempre de cuidar la aleatoriedad de las muestras.

En el caso de los perfiles de actividad contra temperatura los datos resultantes fueron analizados mediante la diferencia de medias de dos muestras independientes, por el estadístico t-student.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Purificación de la Tripsina III Recombinante de Sardina Monterey

Para separar la tripsina III de sardina Monterey, se realizaron varias etapas cromatográficas de forma consecutiva, las cuales se encuentran descritas en el apartado de metodología. En la figura 7 se aprecia el gel de electroforesis de SDS-PAGE, donde se muestra el resultado del primer paso cromatográfico (cromatografía de hidrofobicidad) y el último (cromatografía de intercambio iónico). Se corroboró que después de cada una de las etapas de purificación mostrasen actividad las muestras obtenidas. En las fracciones resultantes de la cromatografía de hidrofobicidad que mostraron actividad (Figura 7A y 7B), así como en las purificadas por intercambio iónico (Figura 7C y 7D), se identificó una banda de proteína de 22 kDa atribuida a la tripsina III de sardina Monterey (Carretas-Valdez, 2013). Este valor se encuentra del rango de masas moleculares establecidos para tripsina purificadas en diferentes peces (22-28 kDa) (El-Beltagy, 2005). El último paso cromatográfico permitió obtener a la tripsina III de sardina Monterey activa y con una elevada pureza.

A pesar de el grado de pureza obtenido fue suficiente para realizar algunas determinaciones del presente trabajo, no se logró obtener una tripsina completamente pura. Esto podría deberse a que la matriz de la columna se encontraba ligeramente compactada, lo cual afecta la resolución de los picos cromatográficos, que en consecuencia resulta en una baja purificación. Aunado a esto, la técnica cromatográfica utilizada como último paso cromatográfico, es un método de purificación intermedia, por lo que es preferible utilizar como último paso un método cromatográfico más específico, como la cromatografía de afinidad a benzamidina. Este es uno de los métodos más utilizados para la separación de tripsina con alto grado de pureza (Carretas-Valdez, 2013; Freitas-Júnior *et al.*, 2012; Jónsdóttir *et al.*, 2004; Khangembam y Chakrabarti, 2015).

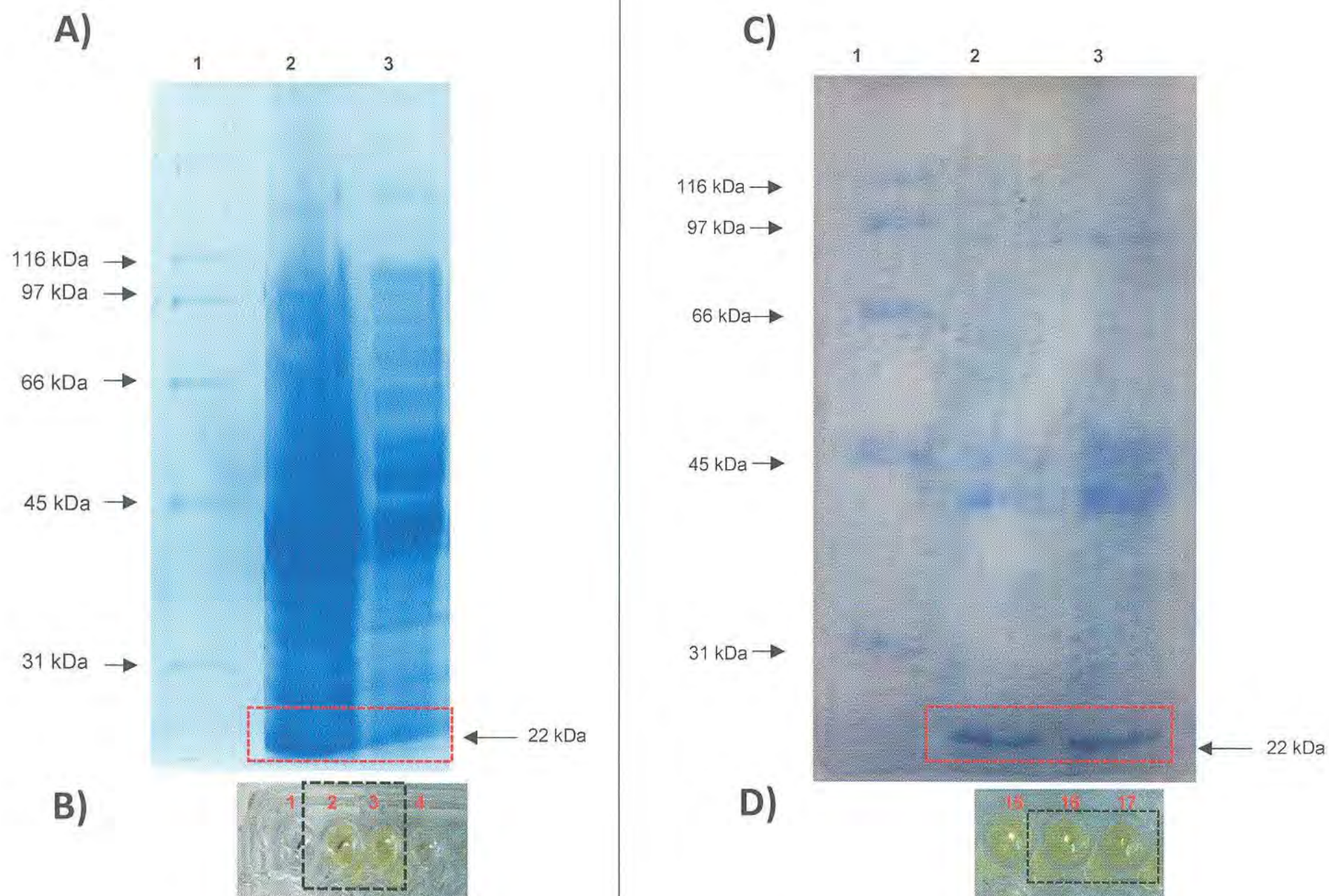


Figura 7. Purificación de tripsina III de sardina Monterey. Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12 %, teñido con azul de coomassie. A) Purificación por cromatografía de hidrofobicidad. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2 fracción 2; carril 3 fracción 3. B) Ensayo de actividad cualitativo con sustrato BAPNA 1 mM. Microplaca, pozo 2 carril 2, Pozo 3 carril 3. Purificación por cromatografía de intercambio iónico. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2 fracción 16 con tripsina III; carril 3 fracción 17 con tripsina III con 70 % de pureza. D) Ensayo de actividad cualitativo con sustrato BAPNA 1 mM. Microplaca, pozo 16 carril 2; pozo 3 carril 17.

Estabilidad Térmica en Función del Tiempo

La estabilidad térmica de una enzima está relacionada con la resistencia que posee para evitar la desnaturalización frente a agentes desestabilizantes, entre estos se puede mencionar a la temperatura. En la figura 8 se observa la actividad residual con respecto al tiempo de incubación. La actividad residual de la tripsina de sardina Monterey a la temperatura de 50 °C fue 59 %, después de 40 min de incubación y de 29 % después de 60 min. Mientras que, para la tripsina bovina, la actividad relativa fue de 51 % y 47 % a los 40 y 60 min, respectivamente. En el caso de la incubación a la temperatura de 60 °C, la actividad relativa de tripsina de sardina Monterey fue de 5 % y 0 %, después de 40 y 60 min respectivamente; mientras que, para la tripsina bovina fue de 6 % a los 40 min y de 2 % a los 60 min. En el caso del tiempo de vida media en 50 °C, la tripsina III de sardina Monterey exhibió un valor de 42 min y la tripsina bovina de 57 min.

Al analizar las actividades residuales de la tripsina de sardina Monterey y bovina, se observa que el comportamiento de las curvas de actividad residual y sus tiempos de vida media fueron muy parecidas. Esto sugiere que la estabilidad térmica de la tripsina III de sardina Monterey y tripsina bovina es similar. Sin embargo, estos resultados difieren de los reportados para peces que habitan en ambientes más fríos como el arenque y la trucha del Atlántico (S Genicot *et al.*, 1988; Simpson y Haard, 1984), ya que en las enzimas presentes en estos organismos se detectó una menor estabilidad térmica en altas temperaturas en comparación con sus contrapartes homóloga de sangre caliente. Una característica particular de las tripsinas es que presentan sitios de autólisis, debido a que utilizan la autólisis como mecanismo regulador de la actividad de serina proteasa. Sin embargo, es un factor que influye en la estabilidad térmica de las enzimas (Abraham y Breuil, 1995; Gudmundsdóttir y Pálsdóttir, 2005). Por esta razón, se analizó la secuencia de aminoácidos de la tripsina III de sardina Monterey y de la tripsina bovina.

En la Figura 9 se muestran la secuencia de tripsina bovina y la tripsina III de sardina Monterey. La secuencia de la tripsina bovina presenta 16 sitios de corte de aminoácidos Lys y Arg, los cuales se encuentran en su mayoría altamente expuestos, de acuerdo con (Vestling *et al.*, 1990). Mientras que la tripsina de sardina Monterey, muestra siete posibles sitios de corte, encontrándose muy poco

expuesto. En la figura 9, también se puede distinguir la secuencia 144-154, conocida como lazo de autólisis, por ser una estructura muy flexible e inestable con un sitio de corte en el aminoácido Lys 145 (Gudmundsdóttir y Pálsdóttir, 2005). Esta región es considerada el principal blanco de autólisis de la tripsina bovina. En la tripsina III de sardina Monterey no observó ningún aminoácido de Lys o Arg (posible sitio de corte) en esta región, que funcione como sitio de corte. De esta manera, no se tiene la certeza de que la actividad residual de la tripsina bovina medida en la temperatura de 50 y 60 °C, reflejó desnaturalización o autólisis; esto, debido al elevado grado de autólisis que presenta en altas temperaturas de incubación, que llevan a una rápida pérdida de la actividad (Stefansson *et al.*, 2010; Villalonga *et al.*, 2006). Por ello, no es posible comparar la actividad residual de la tripsina bovina con la tripsina III de sardina Monterey, considerándose un método poco adecuado para la determinación de la estabilidad térmica.

A pesar de ello, se comparó el tiempo de vida media de la tripsina III de sardina Monterey con la tripsina I, puesto que es una enzima que no presenta características de adaptación al frío (Castillo-Yáñez *et al.*, 2005). Se encontró que la tripsina I exhibió un tiempo de vida media de 10 min a 50 °C (posible autólisis), mientras que la tripsina III obtenida en este estudio fue de 47 min. Además, se observó que la actividad residual de la tripsina III decrece paulatinamente y en la tripsina I, su actividad cae bruscamente. En el caso de la vida media reportada para otras especies, como la serina peptidasa alcalina del microorganismo psicrófilo subártico pA-43, este valor fue de 42 min a 55 °C y para la tripsina porcina, enzima mucho más estable a la autólisis, fue de 155 min (Guo *et al.*, 2016; Irwin *et al.*, 2000). La diferencia en el tiempo de vida media entre la tripsina III con la tripsina I y su similitud con la serina peptidasa, indican que es estable en temperaturas menores a 50 °C. Sin embargo, su estabilidad es menor que sus contrapartes de sangre caliente.

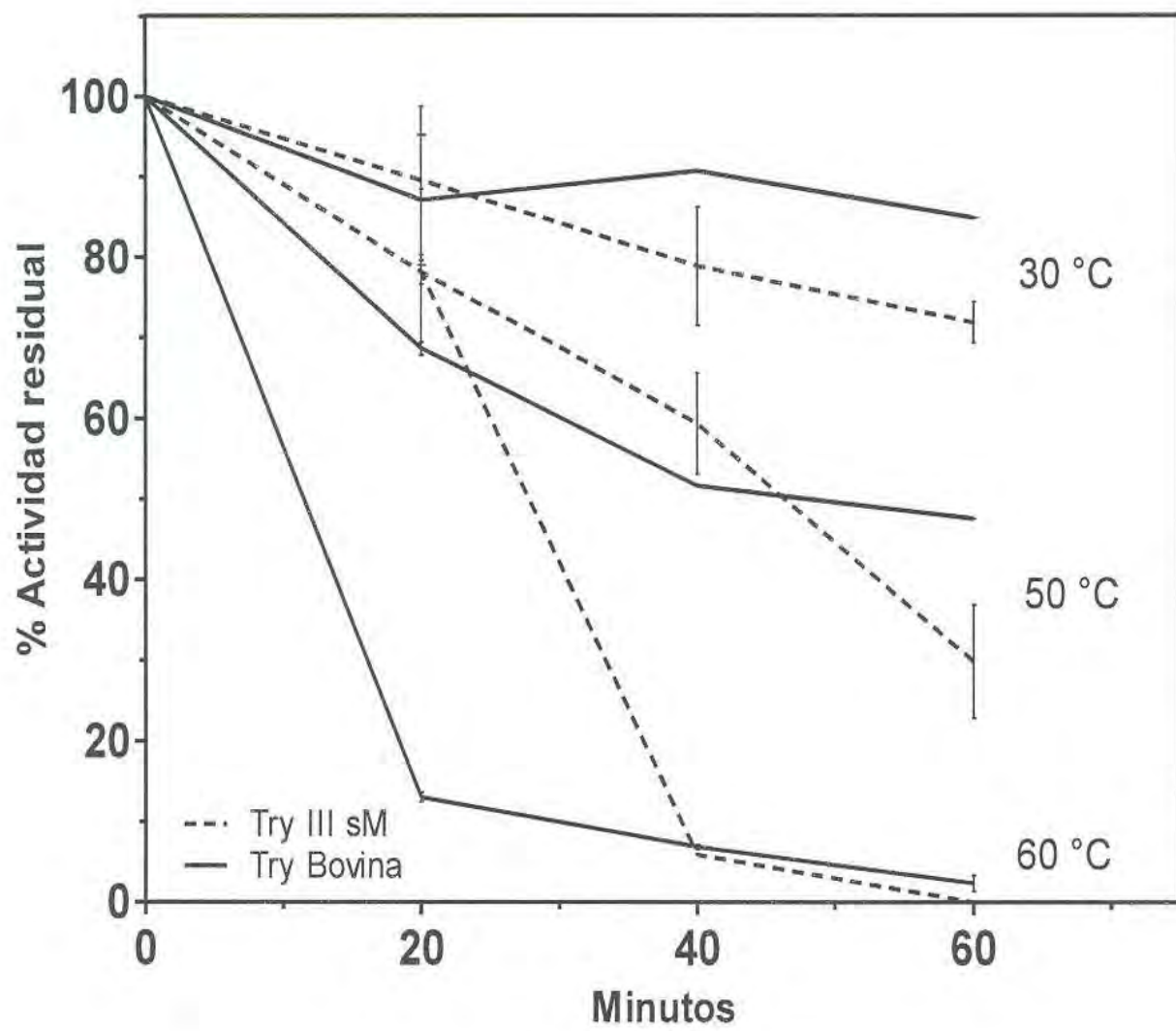


Figura 8. Estabilidad térmica por efecto de la temperatura de tripsina III de sardina Monterey y tripsina bovina. Actividad residual a pH de 7.5 después de la incubación con 1mM de BAPNA por 60 min en temperaturas de 30, 50 y 60 °C.



Figura 9. Determinación de los sitios de corte Identificación de los sitios de corte dentro de la secuencia de aminoácidos que son susceptibles a la autólisis de la tripsina III de sardina Monterey y la tripsina bovina.

Dicroísmo Circular

El desplegamiento térmico de la tripsina III de sardina Monterey y la tripsina bovina fue seguido por dicroísmo circular (CD). Los espectros reportados se midieron a una longitud de onda de 222, para determinar posibles modificaciones de la estructura secundaria por efecto de la temperatura.

El ajuste de la curva permitió obtener los valores de T_m para cada una de las curvas de tripsina, pero no fue posible determinar los parámetros termodinámicos debido a que las formas de la curva revelan posibles estados de transición adicionales al mecanismo nativo-desplegado. En la Figura 11 se muestra el mecanismo de desplegamiento de la tripsina III de sardina Monterey. El espectro presentó una curva en un rango de temperatura de 37 °C a 69 °C con comportamiento sigmoideo, típico de monómeros (Maroufi *et al.*, 2008), con gran amplitud, reflejo de un desplegamiento poco cooperativo.

En la Figura 12 se observó que la tripsina bovina no presentó una curva con comportamiento sigmoideo y su amplitud fue mayor que la tripsina III de sardina Monterey. Además, el desplegamiento ocurrió en temperaturas mayores, en el rango de 55 - 85 °C. El ajuste de las curvas de las enzimas mostró una T_m de 60.3 ± 0.2640 °C para la tripsina III de sardina Monterey y de 69.7 ± 0.48 °C para la tripsina bovina. Dado que la T_m , corresponde al punto medio entre los dos estados de transición en las curvas de dicroísmo circular (Poklar y Vesnaver, 2000), la tripsina bovina mostró mayor estabilidad térmica que la tripsina III de sardina Monterey. Sin embargo, al comparar la tripsina bovina del presente trabajo con la reportada por Brumano *et al.* (2000), se encontraron algunas diferencias, tales como mayor rango de temperatura donde ocurre el desplegamiento y la forma de la curva. Además, el valor de la T_m fue mayor que el valor reportado por la literatura ($T_m = 54.4$ °C). Estas divergencias podrían deberse a las fluctuaciones al inicio de la curva, las cuales posiblemente representen modificaciones importantes incluso antes de que ocurra el desplegamiento. Al detectar que el rango de temperaturas donde ocurrió la transición de la tripsina bovina fue mayor que la reportada por la literatura (Brumano *et al.*, 2000), se sugirió que la proteína no estaba completamente en su forma nativa, debido a que se ha reportado que el pH es un factor desestabilizante en las tripsinas (Bulaj y Otlewski, 1995; Martins y col.,

2003), lo cual pudo haber ocasionado lecturas erróneas por parte del equipo. De tal manera que se optó por comparar a la tripsina III de sardina Monterey con los estudios reportados en la literatura.

De acuerdo a esto, la tripsina III se comparó con el espectro de la tripsina bovina, reportado por Brumano *et al.* (2000) donde se observó un mecanismo de transición muy diferente por parte de la tripsina III de sardina Monterey. El desplegamiento de la tripsina III abarcó una mayor amplitud de la curva en un mayor rango de temperatura, el cual indicó que este proceso fue gradual.

En consecuencia, se obtuvo un valor de T_m más alto. La baja cooperatividad de su estructura secundaria, poco usual en enzimas adaptadas al frío (Feller y Gerday, 2003) y el elevado valor de T_m , indicó que la tripsina III de sardina Monterey presenta una estructura secundaria con mayor estabilidad térmica. Esta estabilidad superior a su contraparte de sangre caliente concuerda con muy pocos estudios de enzimas adaptadas al frío, tales como (Fedøy *et al.*, 2007; Kazuoka *et al.*, 2003; Svingor *et al.*, 2001; Yamanaka *et al.*, 2002). Lo antes mencionado hace sugerir que la tripsina III presenta una alta estabilidad global en comparación de su contraparte tripsina bovina.

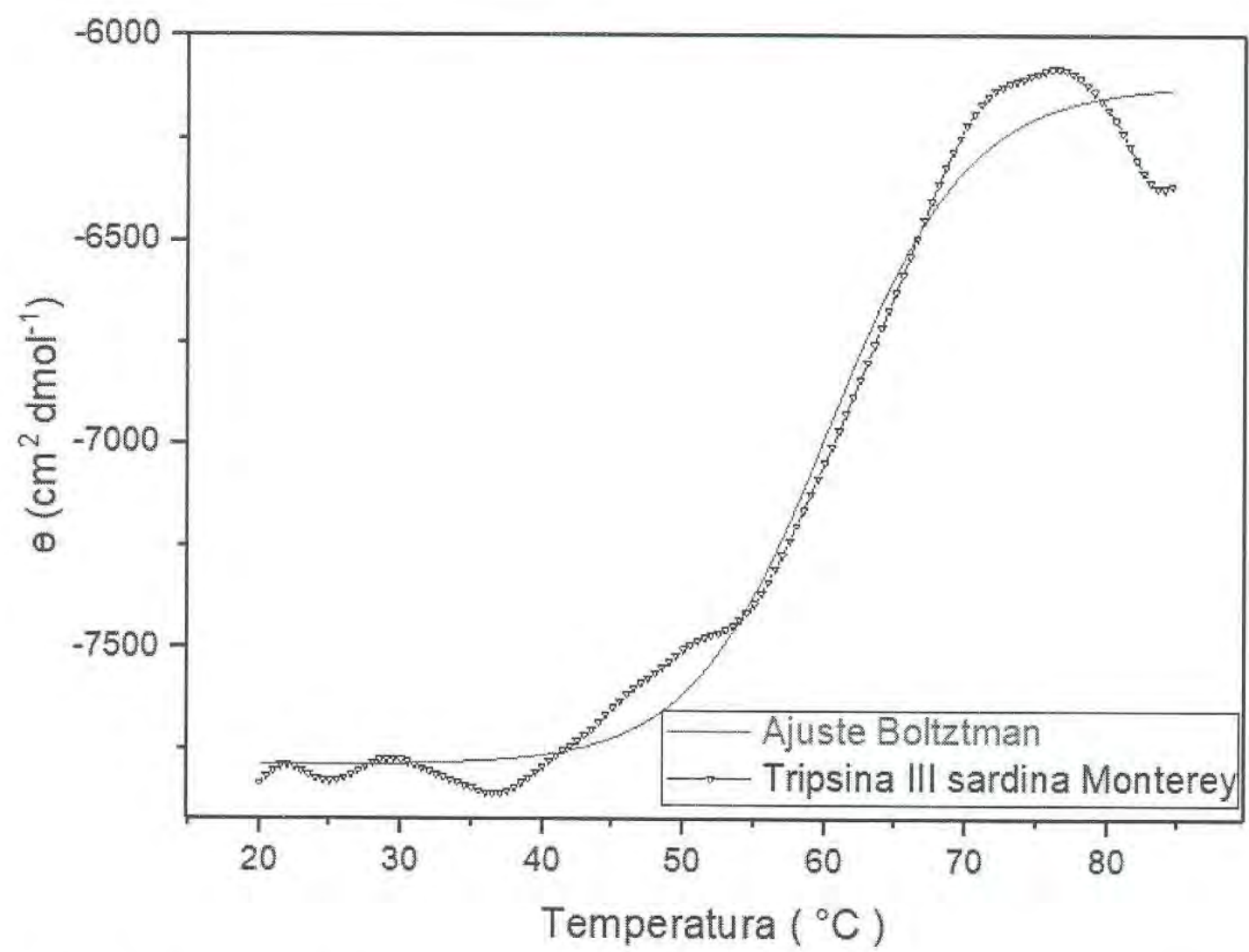


Figura 10. Curva de desplegamiento térmico ajustada de la tripsina III de sardina Monterey obtenida por dicroísmo circular (CD).

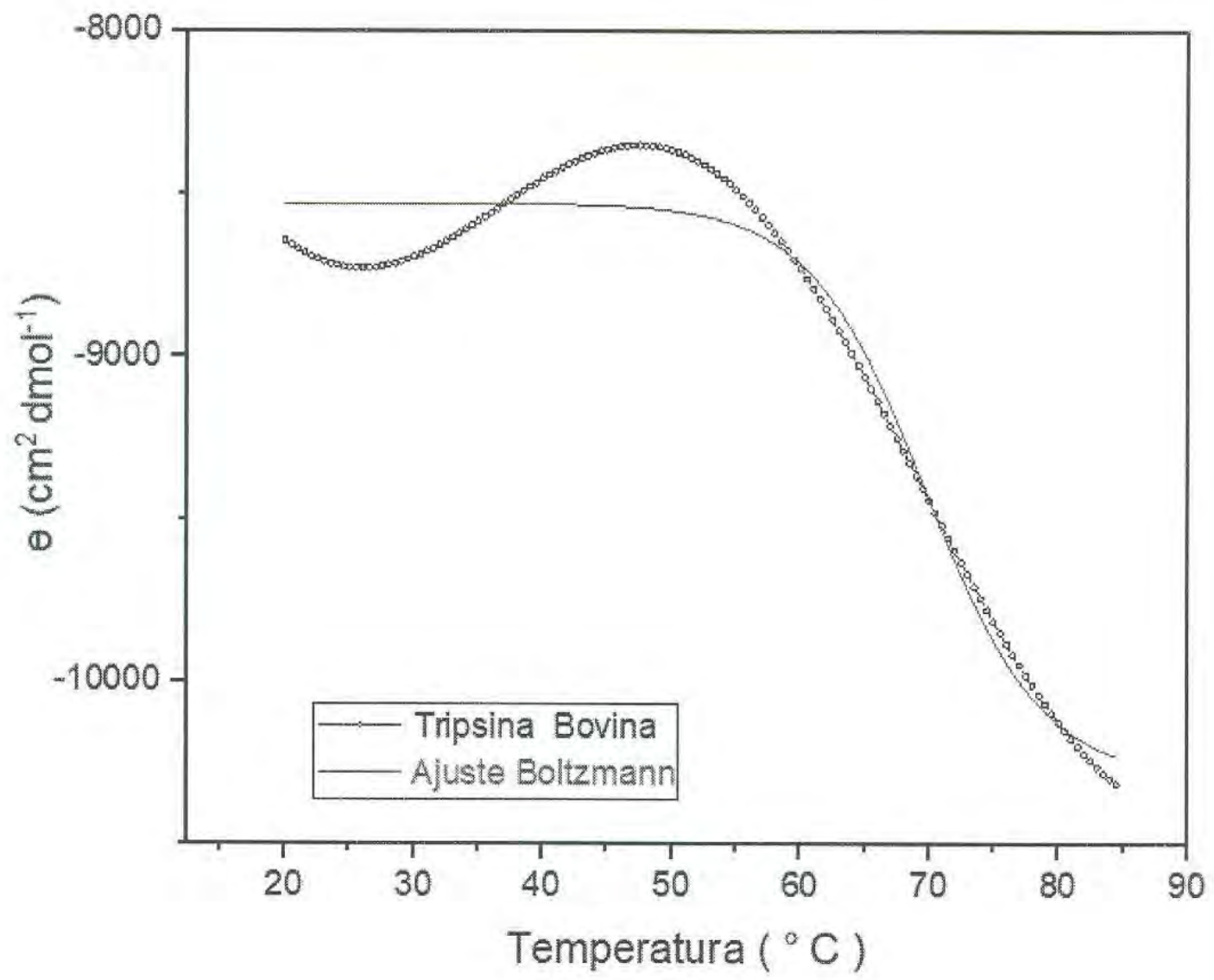


Figura 11. Curva de desplegamiento térmico ajustada de la tripsina III de la tripsina bovina obtenida por dicroísmo circular (CD).

Calorimetría de Barrido Diferencial

Cabe resaltar que los termogramas de las dos tripsinas exhibieron curvas con más de una transición después de someterse a una deconvulsión por medio del software Cpcal®. Dado que estas transiciones pueden llegar a modificar las curvas calorimétricas de donde se extraen la información para calcular los parámetros termodinámicos, se optó por tomar estos datos como valores aparentes (D'Amico *et al.*, 2003; Fedøy *et al.*, 2007; Privalov y Potekhin, 1986).

En la figura 10, se presentan los perfiles de calorimetría de barrido diferencial de la tripsina III de sardina Monterey (línea punteada) y tripsina bovina (línea continua). La tripsina III de sardina Monterey presentó dos picos bien definidos en altas temperaturas. Mientras que la tripsina bovina solo mostró un pico amplio a temperaturas más bajas. Se observó que la T_m de la tripsina III de sardina Monterey fue más alta que la tripsina bovina (Tabla 1). Sin embargo, la entalpía calorimétrica fue mayor en la tripsina bovina. Si se consideran los dos picos a altas temperaturas en la tripsina III de sardina Monterey se sugeriría una alta cooperatividad, el cual involucra un proceso de todo o nada, que indica una estabilidad uniformemente baja de la molécula, lo cual es común en enzimas adaptadas al frío (Feller y Gerday, 2003).

El primer pico se podría atribuir al desplegamiento de la enzima. En cuanto al segundo, al encontrarse muy distante del primero, se descarta la transición de algún dominio de la proteína, por lo que se podría atribuir más a una posible agregación de la molécula. Este fenómeno de agregación ha sido ya detectado previamente en la tripsina III (Carretas-Valdez, 2013), así como en otras tripsinas adaptadas al frío (Ágeirsson *et al.*, 1989; Stefansson *et al.*, 2010). Por ello, al analizar solamente el primer pico, se muestra que la curva de desplegamiento está acorde con la baja entalpía calorimétrica detectada. En conjunto, esto refleja una estructura con interacciones poco estabilizantes. Sin embargo, esto no concordó con su valor de T_m , que indicó una elevada estabilidad global en altas temperaturas.

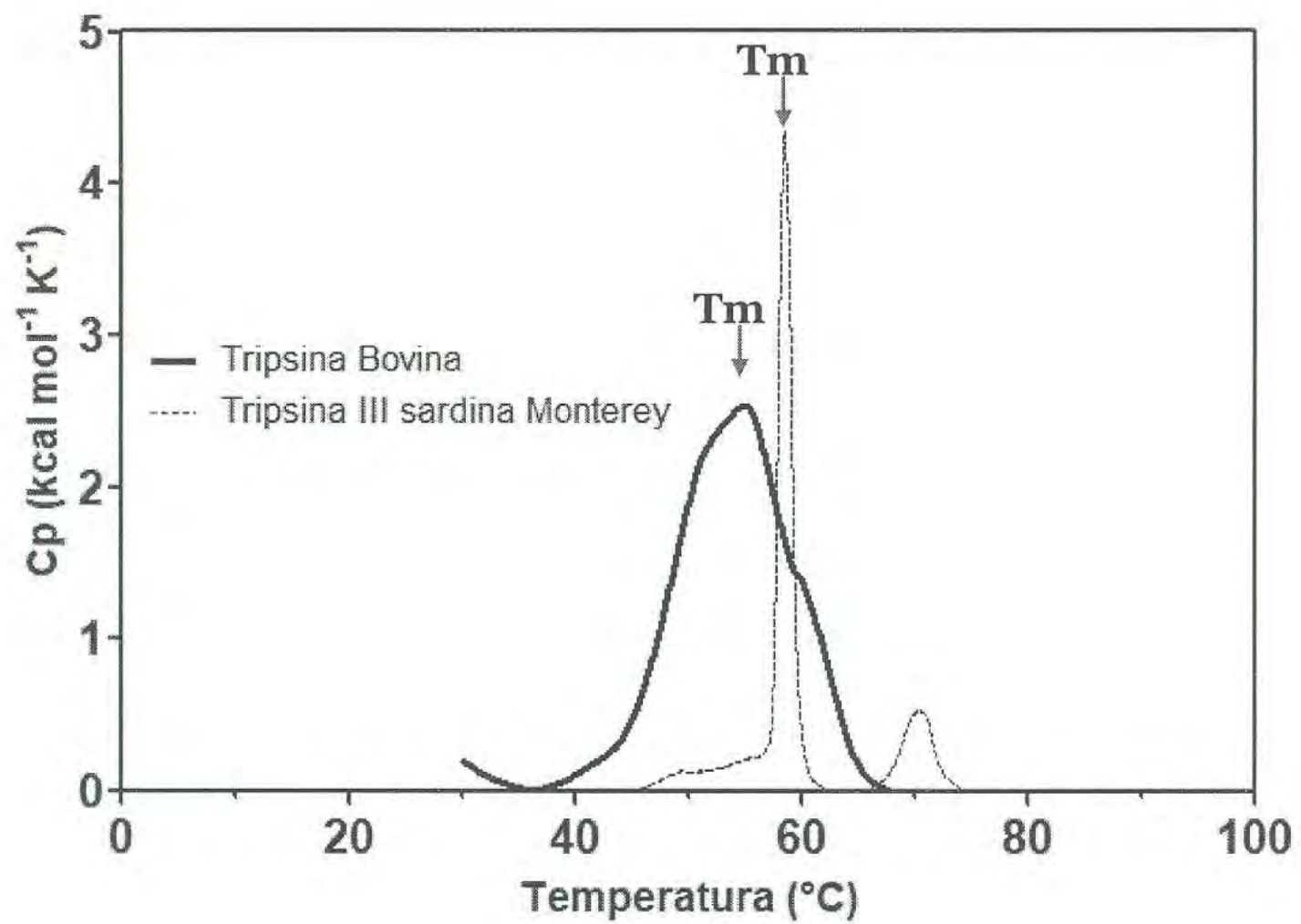


Figura 12. Termograma de tripsina III de sardina Monterey y tripsina bovina.

Tabla 1. Parámetros termodinámicos de la tripsina III de sardina Monterey y tripsina bovina

Tripsina	T_m (°C)	ΔH (kcal/mol)
TIII sardina Monterey	58.40 ± 0.02	41.65 ± 1.62
Tripsina Bovina	54.95 ± 0.63	137.20 ± 0.70

Valor promedio de dos repeticiones y desviación estándar

En cuanto al pico de la tripsina bovina se detectó un solo pico de gran amplitud, el cual mostró una baja cooperatividad al ser comparado con la tripsina reportada por la tripsina bovina comercial a pH de 2.8 (Brumano *et al.*, 2000). El despliegamiento de la curva de la tripsina bovina y sus altos valores de ΔH indica que posee fuerzas altamente estabilizantes. Sin embargo, la T_m de la tripsina III de sardina Monterey indica una mayor estabilidad térmica.

Se ha sugerido que la tripsina III de sardina Monterey (Carretas-Valdez, 2018), posee un sitio activo estabilizado en su mayoría por interacciones débiles que dan lugar a una flexibilidad mayor que su homóloga bovina, posiblemente en regiones cercanas al sitio activo, la cual permite disminuir la barrera de energía para aumentar la catálisis en bajas temperaturas (dos Santos *et al.*, 2016).

El comportamiento térmico detectado en la tripsina III podría relacionarse con su composición de aminoácidos. Se ha establecido que los aminoácidos que distinguen a las tripsinas III en comparación con sus homólogos de sangre caliente, son el bajo número de aminoácidos formadores de puentes de hidrógeno, el alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos y un alto contenido de prolinas, tal como se detectó en este trabajo, las cuales podrían aumentar la rigidez de regiones importantes de la estructura de la proteína para dar lugar a una mayor estabilización global pero con una reducida eficiencia catalítica (Leiros *et al.*, 2000; Roach, 2002; Spilliaert y Gudmundsdóttir, 1999).

Las enzimas del grupo III tripsinas de peces son las que presentan mayor similitud en cuanto su secuencia de aminoácidos y estructura terciaria con respecto a las tripsinas de organismos de sangre caliente; sin embargo, se ha demostrado que poseen una mayor tasa de evolutiva (Roach, 2002), la cual podría estar correlacionada con una nueva forma de adaptación dirigida hacia alta estabilidad térmica acompañada de una reduciendo la eficiencia catalítica, modificando así sus parámetros termodinámicos.

CONCLUSIÓN

Con base a los resultados, se logró purificar la tripsina III recombinante de sardina Monterey de 22 kDa con características de tripsina.

Los parámetros termodinámicos determinado indican que la tripsina III de sardina Monterey posee características de adaptación al frío y presenta una estabilidad térmica alta en su estructura global y sugiere una menor estabilidad en regiones que involucran su sitio activo.

El estudio comparativo de la tripsina III de sardina y la tripsina bovina mostró que la tripsina III presenta mayor estabilidad térmica que su contraparte bovina.

RECOMENDACIONES

Purificar la tripsina III de sardina Monterey en su forma nativa para evaluar el efecto de producirse de manera recombinante.

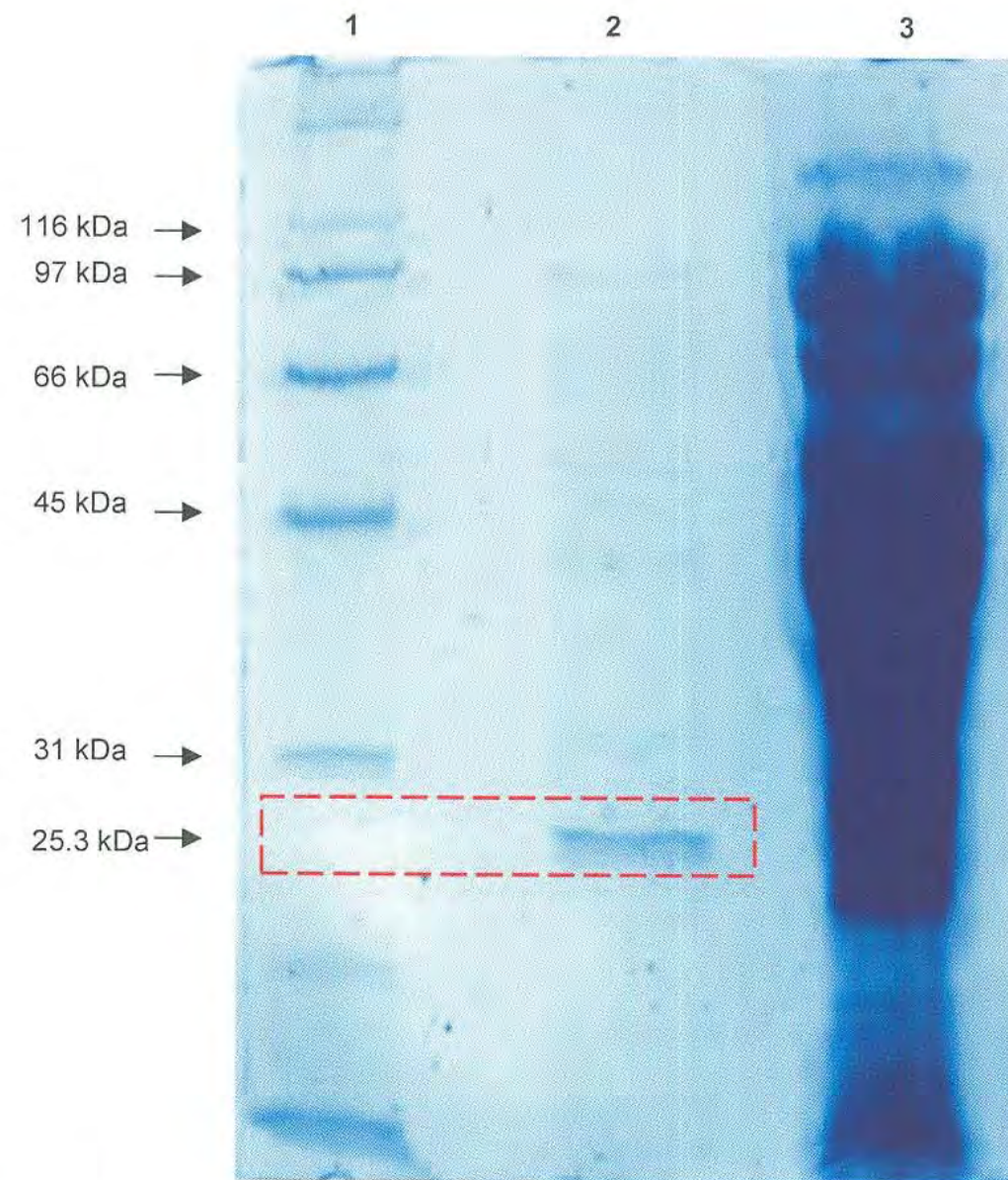
Evaluar el grado de autólisis de la tripsina III sardina Monterey para conocer si el efecto de la alta temperatura ocasiona autólisis o desnaturalización.

Comparar la estabilidad térmica de tripsina III de sardina Monterey con una mutante tripsina III A233N de sardina Monterey con características de su contraparte bovina.

Determinar por espectroscopía de dicroísmo circular el porcentaje de hojas- β y hélices- α de tripsina III de sardina Monterey a diferentes temperaturas para conocer que regiones específicas de la proteína son las más inestables térmicamente.

Evaluar la tripsina III de sardina Monterey en pH de 2.3 debido a la gran influencia del pH en la estabilidad estructural.

ANEXOS



Anexo 1. Purificación de tripsina III de sardina Monterey por cromatografía de afinidad a benzamidina. Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12 %, teñido con azul de coomassie. Carril 1, marcador de peso molecular de amplio rango; carril 2, fracción de tripsina III obtenida por cromatografía de afinidad a benzamidina; carril 4, proteína no unida a la columna.

REFERENCIAS

- Abraham, L. D., & Breuil, C. (1995). Factors affecting autolysis of a subtilisin-like serine proteinase secreted by *Ophiostoma piceae* and identification of the cleavage site. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1245(1), 76-84.
- Ágeirsson, B., Fox, J. W., & Bjarnason, J. B. (1989). Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. *The FEBS Journal*, 180(1), 85-94.
- Anaya-Barragán, C. (2008). Obtención de ADNc del tripsinógeno tipo III de vísceras de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*). (Tesis Profesional de Químico-Biólogo), Universidad de Sonora, Hermosillo, México.
- Arvizu-Flores, A. A., Quintero-Reyes, I. E., Felix-Lopez, M., Islas-Osuna, M. A., Yepiz-Plascencia, G., Pacheco-Aguilar, R. Sotelo-Mundo, R. R. (2012). Thermodynamic activation and structural analysis of trypsin I from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). *Food chemistry*, 133(3), 898-904.
- Baker, A. N. (1972). Reproductioil, Early Life History, and Age-growth Relationships of the New Zealand Pilchard.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., Berg, J., Tymoczko, J., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry: International version (hardcover)*: WH Freeman.
- Bischof, J. C., & He, X. (2006). Thermal stability of proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1066(1), 12-33.
- Bode, W., Fehlhhammer, H., & Huber, R. (1976). Crystal structure of bovine trypsinogen at 1.8 Å resolution. I. Data collection, application of Patterson search techniques and preliminary structural interpretation. *Journal of molecular biology*, 106(2), 325-335.
- Bougatef, A. (2013). Trypsins from fish processing waste: characteristics and biotechnological applications—comprehensive review. *Journal of cleaner production*, 57, 257-265.
- Branden, C. I. (1999). *Introduction to protein structure*: Garland Science.
- Brissos, V., Gonçalves, N., Melo, E. P., & Martins, L. O. (2014). Improving kinetic or thermodynamic stability of an azoreductase by directed evolution. *PloS one*, 9(1), e87209.
- Brumano, M. H. N., Rogana, E., & Swaisgood, H. E. (2000). Thermodynamics of Unfolding of β -Trypsin at pH 2.8. *Archives of biochemistry and biophysics*, 382(1), 57-62.
- Cai, Q.-F., Jiang, Y.-K., Zhou, L.-G., Sun, L.-C., Liu, G.-M., Osatomi, K., & Cao, M.-J. (2011). Biochemical characterization of trypsins from the hepatopancreas of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 159(3), 183-189.
- Carretas-Valdez, M. I. (2013). Caracterización bioquímica de la tripsina III recombinante de sardina Monterey (*sardinops sagax caerulea*). Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora
- Carretas-Valdez, M. I. (2018). Purificación y caracterización de tripsina III silvestre y mutante A233N de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) y su impacto en los parámetros bioquímicos y termodinámicos. (Doctor en ciencias Práctica), Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora.

- Castillo-Yáñez, F. J., Pacheco-Aguilar, R., García-Carreño, F. L., & de los Ángeles Navarrete-Del, M. (2005). Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 140(1), 91-98.
- Castillo-Yáñez, F. J., Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sanchez, M. E., Garcia-Sanchez, G., & Quintero-Reyes, I. E. (2009). Biochemical characterization of an isoform of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*), and comparison with bovine chymotrypsin. *Food chemistry*, 112(3), 634-639.
- Castro-Ceseña, A. B., del Pilar Sánchez-Saavedra, M., & Márquez-Rocha, F. J. (2012). Characterisation and partial purification of proteolytic enzymes from sardine by-products to obtain concentrated hydrolysates. *Food chemistry*, 135(2), 583-589.
- Collins, T., Claverie, P., D'Amico, S., Georlette, D., Gratia, E., Hoyoux, A., Gerday, C. (2002). *Life in the cold: Psychrophilic enzymes* (Vol. 1).
- CSC, C. S. C. (2005). Nano-Differential Scanning Calorimeter III. Manual de usuario. User's Manual, Model CSC 6300, (12405). EUA.
- Chen, J., Maniwa, S., & Ochi, M. (2000). Influence of trypsin on the biological bonding of cartilaginous surface to bone in rabbits. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 120(10), 587-591.
- Chen, L., DeVries, A. L., & Cheng, C.-H. C. (1997). Evolution of antifreeze glycoprotein gene from a trypsinogen gene in Antarctic notothenioid fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(8), 3811-3816.
- D'Amico, S., Marx, J.-C., Gerday, C., & Feller, G. (2003). Activity-stability relationships in extremophilic enzymes. *Journal of biological Chemistry*, 278(10), 7891-7896.
- Daniel, R. M. (1996). The upper limits of enzyme thermal stability. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(1), 74-79.
- Di Tommaso, P., Moretti, S., Xenarios, I., Orobittg, M., Montanyola, A., Chang, J.-M., Notredame, C. (2011). T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic acids research*, 39(suppl_2), W13-W17.
- Dill, K. A., & MacCallum, J. L. (2012). The protein-folding problem, 50 years on. *Science*, 338(6110), 1042-1046.
- dos Santos, C. W. V., da Costa Marques, M. E., de Araújo Tenório, H., de Miranda, E. C., & Pereira, H. J. V. (2016). Purification and characterization of trypsin from *Luphiosilurus alexandri* pyloric cecum. *Biochemistry and biophysics reports*, 8, 29-33.
- Douglas, S. E., & Gallant, J. W. (1998). Isolation of cDNAs for trypsinogen from the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Journal of marine biotechnology*, 6, 214-219.
- El-Beltagy, E. A., Rahma, El-Bedawey. (2005). Purification and characterization of an alkaline protease from the viscera of boliti fish (*Tilapia nilotica*). *Journal of Food Biochemistry*, 29(5), 445-458.
- FAO, T. F. a. A. O. (1985). FAO Species catalogue Vol. 7. Clupeoid fishes of the world. (Suborder *Clupeoidei*) An annotated and illustrated catalogue of the

- herrings, sardines, pilchards, sprats, anchovies and wolf-herrings. *FAO Fish. Synop.*, (125)Vol.7 1:303 p.
- Fastrez, J., & Fersht, A. R. (1973). Demonstration of the acyl-enzyme mechanism for the hydrolysis of peptides and anilides by chymotrypsin. *Biochemistry*, 12(11), 2025-2034.
- Fedøy, A.-E., Yang, N., Martinez, A., Leiros, H.-K. S., & Steen, I. H. (2007). Structural and functional properties of isocitrate dehydrogenase from the psychrophilic bacterium *Desulfotalea psychrophila* reveal a cold-active enzyme with an unusual high thermal stability. *Journal of molecular biology*, 372(1), 130-149.
- Félix-López, M. (2006). Caracterización biofísica y molecular de tripsina de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*). (Tesis de maestría en ciencias), Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, Hermosillo, México.
- Feller, G. (2013). Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology. *Scientifica*, 2013.
- Feller, G., & Gerday, C. (2003). Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nature reviews microbiology*, 1(3), 200.
- Fennema, O. R. (1992). *Química de los alimentos*: Zaragoza, ES: Acribia.
- Fields, P. A., & Somero, G. N. (1998). Hot spots in cold adaptation: localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A4 orthologs of Antarctic notothenioid fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(19), 11476-11481.
- Freitas-Júnior, A. C., Costa, H. M., Icimoto, M. Y., Hirata, I. Y., Marcondes, M., Carvalho Jr, L. B., . . . Bezerra, R. S. (2012). Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera as a source of thermostable trypsin. *Food chemistry*, 133(4), 1596-1602.
- García-Rodríguez, F. J., García-Gasca, S. A., De La Cruz-Agüero, J., & Cota-Gómez, V. M. (2011). A study of the population structure of the Pacific sardine *Sardinops sagax* (Jenyns, 1842) in Mexico based on morphometric and genetic analyses. *Fisheries Research*, 107(1-3), 169-176.
- Genicot, S., Feller, G., & Gerday, C. (1988). Trypsin from antarctic fish (*Paranotothenia magellanica* Forster) as compared with trout (*Salmo gairdneri*) trypsin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 90(3), 601-609.
- Genicot, S., Rentier-Delrue, F., Edwards, D., VanBeeumen, J., & Gerday, C. (1996). Trypsin and trypsinogen from an Antarctic fish: molecular basis of cold adaptation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1298(1), 45-57.
- Georlette, D., Blaise, V., Collins, T., D'Amico, S., Gratia, E., Hoyoux, A., . . . Gerday, C. (2004). Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *FEMS microbiology Reviews*, 28(1), 25-42.
- Gerday, C., Aittaleb, M., Arpigny, J. L., Baise, E., Chessa, J.-P., Garsoux, G., Feller, G. (1997). Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1342(2), 119-131.
- Gildberg, A., Simpson, B. K., & Haard, N. F. (2000). Uses of enzymes from marine organisms. *Food science and thecnology*. New York-Marcel Dekker-, 619-640.

- Gudmundsdóttir, Á., & Pálsdóttir, H. M. (2005). Atlantic cod trypsins: from basic research to practical applications. *Marine biotechnology*, 7(2), 77-88.
- Guo, C., Liu, Y., Yu, H., Du, K., Gan, Y., & Huang, H. (2016). A novel strategy for thermostability improvement of trypsin based on N-glycosylation within the-loop region. *J. Microbiol. Biotechnol*, 26(7), 1163-1172.
- Haard, N. F. (1992). A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 1(1), 17-35.
- Haard, N. F., & Simpson, B. K. (2000). *Seafood enzymes: utilization and influence on postharvest seafood quality*: CRC Press.
- Hannesson, R., Herrick, S., & Field, J. (2009). Ecological and economic considerations in the conservation and management of the Pacific sardine (*Sardinops sagax*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 66(5), 859-868.
- Healthcare, G. (2010). *Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: Principles and Methods*. Edition AA, Amersham Biosciences, 7.
- Healthcare, G. (2014). *Size exclusion chromatography-principles and methods*. Disponible en: <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciencesno/service-and-support/handbooks>.
- Helland, R., Leiros, I., Berglund, G. I., Willassen, N. P., & Smalås, A. O. (1998). The crystal structure of anionic salmon trypsin in complex with bovine pancreatic trypsin inhibitor. *The FEBS Journal*, 256(2), 317-324.
- Hoyoux, A., Blaise, V., Collins, T., D'Amico, S., Gratia, E., Huston, A. L., . . . Feller, G. (2004). Extreme catalysts from low-temperature environments. *Journal of bioscience and bioengineering*, 98(5), 317-330.
- Huber, R., & Bode, W. (1978). Structural basis of the activation and action of trypsin. *Accounts of Chemical Research*, 11(3), 114-122.
- Irwin, J. A., Gudmundsson, H. M., Alfredsson, G. A., & Engel, P. C. (2000). A novel serine proteinase from the psychrophile *Vibrio* PA-43. *Biochemical Society Transactions*, 28(5), A312-A312.
- Jellouli, K., Bougatef, A., Daassi, D., Balti, R., Barkia, A., & Nasri, M. (2009). New alkaline trypsin from the intestine of grey triggerfish (*Balistes caprisucus*) with high activity at low temperature: purification and characterisation. *Food chemistry*, 116(3), 644-650.
- Jiménez Prado, P., & Béarez, P. (2004). *Peces Marinos del Ecuador Continental I: Quito/SIMBIOE/2004*.
- Jónsdóttir, G., Bjarnason, J. B., & Gudmundsdóttir, Á. (2004). Recombinant cold-adapted trypsin I from Atlantic cod—expression, purification, and identification. *Protein expression and purification*, 33(1), 110-122.
- Kazuoka, T., Masuda, Y., Oikawa, T., & Soda, K. (2003). Thermostable aspartase from a marine psychrophile, *Cytophaga* sp. KUC-1: molecular characterization and primary structure. *Journal of biochemistry*, 133(1), 51-58.
- Khangembam, B. K., & Chakrabarti, R. (2015). Trypsin from the digestive system of carp *Cirrhinus mrigala*: Purification, characterization and its potential application. *Food chemistry*, 175, 386-394.
- Kim, H., Meyers, S. P., & Godber, J. S. (1992). Purification and characterization of anionic trypsins from the hepatopancreas of crayfish, *Procambarus clarkii*.

- Comparative Biochemistry and Physiology Part B: *Comparative Biochemistry*, 103(2), 391-398.
- Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., & Simpson, B. K. (2006). Purification and characterization of trypsin from the spleen of tongol tuna (*Thunnus tonggol*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(15), 5617-5622.
- Lacerda, C. D., Teixeira, A. E., de Oliveira, J. S., Silva, S. F., Vasconcelos, A. V. B., Gouveia, D. G., . . . Santos, A. M. C. (2014). Gamma trypsin: Purification and physicochemical characterization of a novel bovine trypsin isoform. *International journal of biological macromolecules*, 70, 179-186.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Leet, W. S. (2001). *California's living marine resources: a status report*: University Of California, Division of Agriculture and Natural Resources; California Sea Grant.
- Leiros, H.-K. S., Os, V., & Willassen, N. P. (2000). Cold adapted enzymes.
- Lonhienne, T., Gerday, C., & Feller, G. (2000). Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(1), 1-10.
- Lopez-Dick, L. D. (2010). Tripsina III de sardina Monterrey (*sardinops sagax caerulea*) - sobreexpresión en *Escherichia coli*. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora. Disponible en: <http://www.bidi.uson.mx/TesisIndice.aspx?tesis=21149>
- Male, R., Lorens, J. B., Smalås, A. O., & Torrissen, K. R. (1995). Molecular cloning and characterization of anionic and cationic variants of trypsin from Atlantic salmon. *The FEBS Journal*, 232(2), 677-685.
- Maroufi, B., Ranjbar, B., Khajeh, K., Naderi-Manesh, H., & Yaghoubi, H. (2008). Structural studies of hen egg-white lysozyme dimer: Comparison with monomer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1784(7-8), 1043-1049.
- Martínez-Porchas, M., Hernández-Rodríguez, M., & Bückle-Ramírez, L. F. (2009). Thermal behavior of the Pacific sardine (*Sardinops sagax*) acclimated to different thermal cycles. *Journal of Thermal Biology*, 34(7), 372-376.
- Martínez, A., & Gildberg, A. (1988). Autolytic degradation of belly tissue in anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *International Journal of Food Science & Technology*, 23(2), 185-194.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*: Macmillan.
- New Zealand Seafood Industry Council, I. C. (2000). *Sardinops sagax* (Jenyns, 1842)
- South American pilchard. Fishbase.
- Pálsdóttir, H. M., & Gudmundsdóttir, Á. (2007). Expression and purification of a cold-adapted group III trypsin in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, 51(2), 243-252.
- Papaleo, E., Pasi, M., Riccardi, L., Sambì, I., Fantucci, P., & Gioia, L. D. (2008). Protein flexibility in psychrophilic and mesophilic trypsins. Evidence of

- evolutionary conservation of protein dynamics in trypsin-like serine-proteases. *FEBS letters*, 582(6), 1008-1018.
- Poklar, N., & Vesnaver, G. (2000). Thermal denaturation of proteins studied by UV spectroscopy. *Journal of Chemical Education*, 77(3), 380.
- Polgár, L. (2005). The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62(19-20), 2161-2172.
- Privalov, P. L., & Potekhin, S. A. (1986). [2] Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. *Methods in enzymology* (Vol. 131, pp. 4-51): Academic Press.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 597-635.
- Roach, J. C. (2002). A clade of trypsins found in cold-adapted fish. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 47(1), 31-44.
- Roach, J. C., Wang, K., Gan, L., & Hood, L. (1997). The molecular evolution of the vertebrate trypsinogens. *Journal of molecular evolution*, 45(6), 640-652.
- SAGARPA, S. (2017). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
- Santos, A., Santana, M., Gomide, F., Miranda, A., Oliveira, J., Boas, F. V., . . . Santoro, M. (2008). Physical-chemical characterization and stability study of α -trypsin at pH 3.0 by differential scanning calorimetry. *International journal of biological macromolecules*, 42(3), 278-284.
- Saqib, A. A., & Siddiqui, K. S. (2018). How to calculate thermostability of enzymes using a simple approach. *Biochemistry and Molecular Biology Education*.
- Schweigert, J. (2002). Update COSEWIC status report on the Pacific sardine *Sardinops sagax* in Canada. COSEWIC assessment and update status report on the Pacific sardine *Sardinops sagax* in Canada. *Committee on the status of endangered wildlife in Canada, Ottawa*, 1-19.
- Simpson, B., & Haard, N. (1984). Trypsin from Greenland cod, *Gadus ogac*. Isolation and comparative properties. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, 79(4), 613-622.
- Spilliaert, R., & Gudmundsdóttir, Á. (1999). Atlantic cod trypsin Y—member of a novel trypsin group. *Marine biotechnology*, 1(6), 598-607.
- Stefansson, B., Helgadóttir, L., Olafsdóttir, S., Gudmundsdóttir, Á., & Bjarnason, J. B. (2010). Characterization of cold-adapted Atlantic cod (*Gadus morhua*) trypsin I—Kinetic parameters, autolysis and thermal stability. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 155(2), 186-194.
- Suzuki, T., Srivastava, A. S., & Kurokawa, T. (2002). cDNA cloning and phylogenetic analysis of pancreatic serine proteases from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 131(1), 63-70.
- Svingor, Á., Kardos, J., Hajdú, I., Németh, A., & Závodszky, P. (2001). A better enzyme to cope with cold comparative flexibility studies on psychrotrophic, mesophilic, and thermophilic ipmdhs. *Journal of biological Chemistry*, 276(30), 28121-28125.
- Vandermarliere, E., Mueller, M., & Martens, L. (2013). Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics. *Mass spectrometry reviews*, 32(6), 453-465.

- Vestling, M. M., Murphy, C. M., & Fenselau, C. (1990). Recognition of trypsin autolysis products by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 62(21), 2391-2394.
- Villalonga, M. L., Villalonga, R., Mariniello, L., Gómez, L., Di Pierro, P., & Porta, R. (2006). Transglutaminase-catalysed glycosidation of trypsin with aminated polysaccharides. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(6), 595-602.
- Volz, J., Osta, M. A., Kafatos, F. C., & Müller, H.-M. (2005). The roles of two clip domain serine proteases in innate immune responses of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Journal of biological Chemistry*, 280(48), 40161-40168.
- Whitehead, P. J. P., Nelson, G. J., & Wongratana, T. (1988). Clupeoid fishes of the world (suborder Clupeoidei): An Annotated and Illustrated Catalogue of the Herrings, Sardines, Pilchards, Shads, Anchovies and Wolf-herrings: Food & Agriculture Org.
- Wintrode, P. L., & Arnold, F. H. (2001). Temperature adaptation of enzymes: lessons from laboratory evolution. *Advances in protein chemistry*, 55, 161-225.
- Yamanaka, Y., Kazuoka, T., Yoshida, M., Yamanaka, K., Oikawa, T., & Soda, K. (2002). Thermostable aldehyde dehydrogenase from psychrophile, *Cytophaga* sp. KUC-1: enzymological characteristics and functional properties. *Biochemical and biophysical research communications*, 298(5), 632-637.
- Zhou, L.-Z., Ruan, M.-M., Cai, Q.-F., Liu, G.-M., Sun, L.-C., Su, W.-J., & Cao, M.-J. (2012). Purification, characterization and cDNA cloning of a trypsin from the hepatopancreas of snakehead (*Channa argus*). *Comparative biochemistry and physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 161(3), 247-254.