



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos
Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Especialidad en Conservación y Procesamiento de Productos Marinos

Aislamiento y Caracterización Parcial de Proteasa(s) Aspártica(s) del Hepatopáncreas de Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*)

TESIS

Que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Francisco Javier Valdez Ibarra

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

CONTENIDO

| | Pág. |
|---|------|
| CARTA DE APROBACIÓN..... | ii |
| DEDICATORIA..... | iii |
| AGRADECIMIENTOS..... | iv |
| CONTENIDO..... | v |
| LISTA DE TABLAS..... | ix |
| LISTA DE FIGURAS..... | x |
| RESUMEN..... | xiii |
| OBJETIVOS..... | xv |
| HIPÓTESIS..... | xvi |
| INTRODUCCIÓN..... | I |
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 3 |
| Taxonomía del Calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)..... | 3 |
| Distribución del Calamar Gigante..... | 3 |
| Importancia del Calamar Gigante..... | 5 |
| Enzimas..... | 8 |
| Hidrolasas..... | 10 |
| Proteasas..... | 10 |
| Clasificación de las Proteasas..... | 12 |
| Exopeptidasas..... | 12 |

CONTENIDO (continuación)

| | |
|--|----|
| Endopeptidasas..... | 14 |
| Proteasas Digestivas de Organismos Marinos. | 14 |
| Serina Proteasas de Organismos Marinos..... | 16 |
| Cisteína Proteasas Marinas..... | 18 |
| Metaloproteasas Marinas..... | 20 |
| Proteasas Aspárticas de Organismos Marinos..... | 21 |
| Fuente de proteasas aspárticas. | 22 |
| Mecanismo catalítico de proteasas aspárticas..... | 24 |
| Estudios Enzimáticos en Calamar..... | 26 |
| Estudios en <i>Todarodes sagittatus e Illex illecebrosus</i> | 28 |
| Estudios en <i>Todarodes pacificus</i> | 28 |
| Estudios en <i>Todaropsis eblanae</i> | 29 |
| Estudios en <i>Dosidicus gigas</i> | 29 |
| Aplicación Tecnológica de Proteasas Marinas..... | 30 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 33 |
| Materia Prima..... | 33 |
| Preparación del Extracto Crudo..... | 33 |
| Aislamiento de la(s) Enzima(s) Aspárticas..... | 34 |
| Precipitación con Sulfato de Amonio..... | 34 |

CONTENIDO (continuación)

| | |
|--|----|
| Diálisis..... | 35 |
| Determinaciones Analíticas..... | 35 |
| Concentración de Proteína en Solución..... | 35 |
| Ensayo de Actividad Enzimática con Hemoglobina..... | 36 |
| Electroforesis en Gel de SDS-Poliacrilamida..... | 37 |
| Zimograma de las Fracciones con Inhibidores Específicos..... | 38 |
| Cromatografía de Filtración en Gel..... | 40 |
| Caracterización Parcial de Proteasas Aspárticas..... | 40 |
| Efecto de la Temperatura en la Actividad Proteolítica..... | 40 |
| Efecto del pH en la Actividad Proteolítica..... | 41 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 42 |
| Peso y Talla del Calamar y Hepatopáncreas..... | 42 |
| Determinación de Actividad en ECHC..... | 43 |
| Purificación de Proteasas Aspárticas Presentes en el ECHC..... | 44 |
| Precipitación Fraccionada con Sulfato de Amonio..... | 44 |
| Ensayo de Inhibición..... | 47 |
| Cromatografía de Filtración en Gel (Bio gel p-100 grueso)..... | 51 |
| Grado de Purificación..... | 61 |

CONTENIDO (continuación)

| | |
|---|----|
| Caracterización Parcial de las Proteasas Aspárticas Presentes en las | |
| Fracciones con Actividad..... | 63 |
| Actividad en Función de la Temperatura..... | 63 |
| Actividad en Función del pH..... | 63 |
| CONCLUSIONES..... | 68 |
| RECOMENDACIONES..... | 69 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 70 |
| ANEXOS | |
| I. Procedimiento Para Realizar una Electroforesis en Condiciones Ácidas. Descrito por Díaz-López <i>et al.</i> , 1998. | |
| II. Tinción de Plata Utilizada Para Teñir los Geles Electroforéticos. Descrito por Blum, <i>et al.</i> , 1987. | |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | | Pág. |
|--------------|--|-------------|
| 1.- | Clasificación enzimática según la Comisión de Enzimas..... | 9 |
| 2.- | Comparación de la actividad proteolítica de diferentes especies de calamar/sepia..... | 27 |
| 3.- | Condiciones necesarias para realizar una electroforesis ácida..... | 39 |
| 4.- | Inhibidores específicos para serina proteasas, cisteína proteasas, metaloproteasas y proteasas aspárticas..... | 48 |
| 5.- | Tabla de purificación del extracto crudo del hepatopáncreas de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)..... | 62 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Pág. |
|--|------|
| 1.- Esquema del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) con sus principales partes que lo componen..... | 4 |
| 2.- Distribución geográfica del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)..... | 6 |
| 3.- Acción de la endopeptidasa y la exopeptidasa sobre la estructura de la proteína..... | 13 |
| 4.- Mecanismo catalítico de las proteasas aspárticas propuesto por Veerapandian <i>et al.</i> (1990)..... | 25 |
| 5.- Rendimiento de la actividad enzimática encontrada en el extracto crudo del hepatopáncreas de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>), después de ser precipitado con sulfato de amonio; FI (0-30%), FII (30-70%) y FIII (> 70)..... | 45 |
| 6.- Actividad específica de las fracciones obtenidas de precipitación con sulfato de amonio del extracto crudo del hepatopáncreas de calamar; EC (extracto crudo), fracción de 0-30% de saturación, fracción de 30-70% de saturación y fracción de > 70% de saturación..... | 46 |
| 7.- Determinación del porcentaje de inhibición de la FII precipitada con sulfato de amonio del extracto crudo del hepatopáncreas de calamar, utilizando inhibidores específicos; ITS 20 mg/ml (inhibidor de tripsina de soya), E-64 10 μ M (inhibidor de cisteína proteasas), EDTA 1 mM (inhibidor de metaloproteasas), pepstatina 100 μ M (inhibidor de proteasa aspárticas). En todos los casos se hizo una relación de 1:1 FII e inhibidor..... | 49 |

LISTA DE FIGURAS (continuación)

- 8.- Detección de bandas de actividad proteolítica por zimografía de la FII del extracto crudo del hepatopáncreas de calamar; A) FII, B) ITS 20mg/ml (inhibidor de serinas proteasas), C) E-64 10 μ M (inhibidor de cisteína proteasas), D) EDTA 1mM (inhibidor de metaloproteasas), y E) pepstatina 100 μ M (inhibidor de proteasas aspárticas). En todos los casos se hizo una relación de 1:1 fracción e inhibidor..... 50
- 9.- Cromatograma de actividad de la FII de saturación con sulfato de amonio obtenida del extracto crudo del hepatopáncreas de calamar gigante. Elución con acetato de sodio 20 mM y con 60 mM NaCl. Donde las fracciones con actividad proteolítica: pico I (PI), pico II(PII) y pico III (PIII), fueron tomados, y se hizo un zimograma de actividad por electroforesis ácida (gel superior)..... 53
- 10.- Inhibición en zimograma de la fracción # 31 obtenida de la cromatografía de exclusión molecular (Bio gel p-100 grueso), se partió de la inyección de la FII saturación con sulfato de amonio obtenida del extracto crudo del hepatopáncreas de calamar gigante. Utilizando como inhibidor pepstatina 100 μ M. donde A) fracción # 31 sin pepstatina y B) fracción # 31 con pepstatina..... 54
- 11.- Detección del peso molecular de la fracción # 31 obtenida en la cromatografía de filtración Bio gel p-100 grueso, donde se partió de la inyección de la fracción de 30-70% saturación con sulfato de amonio obtenida del extracto crudo del hepatopáncreas de calamar gigante, donde A) marcadores de bajo peso molecular y B) es la fracción # 31 del pico II obtenido de la corrida cromatográfica..... 56

LISTA DE FIGURAS (continuación)

- 12.- Determinación del porcentaje de inhibición de las fracciones # 27 a la 33 (PII) obtenidas de la corrida cromatográfica, donde se partió de la inyección de la fracción 30-70% de saturación con sulfato de amonio obtenida del ECHC. El PII sin pepstatina y PII* con pepstatina (inhibidor de proteasas aspárticas)..... 58
- 13.- Inhibición en zimograma de la fracciones # 27 a la 33 de PII obtenida de la cromatografía de exclusión molecular en Bio gel P-100. Utilizando como inhibidor pepstatina 100µM donde; carril No 1 (30-70 % de saturación con sulfato de amonio), pico II fracciones # 27 a la 33 y pico II* relación 1:1 fracciones # 27 a la 33 con pepstatina..... 59
- 14.- Detección del peso molecular del las fracciones # 27 a la 33 (PII) obtenidas del cromatograma de la exclusión molecular bio gel p-100 grueso de donde se partió de la inyección de la fracción de 30-70% de saturación obtenida del ECHC. A) marcadores de bajo peso molecular y PII (fracciones # 27 a la 33)..... 60
- 15.- Detección de la temperatura óptima de las proteasas aspárticas obtenidas de la fracciones # 27 a la 33 (PII), de la cromatografía de filtración Bio gel p-100 grueso de donde se partió de la inyección de la fracción de 30-70% de saturación obtenida del ECHC. Se utilizó un pH 3.5..... 64
- 16.- Detección del pH óptimo de las proteasas aspárticas obtenidas de la fracciones # 27 a la 33 que conforman el PII de la cromatografía de filtración Bio gel p-100 grueso de donde se partió de la inyección de la fracción de 30-70% de saturación obtenida del ECHC. Se utilizó una temperatura óptima de 60°C..... 65

RESUMEN

Con el fin de evaluar la actividad proteolítica del hepatopáncreas del calamar gigante (*Dosidicus gigas*), se partió de organismos que mostraron una longitud total de entre 1.06 a 1.14 m y una longitud del manto de 63 a 68 cm, además de presentar un peso de entre 8 a 10 kg y de 0.306 ± 0.043 kg de hepatopáncreas, el cual representa el 3.3% del organismo total. El extracto crudo del hepatopáncreas del calamar (ECHC) mostró una actividad total de 212.5 U/ml a un pH de 3.5, así como de 236 mg de proteína. Después de haber evaluado el ECHC se procedió a hacer dos pasos de purificación, el primer paso consistió en la precipitación fraccionada con sulfato de amonio, donde se obtuvieron 3 fracciones proteicas y se detectó que la actividad total está concentrada en la fracción que precipitó del 30-70% de saturación. Además de lograr un grado de purificación de 1.6 X y un rendimiento del 87%. Con el objeto de conocer la actividad proteolítica contenida en la fracción 30-70%, se utilizaron inhibidores específicos para proteasas, siendo la pepstatina el inhibidor más efectivo, ya que se detectó un decremento del 66.7% de actividad, además, al analizar la actividad mediante un zimograma de electroforesis ácida la muestra que fue incubada con pepstatina no mostró actividad ya que se sabe que la pepstatina es un inhibidor específico para las proteasas aspárticas. El segundo paso de purificación constó de la cromatografía de filtración en gel (Bio gel p-100 grueso), se obtuvo un pico de mayor actividad proteolítica en la fracción # 31, la cual reveló una actividad de 1.43 U y al ser analizada por un zimograma ácido, previamente incubada con pepstatina, no se detectó actividad

en el gel. De la fracción # 31 se detectó una banda con peso de 36.31 kDa la cual coincide con la catepsina D que se ha encontrado en otras especies de animales marinos. Después de haber evaluado la fracción # 31 se procedió a realizar una caracterización parcial de las fracciones # 27 hasta la 31 (PII), en las cuales se detectó un pico de máxima actividad a los 60⁰C, sin embargo se presentaron dos picos de máxima actividad a pH 4.5 y 5.5. Este comportamiento se puede atribuir a varios factores, tales como: la presencia de más de un tipo de enzimas proteolíticas con actividad aspártica, la presencia de isoformas, activas a diferentes pH y la temperatura a la que se corrió el ensayo. Para corroborar esto es necesario purificar más a la enzima y evaluar la actividad variando no sólo el pH sino, también, la temperatura.

OBJETIVOS

Objetivo General

Aislar y caracterizar parcialmente proteasas aspárticas del hepatopáncreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Objetivos Específicos

Determinar la actividad de proteasas aspárticas en el hepatopáncreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Aislar y purificar la(s) enzima(s) aspártica(s) del hepatopáncreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Caracterizar parcialmente las proteasas aspárticas del hepatopáncreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

HIPÓTESIS

La glándula digestiva (hepatopáncreas) del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) presenta actividad de proteasas, y dichas proteasas pueden aislarse y caracterizarse, al menos parcialmente.

INTRODUCCIÓN

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es un cefalópodo de importancia económica en varias regiones que se localiza abundantemente en las costas de Chile y México (Nigmatulin *et al.*, 2001). A nivel estatal y nacional esta especie representa una de las pesquerías más importantes, ocupando el tercer lugar de producción total en Sonora (INEGI, 2005). Esta pesquería se asocia con la demanda externa, principalmente de los mercados asiáticos, pero durante su procesamiento se aprovecha un 40-60%, desechándose lo restante del organismo (Córdova y García-Carreño 2002). De tales desechos, específicamente de las vísceras, se pueden obtener enzimas con un potencial de aplicación tanto en el uso de detergentes, tratamiento de desechos (Najafi *et al.*, 2005) y en las industrias de alimentos y farmacéutica (Rao *et al.*, 1998). Se sabe que la glándula digestiva o hepatopáncreas produce una amplia gama de enzimas proteolíticas, dentro de las cuales se encuentran las exopeptidasas y endopeptidasas (Haard y Simpson, 2000). Las proteasas aspárticas juegan un papel muy importante en los invertebrados para la digestión de la proteína (Navarrete del Torro *et al.*, 2006).

Las proteinasas aspárticas son un grupo de endoproteasas caracterizadas por su alta actividad y estabilidad a pH ácido (Simpson, 2000). Las tres proteasas aspárticas, caracterizadas principalmente en organismos marinos son la pepsina, la quimiosina y la gastricsina (Simpson, 2000).

En estudios realizados en especies tropicales como la sardina (Castillo-Yañez *et al.*, 2003), se caracterizó a las enzimas aspárticas a partir de las vísceras de esta especie.

Salles *et al.*, (2007) también detectaron la presencia de estas enzimas en la mucosa de la piel de tambacu (*Colossama macropomum*).

Existen estudios en invertebrados (Navarrete-Del Toro *et al.*, 2006) en los cuales se demostró que las enzimas aspárticas se encuentran en los jugos gástricos de varios decápodos. Komai *et al.*, (2004) aislaron catepsina D del hepatopáncreas de calamar japonés (*Todarodes pacificus*), como también, Gildberg, (1987) al purificar proteasas del hepatopáncreas de (*Todarodes sagittatus*) encontró catepsina D. Sin embargo, la información que existe respecto a las enzimas digestivas de invertebrados y más aún en el calamar gigante aún es escasa, existiendo muy poca información sobre proteasas aspárticas tales como la catepsina D, la pepsina y la gastricsina.

Considerando el papel de las enzimas aspárticas en la fisiología de los organismos, su potencial aplicación y que no existen actualmente estudios sobre éstas en el calamar *Dosidicus gigas*, se consideró importante establecer si el hepatopáncreas presenta actividad de proteasas aspárticas, para después de haber determinado la presencia de actividad, proceder a tratar de aislar y caracterizar parcialmente a las proteasas aspárticas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Taxonomía del Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*)

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es un molusco carnívoro que pertenece a la clase Cephalopoda, subclase Coleoidea, orden Teuthida, suborden Oegopsida (Figura 1) y dentro de este suborden se conocen 15 familias (Clarke y Trueman, 1998), de las cuales existen cerca de 100 especies distribuidas en todo el mundo, empleándose sólo unas cuantas para el consumo humano (Bjarnason, 1989).

Dentro de las familias consideradas de importancia comercial se encuentran: Loliginidae, que son los calamares marítimos, donde *Loligo forbesi*, *L. patagónica*, *L. carlbergensis* y *L. vulgaris* son las especies más representativas; la familia Ommastrephidae, incluye las subfamilias: Todarodinae, Illicinae y Ommastrephinae, cuyas especies más representativas son: *Todarodes pacificus*, *Nototodarus sloani*, *Illex argentinus*, *Illex illecebrosus* y *Dosidicus gigas* (Kreuzer, 1986).

Distribución del Calamar Gigante

El calamar *Dosidicus gigas*, es la única especie dentro del género *Dosidicus*, se le conoce comúnmente como calamar gigante, calamar gigante volador o calamar Humboldt (Roper *et al.*, 1984). Es un cefalópodo que pertenece a la familia Ommastrephidae, el cual representa el más grande y endémico calamar en el Pacífico Oriental, se distribuye desde el norte de México hasta el sur de Chile y a 104⁰W en el Ecuador (Nesis, 1983; Nigmatullis *et al.*, 2001). Es un molusco pelágico, encontrándose

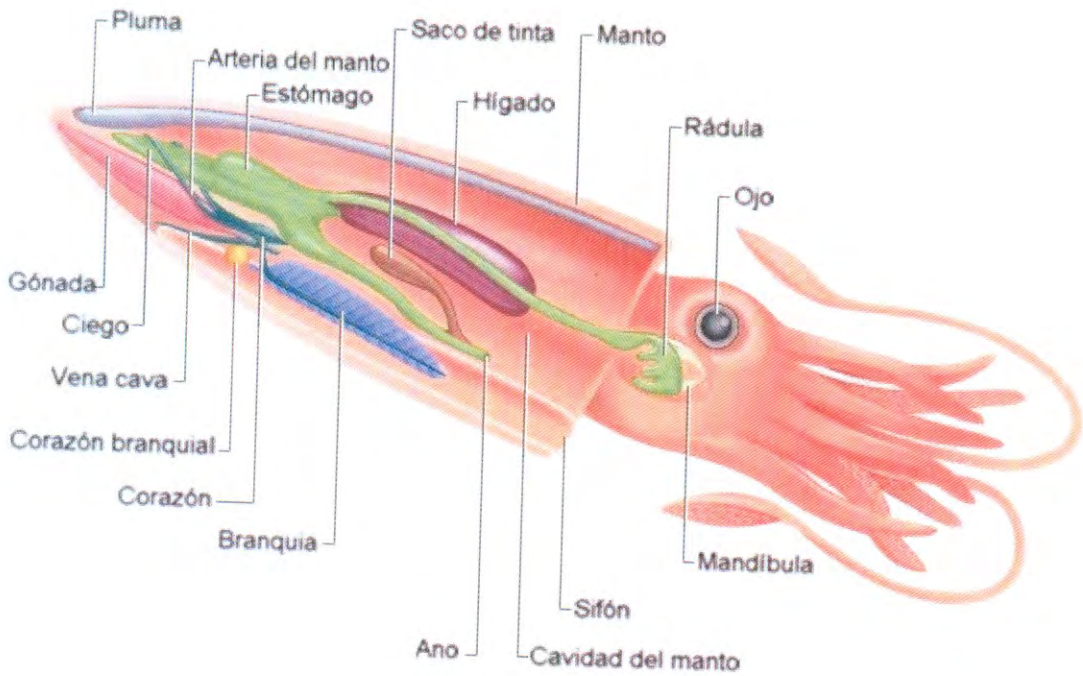


Figura 1. Esquema del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) con sus principales partes que lo componen.
Fuente: FAO, 2003.

desde la superficie hasta más de 400 m de profundidad. (Suda, 1973), que puede migrar grandes distancias como parte de su ciclo de vida (Mangold, 1974).

El calamar gigante se encuentra en mayor abundancia en las costas de Perú y México (Nigmatullin *et al.*, 2001); en el Golfo de California se localizan los ejemplares de mayor peso y tamaño según estimaciones de biomasa realizadas durante 1996 y 1999 por Nevarez-Martínez *et al.*, (2000) (Figura 2). Estudios del movimiento del calamar gigante (*Dosidicus gigas*), realizados por Klett en 1982 y Ehrhardt *et al.* en 1983, revelaron concentraciones de éste a lo largo de la costa oeste de Baja California. Asimismo, se observó que, en el mes de septiembre, el calamar gigante migra hacia el este de la costa continental de México y, después, hacia el sur, hasta la desembocadura del Golfo.

Importancia del Calamar Gigante

La pesquería de calamar en México está compuesta de varias especies de los géneros *Loligo*, *Lolliguncula*, *Loliolopsis*, *Illex*, *Symplectoteuthis* y *Ommastraphes*. Capturándose la mayoría de las especies de forma accidental o descarte (captura de especies que no son el objetivo y que en muchos casos son devueltas al mar ya muertas). Sin embargo, la pesquería del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es considerada de las pocas especies de calamar importante en el Pacífico norte de México (Semarnat, 2000). En el 2002 se registró una producción de calamar gigante de 12,482 ton, lo que representa un aumento del 4.6% para el 2005, siendo su captura de 13,054 ton (INEGI, 2005).

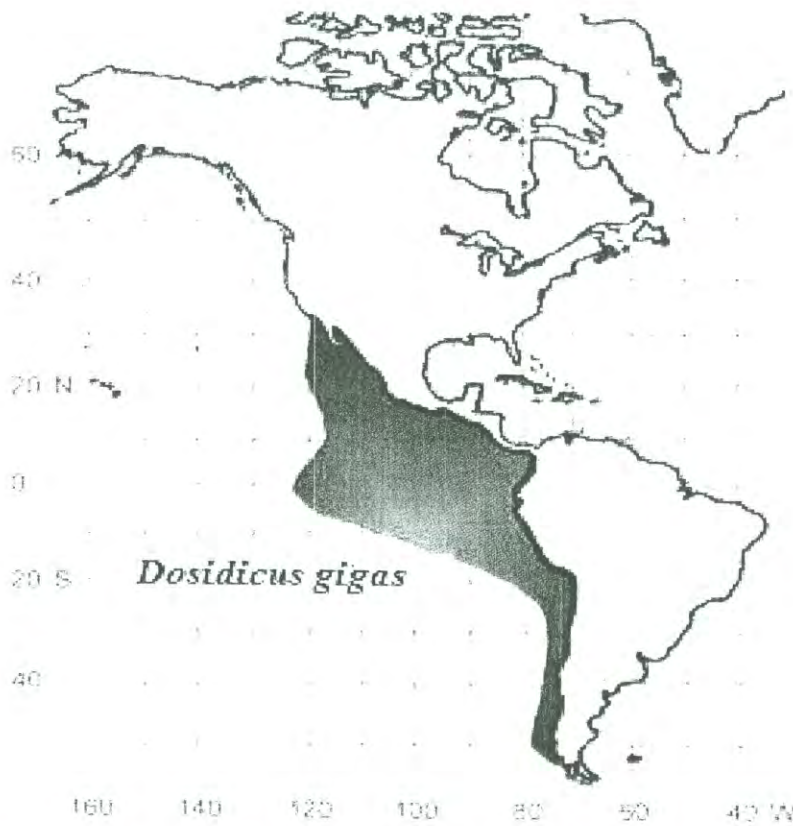


Figura 2. Distribución geográfica del calamar gigante (*Dosidicus gigas*).
Fuente: FAO/SIDP Species Identification Sheets

A pesar de ello, la captura de calamar aún se encuentra en un proceso de desarrollo. Mientras tanto, los esfuerzos realizados por la Secretaría de Pesca en conjunto con grupos de investigación buscan la manera de mantener o aumentar la captura de calamar gigante; del mismo modo, el aporte de los estudios de la biología, sobre estas especies durante su ciclo reproductivo, permite que el recurso no se agote (Névarez-Martínez *et al.*, 2000; Nigmatullin, 2001).

El calamar gigante capturado en nuestro país es exportado principalmente a los siguientes países: Corea del Norte, Japón, Corea del Sur, Hong Kong, Estados Unidos, Chile y España. Se comercializa de diferentes formas, algunas de ellas son: congelado, filete precocido y enlatado. Aquí en México, sólo se aprovecha la parte comestible (manto, 40%) considerándose el resto como desecho (60%).

En función de los antes mencionado, se considera que los desechos generados en la obtención del manto de calamar gigante (tentáculos, cabeza, vísceras y aleta) pueden ser utilizados para obtener productos de alto valor agregado. Dentro de esos desechos, el hepatopáncreas del calamar gigante, puede representar del 14-20 % del peso corporal del organismo. Komai *et al.* (2007) describen que el hepatopáncreas es un órgano interno con gran importancia en el desarrollo del calamar gigante ya que es el órgano digestivo del mismo, por lo que el hepatopáncreas produce una gran cantidad de enzimas proteolíticas intracelulares, las cuales juegan un papel importante en la hidrólisis de la proteína ingerida por el organismo.

Enzimas

Las enzimas son encontradas en todos los sistemas vivos y hacen posible la vida, ya que tienen el poder de catalizar, facilitar, y agilizar determinados procesos sintéticos y analíticos. Las enzimas se pueden encontrar en organismos que crecen a 0°C, a 37°C y cerca de 100°C (microorganismos hallados en aguas termales).

Las enzimas son muy importantes en la naturaleza, y son catalizadores de los sistemas biológicos, éstas determinan la pauta de la transformación química, así como también, la participación de un tipo de energía a otro, se caracterizan por presentar un poder catalítico y especificidad, llevándose a cabo la catálisis en un centro específico llamado centro activo. Las enzimas aceleran las reacciones incrementando su velocidad hasta un millón de veces o más que las reacciones no catalizadas enzimáticamente. Son altamente específicas, tanto en las reacciones que catalizan como en la selección de sustancias reaccionantes o sustratos, normalmente catalizan una sola reacción química o un grupo de reacciones relacionadas. Por lo tanto las enzimas al controlar las reacciones dan como resultando productos estereoespecíficos, que pueden ser muy valiosos para la nutrición y la salud, o compuestos esenciales para la vida (Fennema, 2000), y en función del tipo de reacción que catalizan son clasificadas por la Comisión de Enzimas (Tabla 1) (Whitaker *et al.*, 2003), y dentro del gran grupo de las hidrolasas (Grupo 3) se encuentran las proteasas, estas enzimas participan en la digestión de las proteínas.

De las enzimas identificadas en invertebrados acuáticos y peces, se ha detectado que son similares en cuanto al substrato sobre el cual trabajan a las reportadas en organismos terrestres (Haard, 1998), y de las diferencias observadas entre estos dos

Tabla 1. Clasificación enzimática según la Comisión de Enzimas.

| Clase | Tipo de reacción |
|--------------------|--|
| 1.-Oxidoreductasas | Oxidación – reducción |
| 2.-Transferasas | Transferencia de grupos |
| 3.-Hidrolasas | Reacciones de hidrólisis (transferencia de grupos funcionales al agua) |
| 4.-Liasas | Adición o separación de grupos para formar dobles enlaces |
| 5.-Isomerasas | Isomerización (transferencia intramolecular de grupos) |
| 6.-Ligasas | Unión de dos sustratos a expensas de la hidrólisis del ATP. |

Fuente: Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology.

grupos, se han percibido principalmente en cuanto a composición de aminoácidos, pesos moleculares, pH y temperatura óptima de acción, así como en la estabilidad al pH y temperatura, de inhibición y de propiedades cinéticas (De-Vecchi y Coppes, 1996).

Hidrolasas

Las hidrolasas catalizan el rompimiento de enlaces químicos (C-O, C-N, C-C) con la introducción de una molécula de agua como segundo sustrato, el agua participa en el rompimiento de los enlaces covalentes; por ejemplo, enlaces peptídicos de proteínas, enlaces glucosídicos en carbohidratos, enlaces ester en lípidos y enlaces fosfodiéster en ácidos nucleicos. El nombre sistemático es tomado del sustrato hidrolizado (Whitaker, 2003). Son clasificadas según la Comisión de Enzimas (C.E.), generalmente en primer lugar por la naturaleza de los enlaces hidrolizados, luego, por la naturaleza del sustrato, y por último, por la enzima (Badui, 1993). En el grupo de enzimas hidrolíticas se encuentran las enzimas proteolíticas, también conocidas como proteasas.

Las vísceras de organismos marinos son conocidas por su alta actividad de enzimas digestivas, principalmente proteasas. De las enzimas aisladas de las vísceras de pescado y mariscos se tienen a la fosfatasa alcalina, hialuronidasa, acetilglucosaminidasa, quitinasa (Venugopal, 1995) y del tipo proteasas tales como quimiosina, pepsina, gastricsina y catepsina D.

Proteasas. Se encargan de catalizar la hidrólisis de enlaces peptídicos de las proteínas, cuentan con una alta especificidad. Las proteasas al ser hidrolizadas catalizan el rompimiento del enlace peptídico con la participación de moléculas de agua como reactante (Simpson, 2000). Un enlace peptídico será o no hidrolizado dependiendo de

varios factores: a) la secuencia de aminoácidos alrededor del enlace, debido a que la mayoría de las proteasas reconoce aminoácidos o secuencias específicas, b) tener accesibilidad estérica al enlace, ya que si éste se encuentra en un interior hidrofóbico de proteínas globulares o en zonas hidrofóbicas con limitada accesibilidad, ésta no será atacada por la proteasa; por último c) las condiciones físico-químicas del medio, debido a que las proteasas presentan un óptimo rendimiento a ciertas condiciones de pH, fuerza iónica, temperatura y presencia de factores orgánicos y/o metálicos (Segel, 1968).

En el crecimiento y supervivencia de todos los organismos vivos, es muy importante la participación de las proteasas. Las proteasas catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos, esta es una reacción muy común en la naturaleza. En animales marinos, se ha encontrado una mayor presencia de proteasas en las glándulas digestivas. De igual forma que las proteasas de microorganismos, plantas y animales, las proteasas digestivas de organismos marinos catalizan la degradación hidrolítica de proteína (García-Carreño y Hernández-Cortez, 2000)

Las proteasas son consideradas tecnológicamente importantes (Simpson, 2000) y en productos pesqueros además de localizarse en su glándula digestiva se encuentran en células musculares, en la matriz extracelular, en el tejido conectivo circundante a las células musculares, y en otros órganos (Haard, 1995).

La adaptación de los organismos marinos a las diferentes condiciones ambientales, junto con las variaciones genéticas entre especies, por ejemplo, alta especificidad catalítica a bajas temperaturas y una alta estabilidad térmica (Klomklao *et*

al., 2005), son asociadas como propiedades únicas de las proteasas marinas, comparadas con las proteasas de animales terrestres, plantas y microorganismos (Simpson, 2000).

Otras características importante de las proteasas digestivas de especies marinas, es que pueden presentar diferencias entre ellas en cuanto a la respuesta a inhibidores específicos, así como también a la estabilidad a la presión (Ashie, 1996), su habilidad para hidrolizar sustratos de proteínas nativas (Guizani *et al.*, 1991), variaciones de pH, presencia de sales y otros materiales.

Clasificación de las Proteasas

La clasificación de las proteasas en función de los criterios establecidos por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, que toma en cuenta tres criterios: a) tipo de reacción catalizada, b) naturaleza química del sitio catalítico, y c) una relación evolutiva con referencia a la estructura. Se establece una gran división de proteasas en dos grupos; exoproteasas y endoproteasas (Figura 3).

Exopeptidasas

Las exopeptidasas dividen el enlace peptídico próximo al carboxilo o amino terminal del sustrato. Actúan únicamente cerca del extremo de la cadena polipeptídica en el nitrógeno o carbono terminal. Se clasifican en dos grupos aminopeptidasas y carboxipeptidasas (Rao *et al.* 1998).

Siendo que las aminopeptidasas actúan en el amino libre terminal de las cadenas polipeptídicas lo cual hace que se libere un solo aminoácido residual, como un dipéptido o en su caso un tripéptido. Por otra parte, las carboxipeptidasas a diferencia de las

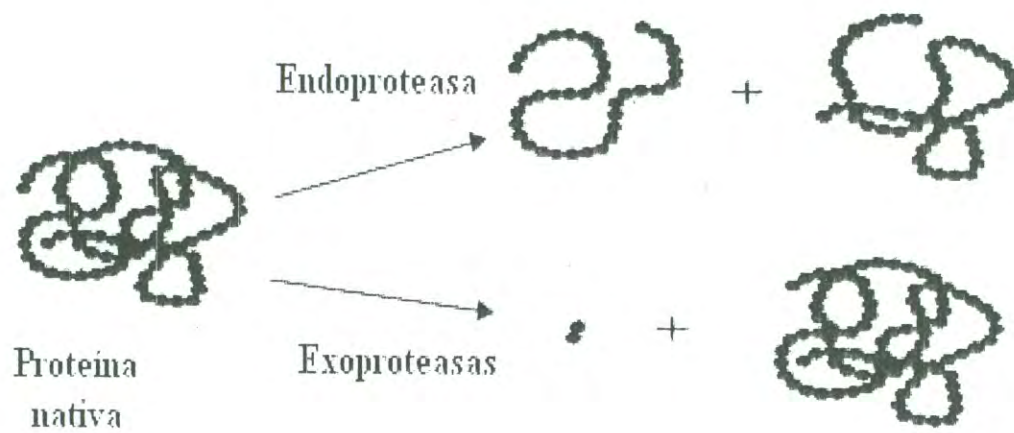


Figura 3. Acción de la endopeptidasa y la exopeptidasa sobre la estructura de la proteína
Fuente: Klomklao, 2008

aminopeptidasas actúan en el carboxilo terminal de las cadenas polipeptídicas liberando con esto un solo aminoácido o un dipéptido, las carboxipeptidasas además, pueden ser divididas dentro de tres grupos; serina carboxipeptidasa, metalocarboxipeptidasa y cisteína carboxipeptidasa, dicha agrupación se basa en la naturaleza del aminoácido residual encontrado en el sitio de acción de la enzima (Rao *et al.* 1998).

Endopeptidasas

Conocidas por la característica preferencial que tienen sobre la región de los enlaces peptídico y no de los carbonos o nitrógenos terminales de la cadena polipeptídica o bien hacen la división de los enlaces peptídicos distantes de amino o carboxilos terminales del sustrato (Rao *et al.* 1998). Por otra parte, las endopeptidasas se dividen dentro de cuatro subgrupos lo cual se basa en su mecanismo catalítico; serina proteasa, cisteína proteasa, metaloproteasas y proteasas aspárticas.

Proteasas Digestivas de Organismos Marinos

La utilización de la proteína alimentaria en la digestión y la transformación endógena de la proteína, es un proceso metabólico de los más antiguos (Neurath, 1984). En la literatura se tienen numerosos estudios con respecto a la actividad de proteasas en diferentes especies marinas (De Vecchi y Copper, 1996). Dentro de las proteasas principalmente encontradas en órganos digestivos de pescado se ha encontrado que la actividad detectada depende de la especie y de sus órganos. Peces comúnmente utilizados en la industria tailandesa: bonito (*Katsuwonus pelamis*), atún aleta amarilla (*Thunnus albacores*) y atún tongol (*Thunnus tonggol*) se detectó que la actividad proteolítica varió por especie y por órgano evaluado (Klomkloa *et al.*, 2004). De las

principales enzimas detectadas están la pepsina, la gastricsina, la tripsina, la quimiotripsina, las colagenasas, las elastasas, las carboxipeptidasas y la carboxilesterasa (Haard, 1994; Simpson, 2000). De las enzimas mencionadas anteriormente se considera que la pepsina y la tripsina, son los dos mayores grupos de enzimas encontradas en vísceras de pescado. Gildberg *et al.* (1990) detectó la actividad de pepsina en el estómago, y de tripsina en el intestino de pescado (Kishimura *et al.*, 2006). En el pez disco (*Symphysodon aequifasciata*) se encontró una mayor actividad proteolítica en los intestinos que en el estómago (Chong *et al.*, 2002). En el atún rojo (*Thunnus trynnum*) se observó un comportamiento similar de proteasas (Essad *et al.*, 2002).

En los crustáceos también se ha detectado alta actividad de proteasas digestivas (Galgani y Nagayama, 1987; Fang y Lee, 1992; y García-Carreño *et al.*, 1994). Los crustáceos decápodos sintetizan una alta actividad de enzimas proteolíticas en las glándulas digestivas, sin embargo, sintetizan una mayor actividad proteolítica en el hepatopáncreas. Las enzimas proteolíticas en glándulas digestivas facilitan la primera parte de la hidrólisis de los péptidos de la proteína digerida (Navarrete del Toro *et al.*, 2005). En el hepatopáncreas de camarón adulto (*Litopenaeus schmitti*) se encuentran proteasas del tipo tripsina y quimiotripsina (Lemos *et al.*, 2002). Celis-Guerrero *et al.* (2004) detectaron la presencia de proteasas digestivas en langosta (*Panulirus interruptus*) tanto en los jugos gástricos, en la glándula digestiva y en el intestino se muestra actividad. En las glándulas digestivas y jugos gástricos de cangrejo *Callinectes bellicosus*, y cangrejo *Callinectes arcuatus*, se reportó actividad de tripsina y quimiotripsina (Díaz-Tenorio *et al.* 2006).

En recientes investigaciones realizadas en diferentes especies de calamar, se ha detectado actividad de cisteína proteasa, metaloproteasas y caboxipeptidasas en el hepatopáncreas de *Illex illecebrosus* (Raksakulthai y Haard, 1998; Raksakulthai y Haard, 2001), en calamar japonés (*Tadorodes pacificus*) la actividad de proteasas aspárticas (Komai *et al.*, 2007), y en calamar gigante (*Dosidicus gigas*) se determinó la presencia de cisteína proteasas (Cárdenas-López y Haard 2009), también, tripsina, caboxipeptidasa, aminopeptidasa y quimiotripsina (Ramírez-Olivas, 2000; Ezquerra-Brauer *et al.*, 2002; Osuna-Ruíz, 2003).

Serina Proteasas de Organismos Marinos

Como ya se mencionó las serina proteasas son clasificadas como endopeptidasas y reciben este nombre por tener una serina en su sitio catalítico. La familia de las serina proteasas se caracterizan por la presencia de serina residual junto con un grupo imidazol además de presentar un carbonilo de aspartil en su sitio activo. Las serina proteasas pueden ser inhibidas por diisopropilfosforuro (DFP), se ha reportado que reacciona con el grupo hidroxilo del sitio activo de la serina residual.

Dentro de las serina proteasas purificadas y caracterizadas de glándulas digestivas de animales marinos se conocen la tripsina (EC. 3.4.21.4) la cual se caracteriza por actuar sobre enlaces peptídicos hacia el carboxilo de arginina y lisina residual (Klomklao *et al.*, 2006^a); la quimotripsina (EC. 3.4.12.1) que hidroliza enlaces peptídicos que incluyen aminoácidos con cadena lateral larga y aminoácidos no polares como tirosina y la elastasa (EC. 3.4.21.11) la cual muestra preferencia por alanina, valina y glicina (Simpson, 2000).

Al ser considerada la tripsina como muy importante en los procesos biológicos y en la digestión ya que participa en la activación de zimógenos de quimiotripsina, como de otras enzimas (Cao *et al.* 2000) es de las serina proteasas más estudiadas. La tripsina es muy semejante tanto en mamíferos como animales marinos, mostrando similitud en peso molecular (22-30 kDa), en la composición de aminoácidos y sobre la sensibilidad a inhibidores. Por otra parte, los pH para la hidrólisis de sustratos van desde 7.5 a 10 y para la temperatura óptima en la hidrólisis de sustratos van de 35⁰ a 65⁰C (De Vecchi y Coppes, 1996).

Sin embargo, existen estudios donde se han detectado las principales diferencias en la estabilidad de las tripsinas de mamíferos con respecto a las tripsinas de origen marino. Simpson, (2000); Klomklao *et al.*, (2006^b), encontraron que las enzimas marinas son más estables a pH alcalino que a pH ácidos; por otra parte, las enzimas de mamíferos son más estables a pH ácidos que alcalinos. Recientemente, estudios realizados en atún tongol (*Thunnus tonggol*) mostraron una estabilidad a pH de 6 a 11, sin embargo esta decrece rápidamente a valores por debajo de pH 6, también, cuando se hizo el estudio en tripsina de bonito se encontró que la tripsina era estable a rangos de pH entre 6 a 11, pero inestable a valores por debajo de pH 5 (Klomklao *et al.*, 2006^a; Klomklao *et al.* 2007). Castillo-Yáñez *et al.*, (2005) establecen que la estabilidad de la tripsina a un pH particular puede estar relacionada con su carga neta a dicho pH.

El órgano donde se ha estudiado la tripsina en los organismos marinos es en las vísceras de peces, purificándose tripsina A y B de los intestinos de la anchoa (*Engraulis*

encrasicholus), que presentaba un peso molecular de 27 kDa la tripsina A y de 28 kDa la tipo B. El pH óptimo para ambas es de 8 a 9 (Martínez *et al.* 1988).

Otra proteasa marina ampliamente estudiada es la quimiotripsina. Esta enzima ha sido aislada de bacalao (Asgiersson y Bjarnason, 1991), en el páncreas e intestino de *Scleropages formosus* (Yetty *et al.*, 2004), en sardina Monterrey (Castillo-Yáñez *et al.*, 2006). La quimiotripsina es una enzima de un solo polipéptido y con un peso molecular entre 25 y 28 kDa. Su actividad se presenta normalmente a rangos de pH entre 7.5 a 8.5, sin embargo, presenta mayor estabilidad a pH 9 (Simpson, 2000). Por otra parte, en el hepatopáncreas de camarón (*Litopenaeus vannamei*), presenta un peso molecular de 33.2 kDa, un pI de 3.1 y muestra una actividad óptima a pH 8 (Hernández-Cortés *et al.*, 1997). Díaz-Tenorio *et al.*, (2006) estudiaron las serina proteasas de jaiba guerrera (*Callinectes bellicosus*) y jaiba blanca (*Callinectes arcuatus*), encontraron tanto actividad de tripsina, como de quimiotripsina. Estas enzimas presentaron estabilidad entre 40⁰ – 50⁰ C por una hora y una máxima actividad entre pH 6 a 8. En curvina roja (*Sciaenops ocellatus*) la actividad de quimiotripsina fue reportada a pH 7.8 a una temperatura de 50⁰C, con un peso molecular de 26-27 kDa (Applebaum, *et al.*, 2001).

Cisteína Proteasas Marinas

Otras endoproteasas importantes presentes en las especies marinas son las cisteína proteasas. El grupo de las cisteína o tiol proteasas (Mihalyi, 1978), se caracteriza por tener residuos de cisteína o histidina como también grupos esenciales en el sitio catalítico, además, éstas necesitan la presencia del grupo -SH, las cisteína proteasa son inhibidas por agentes alquilantes, agentes oxidantes. La catepsina B

(3.4.22.1) es un ejemplo de una cisteína proteasa aislada en glándulas digestivas de animales marinos (Simpson, 2000).

Las cisteína proteasas muestran actividad a pH ácidos, sin embargo, son inactivas a pH alcalinos. La catepsina B, catepsina L y catepsina S, son las principales enzimas aisladas de las glándulas digestivas de animales marinos (Simpson, 2000).

La Catepsina B se ha detectado en almeja (Reid y Rauchert, 1976), mejillón (Zeef y Dennison, 1988) y en la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*). Además se detectó que esta catepsina B durante el periodo de crecimiento del organismo variaba su actividad (Donald *et al.*, 2003). Se ha reportado que las catepsina B presentes en los organismos marinos presentan una cadena polipeptídica de peso molecular entre los 13.5 y 25 kDa, además actividad a pH de 3.5 a 8. La catepsina B necesita al ion Cl^- para activarse, como también requiere de agentes sulfidrilos residuales o agentes metal-quelante (Zeef y Dennison, 1988). La catepsina B del músculo esquelético de tilapia *mossambica* tiene un peso molecular de 23.5 kDa. Esta enzima, es endopeptidasa e hidroliza los sustratos Z-arginina-arginina-NNap y Bz-arginina-NNap.

Otra cisteína proteasa purificada de organismos marinos es la catepsina L, la cual fue purificada de carpa, detectándose que tenía un peso molecular de 30 kDa a 40kDa, un pH óptimo de actividad de 5.5 a 6 y una temperatura óptima de 50⁰C (Aranishi *et al.*, 1997). En decapados como el *Crangon crangon* y *Crangon allmani* se ha encontrado que la mayor actividad cisteína proteasa en el hepatopáncreas es realizada por catepsina L-libre (Teschke y Saborowski 2005).

Cárdenas- López y Haard, (2009) detectaron la presencia de catepsina L en el hepatopáneas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Con un peso molecular de 23.7-24 kDa, del 75-89% un pH óptimo de 4.5 y una temperatura de 55⁰C. La actividad de catepsina L fue inhibida drásticamente por leupeptina, quimostatin y E-64 (L-trans.epoxisuccinil-leucilamida-(4-guanidino)-butano), Pangkey *et al.*, (2000) al purificar catepsina S de carpa (*Cyprinus carpio*) determinó que presentaba un pH óptimo a 7, a una temperatura de 37⁰C, además de que fue inhibida por E-64 (L-trans-epoxisuccinil-leucilamida-(4-guanidino)-butano).

Metaloproteasas Marinas

Las metaloproteasas (EC 3.4.24.) son enzimas hidrolíticas que representan más del 25% de las enzimas y contienen iones metálicos fuertemente enlazados o requieren de estos para su actividad. Los iones metálicos pueden ser estudiados por cristalografía de rayos X, imágenes de resonancia magnética (IRM) y resonancia por aceleración de electrones (RAE) (Murray *et al.*, 2001). Las metaloproteasas contienen una cantidad definida de iones metálicos funcionales, el cual es retenido cuando son purificadas. Mientras que, las enzimas que son activadas por metales enlazan el metal con menor fuerza, por ello, requieren la adición de metales (Murray *et al.*, 2001). Estudios sugieren que las metaloproteasas pueden contener un residuo de tirosina y otro de imidazol asociados con el sitio catalítico de las metaloproteasas (Simpson, 2000). Los mecanismos por los cuales los iones metálicos realizan sus funciones parecen ser similares en las metaloenzimas y en las enzimas activadas por metales (Murray *et al.*, 2001).

Los iones metálicos pueden participar en los cuatro mecanismos, los cuales le permiten a la enzima acelerar la velocidad de las reacciones químicas: 1) la catálisis ácido-base general, 2) la catálisis covalente, 3) el acercamiento de los reactantes, y 4) la inducción de rigidez o tensión en las enzimas o en el sustrato. El hierro, el magnesio, el cobalto (en la coenzima B₁₂) y el magnesio son los iones que más frecuentemente participan en la catálisis enzimática, de los cuales la mayoría se presenta como cationes bivalentes, por ejemplo el Mg²⁺ (Murray *et al.*, 2001). Las metaloproteasas son inhibidas por agentes quelantes como 1,10-fenantrolina y EDTA (etilendiamintetracético), también, por un proceso de diálisis. La mayoría de estas enzimas conocidas en organismos marinos son exopeptidasas (Simpson, 2000).

Hasta hace poco se conoce que en los tejidos de vertebrados marinos se encuentran distribuidas ampliamente las metaloproteasas. La gelatinasa A se encuentra en vertebrados superiores con un peso molecular de 72 kDa (Saito *et al.*, 2000). Sin embargo, en manto de calamar se encuentran metaloproteasas, como la miosinasa I y la miosinasa II. Estas enzimas se encargan de hidrolizar la cadena pesada de miosina (Okamoto *et al.*, 1993).

Las metaloproteasas se han caracterizado de pez roca, carpa y manto de calamar. Sin embargo, estas enzimas no se encuentran en glándulas digestivas pero sí en el tejido muscular (Simpson, 2000).

Proteasas Aspárticas de Organismos Marinos

Las proteasas aspárticas (EC. 3.4.23) son caracterizadas por su actividad a pH ácido. El término “aspartil” proteasa (o carboxil proteasa) se debe a que su sitio

catalítico está compuesto del grupo carboxilo de dos residuos de ácido aspártico (Whitaker, 1994), el Asp 32 y el Asp 215 (Tang *et al.*, 1973), las proteasas presentan varias características como actividad catalítica óptima a bajo pH, relación estructural, características catalíticas e inhibición por los inhibidores específicos, por otra parte, estas enzimas se pueden sintetizar bajo la forma de zimógenos o pro-enzimas (Fusek *et al.*, 1995). Los procesos digestivos en el estómago de humanos y animales se llevan a cabo mediante la combinación de pH ácido y una hidrólisis enzimática. Además, las proteasas aspárticas se definieron de acuerdo a su óptimo pH de catálisis, que es entre 1.5 y 5. Este pH es diferente del habitual pH fisiológico óptimo de otra clase de proteasas; cisteína proteasa, serina proteasa y metaloproteasas. Las proteasas aspárticas consisten aproximadamente de una cadena de 300 a 350 residuos de aminoácidos, con excepción de las proteasas retrovirales que suele tener unos 100 aminoácidos. Su peso molecular oscila entre 30 kDa a 40 kDa. Su peso molecular depende a menudo en función del grado de glucosilación. Por otra parte, Estas enzimas aspárticas cumplen con muchas funciones fisiológicas y fisiopatológicas en los diversos órganos (Fusek *et al.*, 1995).

Fuente de proteasas aspárticas. Las proteasas pueden ser encontradas naturalmente en virus, plantas, mamíferos (Chitpinityol *et al.*, 1998), y animales marinos (Simpson, 2000). Dentro de las proteasas que se han aislado y caracterizado del estómago de animales marinos: Pepsina A (EC 3.4.23.2), esta enzima tiene preferencia específica por aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina y triptófano; pepsina B (EC 3.4.23.2); gastricsina (pepsina C) (EC 3.4.23.3) con especificidad preferencial por tirosina, estas

enzimas son producidas en las mucosas como precursores inactivos; quimiosina (renina) (EC 3.4.23.4) con especificidad similar a pepsina (Simpson, 2000).

En el estómago de pez granadero (*Coryphaenoides pectorales*) se reportó la presencia de pepsina A (EC 3.4.23.2) y pepsina B (EC 3.4.23.2), estas enzimas presentaron un peso molecular de 35 kDa para pepsina A y de 31 kDa para pepsina B, y un óptimo pH de acción de 3 y 3.5, respectivamente, éstas mostraron una temperatura óptima a 45⁰C (Klomklao *et al.* 2007). Simpson, (2000) reportó que la pepsina es muy estable de pH 2 a 6, pero pierde rápidamente la actividad a pH mayores a 6, esto conlleva a la desnaturalización de la enzima, en otro estudio, en el cual, al estudiar las enzimas del estómago de sardina Monterrey se encontraron enzimas ácidas con una estabilidad a pH de 3 a 6 (Castillo-Yañez, 2004).

Dentro de las proteasas aspárticas se tienen a la catepsina E (EC 3.4.23.34) y catepsina D (EC 3.4.23.5) las cuales se encuentran en los lisosomas de muchas células. La catepsina E se ha identificado en la mucosa gástrica, en el timo, en el bazo y en membrana de los eritrocitos (Kageyama, 1995). Mientras que la catepsina D puede estar implicada en la degradación intracelular y endocitosis de la proteína.

Otra enzima aspártica es la renina, la cual ha sido encontrada en tejidos como el riñón, y en la glándula submaxilar (Kay, 1985). También se ha detectado actividad de proteasas aspárticas en pepino, tomate, cebada, arroz, sorgo, patatas y cacao (Doi *et al.*, 1980; Morris *et al.*, 1985; Belozersky *et al.*, 1989; Guevara *et al.*, 1999; Gilloteau *et al.*, 2005).

Mecanismo catalítico de proteasas aspárticas. James *et al.*, (1977, 1982); James y Sielecki, (1985) propusieron que la catálisis era iniciada por la protonación del oxígeno del carboxilo del sustrato por un protón del Asp 215, seguido por el ataque nucleofílico del carbono del carbonilo del sustrato de Asp, iones de hidróxido generados por el agua después de su donación de protones al Asp 32. La anterior protonación condujo a la formación del intermediario tetraédrico. El intermediario fue generado por protonación del átomo de nitrógeno. La protonación del carbonilo del sustrato y el ataque nucleofílico pueden aparecer simultáneamente durante la formación del intermediario tetraédrico. De igual forma, cuando se está dando la transferencia de protones del intermediario tetraédrico al mismo tiempo puede ocurrir la protonación del átomo de nitrógeno del sustrato durante la división del intermediario resultante (Polgár, 1987). En 1987, Pearl sugirió que la distorsión del enlace de escisión hacia la unión enzima sustrato facilita el choque del intermediario debido a la generación de pares antiperiplanares de orbitales solitarios en el enlace C-N pero no en el enlace carboxilo C-O. Por lo tanto, el producto secundario es la amina libre en lugar del nucleófilo original. Además, el oxígeno cargado de una molécula de solvente forma puentes de hidrógeno con los residuos Asp32 y Ser35 o con los residuos Gly76, Asp77 o Tyr75 (Blundell *et al.*, 1987; Pearl, 1987). Unos años más tarde Veerapandian *et al.* (1990) propuso un modelo del mecanismo catalítico de las proteasas aspárticas (Figura 5), donde el pro-R hidroxilo del hidrato carbonilo tetraédrico forma un puente de hidrógeno con el oxígeno exterior de Asp32 y Asp215. El segundo oxígeno hidroxilado del hidrato

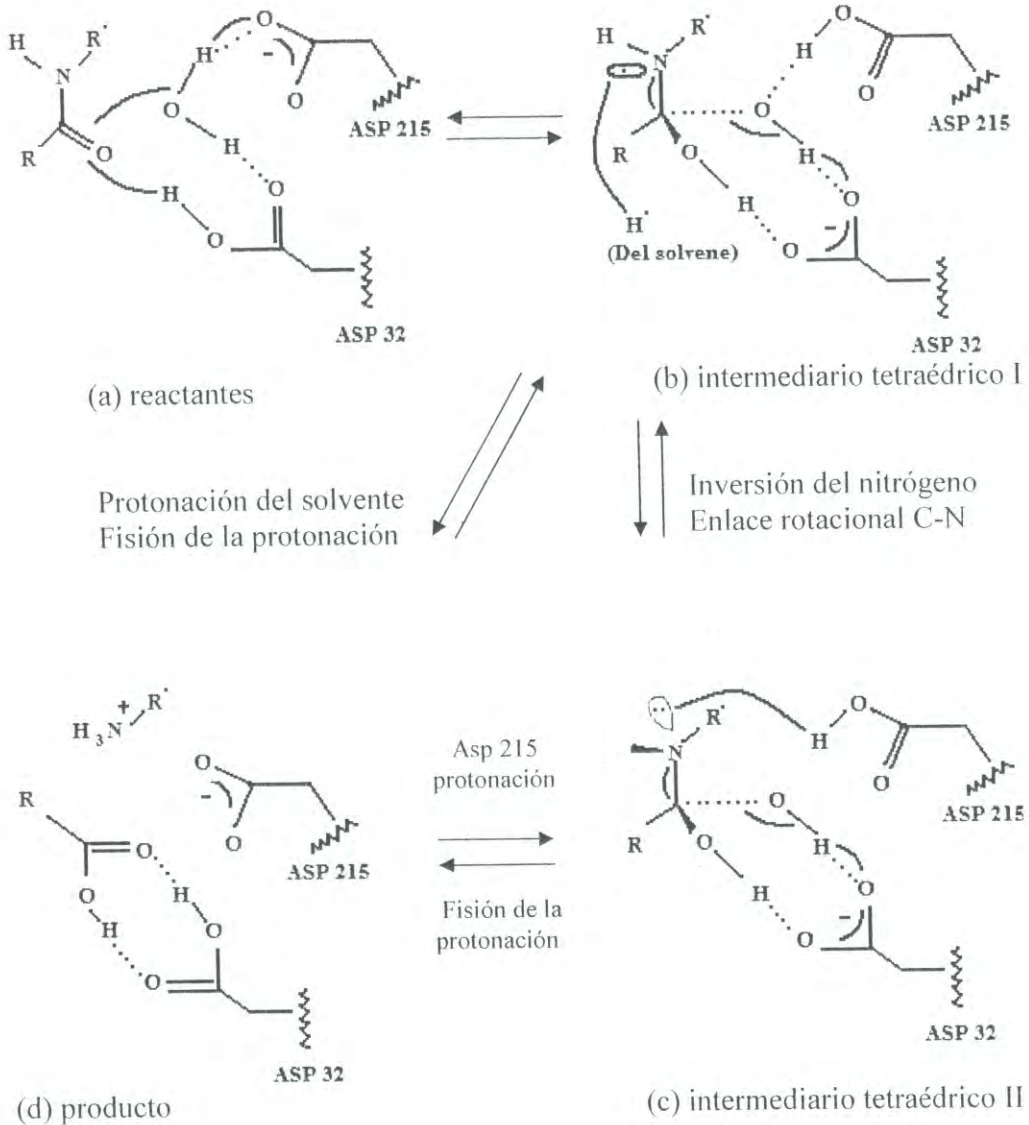


Figura 4. Mecanismo catalítico de las proteasas aspárticas propuesto por Veerapandian *et al.* (1990).
Fuente: Rao *et al.*, 1998.

se une sólo al oxígeno carboxilado de Asp32. El centro activo carbonilo es protonado por Asp32 y concurrentemente atacado por una molécula de agua polarizada a un estado nucleofílico por Asp215. El rígido movimiento en el complejo enzima-sustrato puede inducir la distorsión del enlace amida y facilitar el ataque de agua nucleofílica en el carbonilo polarizado. Entonces, en el intermediario tetrahédrico I, el Asp31 negativamente cargado es estabilizado por puentes de hidrógeno. El nitrógeno de la amida habrá sido piramidalizado con la nueva disposición que favorece la protonación. Un protón puede ser transferido desde el solvente o el Asp215. Una propuesta de mecánica similar ha sido descrita por James *et al.*, (1992).

Estudios Enzimáticos en Calamar

Como ya se mencionó las proteasas juegan un papel muy importante en el crecimiento y supervivencia de todos los organismos vivos y la hidrólisis de enlaces peptídicos es catalizada por proteasas, dichas enzimas son muy comunes en animales marinos, principalmente en las glándulas digestivas (Klomklao, 2008).

El calamar se asemeja a otros cefalópodos ya que su ciclo de vida es corto, por lo tanto, su crecimiento es rápido, implicando una mayor tasa de recambio de la proteína del organismo, lo cual se relaciona con una mayor actividad proteolítica que cualquier otra especie marina (Sakai y Matsumoto, 1981; Konno y Fukazawa, 1993).

Hatate *et al.*, (2000) al estudiar la actividad proteolítica en el hepatopáncreas de diferentes especies de calamares y sepia, encontraron que se presenta una mayor actividad proteolítica a pH ácido (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de la actividad proteolítica de diferentes especies de calamar y sepia.

| Especies | Actividad proteolítica (units/g) | |
|-----------------------------|-------------------------------------|-----------|
| | pH 4.0 | pH 7.0 |
| <i>Todarodes filippoude</i> | 17.3 ± 3.1 | 4.8 ± 0.5 |
| <i>Illex argentinus</i> | 16.3 ± 3.1 | 4.3 ± 0.3 |
| <i>Tadarodes pacificus</i> | 14.9 ± 0.8 | 2.5 ± 0.8 |
| <i>Sépia esculenta</i> | 12.4 ± 4.1 | 2.7 ± 0.1 |
| <i>Dosidicus gigas</i> | 14.8 ± 0.1 | 3.5 ± 1.0 |

Fuente: Hatate H *et al.*, 2000.

Estudios en *Todarodes sagittatus* e *Illex illecebrosus*

Gildberg, (1987) encontró actividad proteolítica en la glándula digestiva de calamar (*Todarodes sagittatus*), purificando y caracterizando a catepsina D, Raksakulthai y Haard, (2001) al trabajar con la actividad proteolítica del hepatopáncreas de calamar argentino (*Illex illecebrosus*) pudieron purificar y caracterizar carboxipeptidasa. Por otra parte, Hameed y Haard (1985) aislaron la catepsina C (dipeptidil aminopeptidasa I, EC 3.4.14.1) del hepatopáncreas de calamar (*Illex illecebrosus*).

Estudios en *Todarodes pacificus*

El calamar japonés vive aproximadamente un año y crece rápidamente, de 1 a 300 mm o más, durante este tiempo (Yohko *et al.*, 2004). Presenta un alto grado de actividad proteolítica en el músculo, reportándose que posee proteasas ácidas, cisteína proteasa y metaloproteasas (Sakai-Suzuki *et al.*, 1983; Konno *et al.*, 1993), así como actividad endógena colagenolítica (Mizuta *et al.*, 1996).

Yohko *et al.*, (2004) purificaron cisteína proteasa colagenolítica del músculo de éste calamar japonés, ésta enzima hidroliza al colágeno del músculo. El colágeno es el componente mayoritario de la matriz extracelular, y se detectó que la actividad de la enzima cisteína proteasa colagenolítica aumenta en el período del rápido crecimiento del calamar, y que las metaloproteasas juegan un papel importante en la degradación del colágeno para su remodelación durante el rápido crecimiento de estos organismo.

La cisteína proteasa colagenolítica junto con catepsinas B, L y K forman parte en la degradación del colágeno y pueden degradar las fibras de colágeno a pH ácido (Kafienanh *et al.*, 1998; Maciewicz *et al.*, 1988).

En investigaciones realizada en *Todarodes pacificus* se encontró actividad enzimática de proteasas aspárticas (catepsina D) intracelulares en hepatopáncreas del organismo. La catepsina D fue purificada y nombrada: todarepsina (Komai *et al.*, 2004). También se ha logrado purificar del hepatopáncreas de este calamar una enzima carboxipeptidasa (Komai *et al.*, en 2007).

Estudios en *Todaropsis eblanae*

Estudios realizados a diferentes pH y temperatura revelaron actividad proteolítica, en el músculo de *Todaropsis eblanae*. Se determinó mediante la mayor inhibición por trans-epoxisuccinil-L leucin, amino-4-guanidin, butano (E-64) a pH ácido, que predominaron las proteasas lisosomales (catepsina B y L), y la actividad de metaloproteasas (Borderias *et al.*, 1999).

Estudios en *Dosidicus gigas*

El calamar gigante presenta un rápido crecimiento y puede llegar a su edad adulta en un año (Klett 1996). Tiene un sistema digestivo especializado que le permite procesar rápidamente su alimento (Seed 1983). En los cefalópodos el hepatopáncreas es un órgano que cumple con muchas funciones, en comparación con el páncreas e hígado de vertebrados, este órgano por lo tanto presenta una alta actividad proteolítica (Hatate *et al.*, 2000).

Estudios recientes, donde reportan la actividad de proteasas digestivas en el calamar, revelan la presencia de tripsina, quimotipsina, aminopeptidasa, y carboxipeptidasa; tanto en hepatopáncreas como en manto (Ezquerro-Brauer *et al.*, 2002). También hay reportes sobre la purificación de una fracción aminopeptidica del hepatopáncreas del calamar gigante (*Dosidicus gigas*), Osuna-Ruíz (2003). Cárdenas-López y Haard (2005), detectaron que la actividad proteolítica en el hepatopáncreas de calamar gigante, está principalmente determinada por cisteína proteasa, la presenta una alta estabilidad a pH ácido, además de presentar actividad en un amplio rango de pH.

A pesar de los trabajos antes mencionados la información de la enzimología del calamar gigante aún se considera escasa en comparación con las investigaciones realizadas en otras especies de calamar como *Illex illecebrosus*, *Illex argentinus*, *Todarodes pacificus*, y *loligo opalescens*; de los cuales su actividad enzimática se ha estudiado con relación a reacciones de temperatura, pH, potencial e hidrólisis del manto y hepatopáncreas (Leblanc y Gill 1982; Sakai *et al.* 1983; Raksakulthai *et al.* 1986; Sugiyama *et al.* 1989; Okamoto *et al.* 1993; Sukarno *et al.* 1995; Kawabata *et al.* 1996).

Aplicación Tecnológica de Proteasas Marinas

Las enzimas proteolíticas son ampliamente estudiadas ya que representan la mitad de las enzimas utilizadas en la industria. Las proteasas son utilizadas en detergentes, en cuero, en la industria de alimentos (Klomklao *et al.*, 2005), en farmacéutica y elaboración de cosméticos (Rao *et al.*, 1998). En la industria de alimentos las proteasas son utilizadas para la elaboración de cerveza, en la panadería, en vinos, en cereales, en leche, en hidrolizados de pescado y leguminosas. Normalmente

las enzimas utilizadas en la industria derivan de plantas, animales, microorganismos y recientemente de animales marinos. Sin embargo, el uso de las enzimas marinas, es aún, muy poco frecuente.

La utilización de subproductos de la captura de organismos marinos como fuentes de proteasas a bajos costos puede promover nuevas aplicaciones industriales (Simpson, 2000; Klomklao *et al.*, 2004), ya que las proteasas marinas son más activas a bajas temperaturas en comparación con proteasas de mamíferos y plantas (Simpson y Haard, 1987; Simpson 2000). De esta manera, los procesos a bajas temperaturas se ven beneficiados, manteniendo la protección del sustrato o productos de degradación térmica y/o desnaturalización (Haard, 1992), un claro ejemplo es el uso de pepsina en la cuajada de la leche, ya que la pepsina muestra una alta actividad a bajas temperaturas (Brewer *et al.*, 1984). Las proteasas alcalinas presentan una mayor actividad y estabilidad a temperaturas de 50 a 60⁰C, a altos pH, a la presencia surfactantes o agentes oxidantes (Klomklao *et al.*, 2005).

Por otra parte, se puede obtener el complejo carotenoproteinas, así como, la recuperación del 80% de astaxantina de los desechos obtenidos del proceso de camarón, mediante la utilización de tripsina de bacalao del Atlántico en conjunto con el agente quelante EDTA (Cano-López *et al.* 1987). Klomklao *et al.*, (2007) al utilizar tripsina en desechos de camarón tigre obtuvieron carotenoides. El uso de pepsina también ha tenido resultados en la extracción de colágeno. Nagai *et al.*, (2002) reportaron que la solubilidad de colágeno en pepsina fue mayor (44.7%) en comparación con la solubilidad de colágeno en ácido (10.7%). En piel de carpa (*Ctenopharyngodon idella*)

se obtuvo un rendimiento del 35% de colágeno solubilizado en pepsina (Zhang *et al.*, 2007). Nalinanon *et al.* (2007) estudiaron el uso de pepsina de peces y encontraron que la pepsina ayuda a aumentar el rendimiento en la extracción de colágeno.

En estudios realizados sobre proteasas del hepatopáncreas de calamar, se ha encontrado que presentan un uso potencial en la industria de alimentos, como por ejemplo en la elaboración de queso y cerveza (Gildberg, 1988; Kolodziejska *et al.*, 1994; Raksakulthai, 2001), preparación de salsa de pescado (Raksakulthai *et al.* 1986), y en la fermentación de salmuera de calamar para mejorar el sabor (Wei *et al.*, 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

Para el desarrollo de esta investigación se capturó calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el suroeste de las aguas de Bahía de Kino con coordenadas: 28°40' 107 N, 112° 19' 383 W. La captura del calamar fue en período otoño e invierno del 2007-2008. Los calamares capturados fueron eviscerados en la embarcación para tomar el hepatopáncreas, el cual fue colocado en una cama de hielo, manteniendo las mejores condiciones posibles de temperatura (0°C), para poder ser transportado a Hermosillo, una vez que se llegó al laboratorio de productos marinos (DIPA UNISON), se almacenó a -80°C para después liofilizar al hepatopáncreas, consiguiendo con esto una mayor estabilidad enzimática, después de haber sido liofilizado, el hepatopáncreas fue almacenado a -80°C hasta su utilización.

Preparación del Extracto Crudo

La purificación enzimática consta de una serie de procedimientos. Una vez que se ha obtenido el extracto enzimático se deben de establecer objetivos como obtener enzimas con un grado de pureza, de calidad, como el de mantener la actividad biológica y la economía expresada en tiempo y dinero. El obtener un alto rendimiento suele ser un objetivo clave, pero puede ser menos crucial en los casos donde la muestra es fácilmente disponible o cuando solamente se requiere una pequeña cantidad de producto (Amersham Biosciences, 2001).

Una de las principales etapas de purificación es la obtención de los extractos enzimáticos, para esta fase se hizo una suspensión 1:7 (w/v) de hepatopáncreas y buffer de ensayo (acetato 20 mM con 60 mM de NaCl pH 5.5), posteriormente se agitó por 2 h a 4⁰C. Después de transcurrido el tiempo de agitación se centrifugó a 10,000 rpm a 4⁰C. Se centrifugó el sobrenadante para ser filtrado con papel Whatman No. 1 y posteriormente con papel Whitman No 42, cuando fue pasado por los dos filtros se obtuvo el extracto de hepatopáncreas de calamar gigante (EHC).

Aislamiento de la(s) Enzima(s) Aspártica(s)

Se diseñó un protocolo de aislamiento utilizando precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de exclusión molecular, el cual se describe a continuación.

Precipitación con Sulfato de Amonio

El EHC fue fraccionado con diferentes grados de saturación con sulfato de amonio a 4⁰C. Se emplearon grados de saturación del 0-30%, 30-70% y >70% (Komai, 2004). La fracción del extracto crudo tratado con sulfato de amonio a un 30% de saturación durante 2 h en agitación a 4⁰C, después fue centrifugada a 10,000 rpm a 4⁰C por 30 min. El residuo obtenido fue resuspendido en 10 ml de buffer de ensayo (acetato de sodio 20 mM con 60 mM de NaCl pH 5.5). El sobrenadante fue recuperado y la concentración de sulfato de amonio se ajustó hasta 70%. Después de dejar agitando por 2 h a 0⁰C, la mezcla se centrifugó y se trató de igual forma como en el paso inicial de precipitación. El precipitado fue recuperado y disuelto en 16 ml de buffer de ensayo. A cada una de las fracciones proteicas obtenidas se les determinó su concentración de

proteína y actividad proteolítica. La fracción que presentó la mayor actividad proteolítica fue utilizada en las subsecuentes etapas de purificación.

Diálisis. Con el objeto de remover el exceso de sulfato de amonio de las fracciones obtenidas por precipitación fraccionada por sulfato de amonio (0-30%, 30-70% y >70%), los volúmenes iniciales fueron de 10 ml, 16 ml y 53 ml, respectivamente, fueron dializados contra el buffer de ensayo (acetato de sodio 20 mM con 60 mM de NaCl pH 5.5), empleando una membrana de diálisis de 6,000 Daltones de corte molecular. La diálisis se realizó durante 12 h, con 2 cambios de buffer de ensayo a 4°C. A cada una de las fracciones dializadas se les determinó su concentración de proteína y actividad proteolítica utilizando las mismas técnicas mencionadas anteriormente.

Determinaciones Analíticas

Concentración de Proteína en Solución

La cuantificación de proteína durante el proceso de aislamiento de proteasas aspárticas se determinó de acuerdo al método de Bradford (1976). Este método se basa en un cambio de color del colorante azul de Coomassie G-250 al unirse a las proteínas. Este colorante se une vía interacción electrostática a residuos de arginina, histidina, lisina, tirosina, triptófano y fenilalanina. Este método tiene una sensibilidad hasta de 1 µg de proteína y presenta una baja interferencia ante la presencia de agentes químicos. El procedimiento de determinación de proteína consistió en combinar alícuotas de 50 µl de solución proteica con 1 ml de reactivo comercial de Bradford. Se dejó reposar por 15 min antes de tomar la lectura de absorbancia a 595 nm. Se utilizó como curva estándar

albúmina de suero bovino (1 mg/ml y 0.1 mg/ml, dependiendo de la concentración de la muestra), los ensayos fueron hechos por duplicado.

Ensayo de Actividad Enzimática con Hemoglobina

La actividad de proteasas aspárticas se obtuvo mediante el método Anson (1938) y modificado por Celis-Guerrero *et al.* (2004) utilizando como sustrato una solución de 0.5% (w/v) hemoglobina bovino desnaturalizada por ácido. El sustrato fue preparado disolviendo 0.5 g de hemoglobina en 50 ml de HCl 0.06 M, esta solución fue puesta en una membrana de corte de de 6-8 kDa. Para después ser dializada contra 4 L de HCl 60 mM con dos cambios de buffer en 20 h, después se hizo un nuevo cambio de en buffer HCl 1 mM pH 3.5 con dos cambios de buffer en 24 h, posteriormente se ajustó a un volumen de 100 ml con agua deionizada y a un pH de 3.5 y se hicieron alícuotas de 45 ml para ser almacenadas a -40°C . Se tomaron 666 μl de sustrato los cuales fueron mezclado con 30 μl de ECHC y se incubó por 10 min a 25°C y la reacción fue detenida con 333 μl de ácido tricloroacético (TCA) al 25% frío. Cuando se detuvo la reacción de la mezcla se colocó en hielo por 10 min. El sustrato indigerido precipitado fue separado centrifugando por 5 min a 10,000 rpm. El blanco o control consistió en agregar TCA antes de ser agregado el sustrato. Se definió arbitrariamente una unidad de actividad (U) como 0.01 de Abs 280 nm por ml por min. Los volúmenes tanto de sustrato como de TCA al 25% fueron modificados para ajustar los volúmenes originales del método Anson (1938) y modificado por Celis-Guerrero *et al.* (2004), y los ensayos fueron realizados por duplicado.

Electroforesis en Gel de SDS-Poliacrilamida

El análisis electroforético para la determinación de peso molecular de la proteasa aspártica se obtuvo en base al método descrito por Laemmli (1970), usando un equipo MINIPROTEAN III (Bio Rad Laboratories Chemical, St. Louis MO).

Los extractos enzimáticos fueron diluidos en una relación 1:1 con la solución amortiguadora (Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, glicerol, 10% SDS, 0.5% de azul de bromofenol). El gel superior o concentrador fue al 4% y el gel separador o inferior fue al 12%. Los marcadores utilizados fueron de bajo peso molecular: seroalbumina 66 kDa, ovoalbumina 45 kDa, deshidrogenasa 36kDa, anhidrasa carbónica 29kDa, tripsinogeno 20kDa, inhibidor de tripsina 14kDa, α -lactoalbúmina 14.2kDa y aprotinina 6.5kDa. La corrida electroforética duró aproximadamente de 1 a 3 h y fue corrida a 60 voltios por gel. Transcurrido el tiempo de corrida, los geles se tiñeron con nitrato de plata (Blum *et al.*, 1987). Es una tinción rutinaria de geles de proteínas por su facilidad de uso y su gran sensibilidad (entre 100 y 1000 veces más sensible que la tinción con Azul de Coomassie). El límite de detección es de 1-10 ng/banda proteína. Este método requiere trabajar con agua y reactivos de alta pureza para evitar que el gel adquiriera un tono pardo. Todos los métodos de tinción con plata conllevan la reducción de iones plata a su forma metálica, pero no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual se tiñen las proteínas con la plata. Tras fijarse el gel en ácido acético/etanol se tiñe con una solución 0,1% de nitrato de plata. El gel se conserva indefinidamente tras ser secado.

Zimograma de las Fracciones con Inhibidores Específicos

Con el objetivo de determinar y corroborar visualmente la actividad de proteasas aspárticas, se hizo un análisis de la composición de proteasas, el análisis se llevó a cabo en base al método descrito por Díaz-López (1998), usando un equipo MINIPROTEAN III (Bio Rad Laboratories Chemical, St. Louis MO). Se realizó mediante una mezcla de inhibidor-ECHC en una relación de 1:1, posteriormente fueron diluidos sin tratamiento térmico, el complejo inhibidor-ECHC en una relación 1:1 con buffer de muestra (sin beta-mercaptoetanol) (Tabla 3).

La posición del electrodo fue invertido y todos los ensayos fueron realizados utilizando un voltaje de 100 V por gel con amperaje variable. El gel concentrador o superior fue de 4% y el gel separador o inferior fue al 12%. Se inyectaron 90 μ l de muestra. Los inhibidores utilizados fueron; ITS inhibidor de tripsina de soya (inhibidor de serina proteasa), E-64 L-trans-epoxisuccinilleucilamida-(4-guanido)-butano (inhibidor de cisteína proteasa) 10 μ M, EDTA ácido etilendiaminotetracético (inhibidor de metaloproteasas) 1 mM y Pepstatina (inhibidor de proteasas aspárticas) 100 μ M. Transcurrido el tiempo de corrida, los geles se tiñeron con la solución de azul de Coomassie R-250 al 0.5%, dejándose durante toda la noche para después ser lavados con solución desteñidora (metanol, ácido acético y agua deionizada). Los geles fueron colocados en una solución conservadora a base de glicerol y se mantuvieron a 25⁰C.

Tabla 3. Condiciones necesarias para realizar una electroforesis ácida.

| | Condiciones ácidas |
|---|--|
| Gel concentrador o superior Acrilamida-bisacrilamida (30:5) | 0.127 M de ácido acético, KOH 0.12 pH 6.8 |
| Gel de separación o inferior Acrilamida-bisacrilamida (30:5) | 0.376 M de ácido acético, KOH 0.06 pH 4.3 |
| Buffer del electrodo | 0.14 M de ácido acético, 0.35 M de glicina |
| Buffer muestra (dilución 1:1 con la muestra) | 0.127 M de ácido acético, KOH 0.12 pH 6.8. 20% de glicerol y 0.02% de azul de metileno |
| Tiempo de corrida | 3-4 h |

Fuente: Díaz-López *et al.*, 1998.

Los geles fueron analizados utilizando un analizador de imágenes marca Bio Rad Gel Doc XR 170-8170 con el software Quantity One Version 4.5.2 1-D Bio Rad (Hercules, California), este se utilizó como una herramienta para obtener resultados de peso molecular más objetivos de los perfiles electroforéticos ya que el analizador de imágenes proporciona la densidad óptica de las bandas de interés.

Cromatografía de Filtración en Gel

La cromatografía de filtración en gel se utiliza para una separación basada en peso molecular. En la cromatografía de filtración en gel se eluyen primero las proteínas de mayor tamaño, seguidas por las proteínas de menor tamaño. Se utilizó una matriz de Bio gel P-100 grueso y la columna fue previamente equilibrada con el buffer acetato 20 mM pH 5.5 con 60 mM NaCl. Primeramente el buffer fue preparado con agua deionizada y la solución fue desgasificada utilizando un bomba de vacío. En esta separación cromatográfica se utilizó una columna de 104 cm de altura y 0.64 cm de diámetro. La enzima fue eluida con el mismo buffer (Komai *et al.* 2004). Se monitoreó la concentración de proteína mediante la absorbancia a 280 nm durante todo el proceso de purificación, así como la actividad proteolítica utilizando el ensayo con hemoglobina descrito anteriormente.

Caracterización Parcial de Proteasas Aspárticas

Efecto de la Temperatura en la Actividad Proteolítica

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad de las proteasas aspárticas se hizo una mezcla de las fracciones obtenidas de la corrida cromatográfica de

exclusión molecular en las que se detectó actividad aspártica, la cual se le denominó como PII. La acción de la temperatura sobre las fracciones fue determinada probando las siguientes temperaturas 5, 15, 25, 30, 37, 40, 50, 60 y 70°C. Se hizo el ensayo similar a la determinación de la actividad enzimática descrito anteriormente en la metodología haciendo uso de la hemoglobina como sustrato. La corrida fue hecha a un pH 3.5, usando como sistema HCl 1 mM pH 3.5.

Efecto del pH en la Actividad Proteolítica

El comportamiento de la enzima en función del pH de las fracciones con actividad proteolítica obtenidas de la cromatografía de filtración en gel (Bio-gel p-100 grueso), se hizo mediante un ensayo enzimático a los valores de pH en un rango de 2 a 6, por 10 min, seleccionándose como temperatura fija los 60°C. El pH a diferentes rangos fue obtenido a partir del sustrato (hemoglobina). La hemoglobina se encontraba en buffer de HCl 1 mM pH 3.5, este valor de pH se ajustó a los diferentes rangos requeridos utilizando HCl o NaOH dependiendo del caso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Peso y Talla del Calamar y Hepatopáncreas

La realización de este estudio consistió en la evaluación enzimática de una especie importante en la región, la cual es el calamar gigante. Este organismo fue capturado en Bahía de Kino en un área cercana a la isla Dátil, hacia el suroeste en el periodo de otoño-invierno. Los calamares capturados mostraron una longitud total entre 1.06 a 1.14 m, y una longitud del manto de 63 a 68 cm, lo cual indica que se trabajó con organismo adultos. Organismos con tallas similares fueron analizados en otros estudios (Ezquerria-Brauer *et al.*, 2002; Cardenas-Lopez y Haard, 2005). El calamar gigante se caracteriza por crecer rápidamente, por lo que su vida media oscila entre los 14 y 19 meses (Klett, 1996). Los organismos capturados mostraron un peso entre los 8.0 y 10.5 kg y de 0.306 ± 0.043 kg de hepatopáncreas, el cual representa un 3.3% del organismo total. Cardenas-Lopez y Haard (2005) reportaron que calamares con un peso entre 4.10 a 18.18 kg presentaban un hepatopáncreas con un peso de 0.1 a 0.9 kg, representando el 2.8 % del peso total del organismo; Ezquerria-Brauer *et al.*, (2002), trabajando con calamares entre los 6.04 ± 1.1 kg, observaron que estos presentaban un hepatopáncreas con un peso de 0.278 ± 0.020 kg, constituyendo el 4.6% del peso total del organismo. Lo cual sugiere, que al trabajar con organismos de mayor peso, se obtendrían menores volúmenes (en peso) de hepatopáncreas.

Determinación de Actividad en ECHC

El ECHC con un volumen total de 50 mL presentó una actividad total 212.5 U que corresponde a una actividad específica de 0.9 U/mg de proteína a un pH de 3.5. En estudios realizados en calamar gigante y en otras especies de calamar se ha detectado también actividad proteolítica a pH ácidos, pero con valores diferentes. En el calamar gigante se detectó una actividad de proteasas totales de 14.8 U/g a pH 4 (Hatate, *et al.*, 2000), mientras que en calamar japonés la actividad fue menor, 0.5 U/g (Komai *et al.*, 2004). Como se está trabajando con extracto crudo, el contenido de proteína es un factor determinante en las unidades reportadas, a lo cual puede atribuirse las diferencias detectadas. El hepatopáncreas del calamar gigante presentó una concentración de proteína de 4.72 mg/ml, mayor que la que se ha reportado para el calamar japonés, 4.6 mg/ml (Komai *et al.*, 2004).

La actividad proteolítica detectada puede atribuirse a la presencia de varias enzimas existentes en el hepatopáncreas del calamar gigante, tales como tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidasas, aminopeptidasas, en las cuáles se detectó que presentaban actividad en un rango de pH de 5 a 9 (Ezquerro-Brauer *et al.*, 2002; Osuna-Ruiz 2003), asimismo en un ensayo de autólisis, se presentaron dos picos de máxima proteólisis, pH 3 y 5 (Cardenas-Lopez y Haard, 2005). Sin embargo, por el pH con el cual se trabajó en este estudio, la mayor actividad se puede atribuir a enzimas aspárticas.

Purificación de Proteasas Aspárticas Presentes en el ECHC

Precipitación Fraccionada con Sulfato de Amonio

Se obtuvieron 3 fracciones proteicas a partir de la precipitación con sulfato de amonio, estas fracciones fueron en los rangos de 0-30% y 30-70% de saturación y el sobrenadante residual de la proteína precipitada de esta última fracción. Para continuar con los pasos de purificación descritos en la metodología se tomaron las fracciones antes mencionadas y se procedió a realizar un ensayo de actividad enzimática, utilizando como sustrato la hemoglobina. Después de haber determinado la actividad en las fracciones, se observó que el mayor rendimiento de la actividad se presentaba en la fracción que precipitó en la fracción de 30-70% de saturación. Esta fracción representó el 81% del rendimiento total como se muestra en la figura 5. Para continuar con el aislamiento y purificación enzimática fue tomada la fracción en el rango de 30-70% de saturación donde se logró alcanzar un grado de purificación de 1.66 X y un rendimiento del 87%. Por otra parte, en la fracción del rangos de 0-30% de saturación mostró tan solo el 1% del rendimiento total, mientras que la fracción en la fracción del rango de >70% de saturación mostró el 18%. Sin embargo al determinar la actividad específica por medio del análisis de actividad y concentración proteica se observó que la mayor actividad específica está concentrada en los rangos de 0-30% y >70% de saturación (Figura 6), la alta actividad específica mostrada por estas fracciones se debe a que la proteína se encuentra muy diluida, y puede influir al momento de obtener valores de

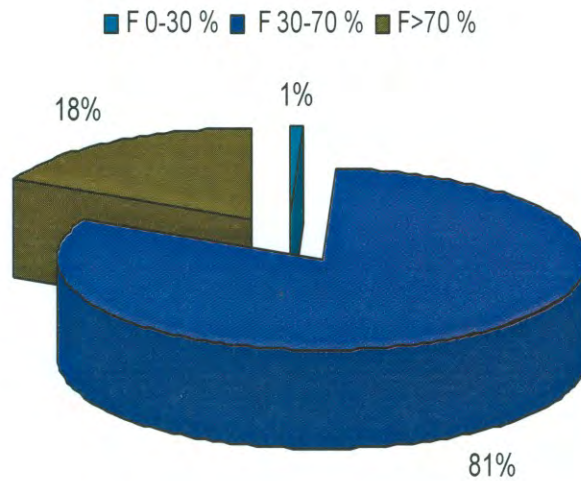


Figura 5. Rendimiento de la actividad enzimática encontrada en el extracto crudo del hepatopáncreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*), después de ser precipitado con sulfato de amonio; FI (0-30%), FII (30-70%) y FIII (> 70).

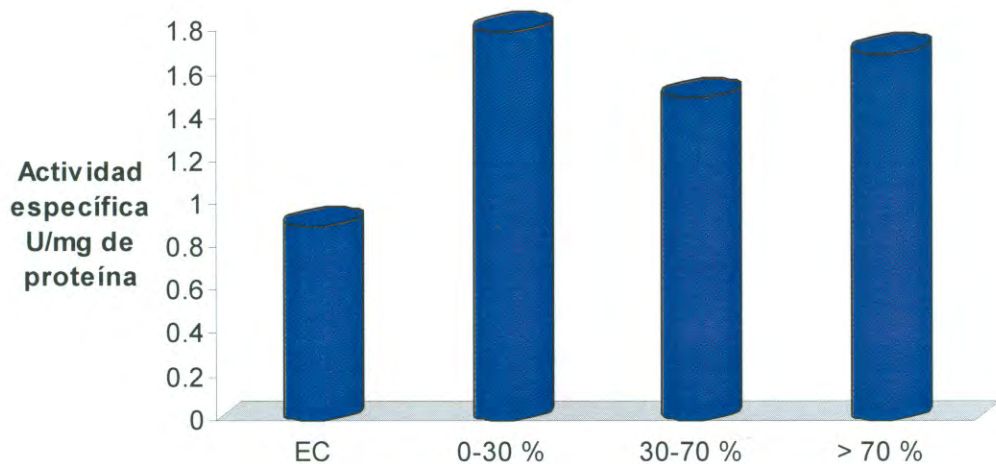


Figura 6. Actividad específica de las fracciones obtenidas de precipitación con sulfato de amonio del extracto crudo del hepatopáncreas de calamar; EC (extracto crudo), fracción de 0-30% de saturación, fracción de 30-70% de saturación y fracción de > 70% de saturación

actividad específica, como también se puede observar en la figura 5 que estas fracciones fueron las que presentaron menor rendimiento.

Valores similares fueron reportados en el estudio realizado en calamar japonés (*Todarodes pacificus*), durante la purificación de catepsina D, donde se reportó que usando sulfato de amonio del 30-70% de saturación precipitaban las proteasas aspárticas, al purificar la enzima, fue identificada como catepsina D (Komai *et al.*, 2004).

Ensayos de Inhibición

Con el objeto de conocer la actividad proteolítica contenida en la fracción 30-70% de saturación con sulfato de amonio, se analizó la inhibición de la actividad enzimática, para lo cual se utilizaron inhibidores específicos para proteasas (Tabla 4), en la figura 7, se observa que el inhibidor de tripsina de soya redujo la actividad en un 45.4%, el L-trans-epoxisuccinilleucilamida-(4-guanido)-butano (E-64) sólo el 12.1% y el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) tan sólo el 1%, siendo la pepstatina el inhibidor más efectivo, ya que se detectó un decremento del 66.7% de actividad, lo cual está sugiriendo que la mayor actividad proteolítica se debe a proteasas aspárticas, ya que se sabe que la pepstatina es un inhibidor específico para éstas (Aoyagi *et al.*, 1972; Knight y Barrett, 1976).

Por otra parte, para tener una respuesta visual sobre la inhibición de la actividad proteolítica se realizó un análisis zimográfico en electroforesis ácida (Figura 8). Al analizar los zimogramas se apreció que la muestra que previamente fue incubada

Tabla 4. Inhibidores específicos para serina proteasas, cisteína proteasas, metaloproteasas y proteasas aspárticas.

| Inhibidores | Concentración |
|--|---------------|
| ITS [≈] (inhibidor de tripsina de soya) | 20 mg/ml |
| E-64 ^ε (L-transepoxisuccinilleucilamida-(4-guanido)-butano) | 10 μM |
| EDTA [£] (ácido etilendiaminotetracético) | 1 μM |
| Pepstatina ^α | 100 μM |

≈ Inhibidor de serina proteasas

ε Inhibidor de cisteína proteasas

£ Inhibidor de metaloproteasas

α Inhibidor de proteasas aspárticas

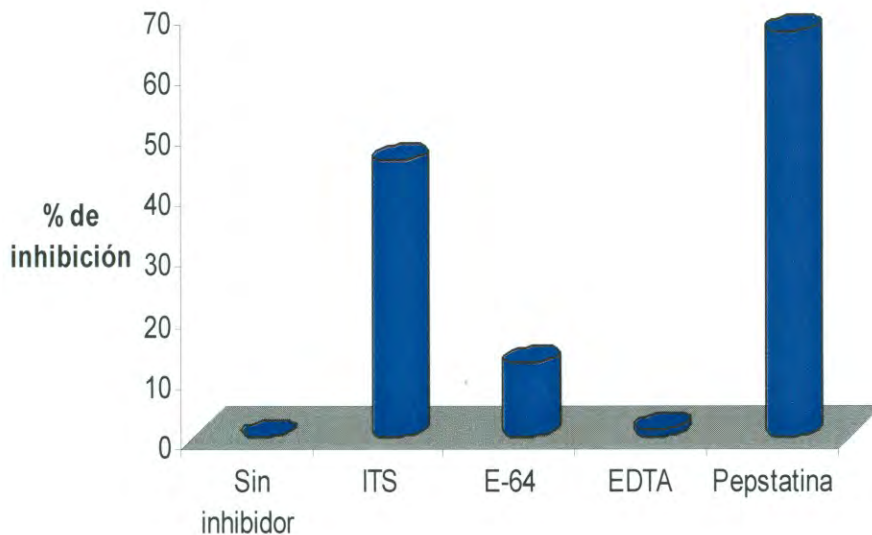
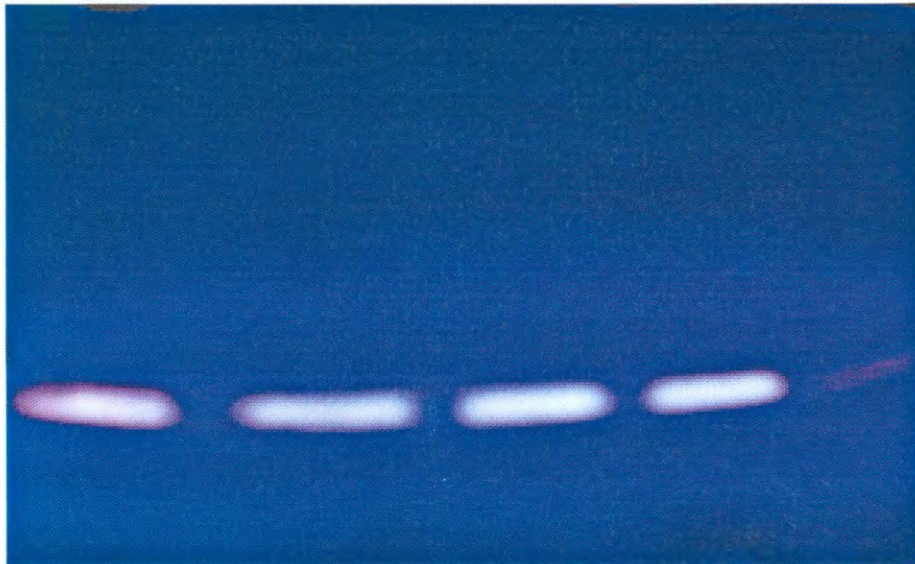


Figura 7. Determinación del porcentaje de inhibición de la FII precipitada con sulfato de amonio del extracto crudo del hepatopáncreas de calamar, utilizando inhibidores específicos; ITS 20 mg/ml (inhibidor de tripsina de soya), E-64 10 μ M (inhibidor de cisteína proteasas), EDTA 1 mM (inhibidor de metaloproteasas), pepstatina 100 μ M (inhibidor de proteasa aspárticas). En todos los casos se hizo una relación de 1:1 FII e inhibidor.



A **B** **C** **D** **E**

Figura 8. Detección de bandas de actividad proteolítica por zimografía de la FII del extracto crudo del hepatopáncreas de calamar; A) FII, B) ITS 20mg/ml (inhibidor de serinas proteasas), C) E-64 10 μ M (inhibidor de cisteína proteasas), D) EDTA 1mM (inhibidor de metaloproteasas), y E) pepstatina 100 μ M (inhibidor de proteasas aspárticas). En todos los casos se hizo una relación de 1:1 fracción e inhibidor.

con pepstatina no presentaba actividad en gel (Figura 8, línea E), lo cual confirma que la mayor actividad proteolítica presente en la fracción 30-70% obtenida del hepatopáncreas del calamar gigante se debe a proteasas aspárticas.

Resultados similares se han detectado en las proteasas aspárticas presentes en otras especies de calamar y pescados. Sakai-Suzuki *et al.*, (1983) observaron que la catepsina D-libre presente en el manto de calamar se inhibía completamente ante la presencia de pepstatina, Kolodziejska *et al.* (1994) detectaron que la actividad del extracto enzimático de hepatopáncreas de *Illex argentinus* se redujo en un 90%, Komai *et al.*, (2004) reportan una total pérdida de actividad en la catepsina D purificada de calamar japonés (*Todarodes pacificus*); Waing *et al.*, (2007) trabajando con proteasas aspárticas presentes en el músculo de salmón, la actividad también se inhibió ante la presencia de la pepstatina, finalmente, Liu *et al.* (2008) reportan el mismo resultado en las proteasas aspárticas presentes en el intestino de carpa.

Partiendo de la fracción 30-70% de saturación con sulfato de amonio, en la cual se confirmó la presencia de proteasas aspárticas, se procedió a un segundo paso de purificación con el objetivo de eliminar otras proteínas y obtener un mayor grado de purificación de las proteasas aspárticas.

Cromatografía de Filtración en Gel (Bio gel p-100 grueso)

Para esta fase se partió de 2 ml de la fracción 30-70% la cual presentaba una concentración de proteína de 11.6 mg, los cuáles fueron inyectados a la columna cromatográfica de exclusión molecular que tenía como soporte un Bio gel p-100 grueso.

Al llevar a cabo la elución, utilizando acetato de sodio 20 mM con NaCl 60 mM a pH 3.5, y recolección de las fracciones obtenidas en la cromatografía, se pudo observar en el cromatograma que se muestra en la figura 9, la existencia de un pico máximo de actividad, así como también otros dos picos con un menor grado de detección, estas fracciones que presentaron la mayor actividad se les denominó como pico I [PI], pico II [PII] y pico III [PIII] conforme fueron apareciendo. Para los posteriores análisis se tomaron únicamente las fracciones en cada pico que mostraron un máximo de actividad utilizando hemoglobina como sustrato, siendo éstas las fracciones # 23 para el PI, # 31 para el PII y # 35 para el PIII. En el ensayo de actividad enzimática se obtuvo que en PI presentaba 0.11 U de actividad, sin embargo PII fue la fracción donde se encuentra principalmente concentrada la actividad con 1.43 U, en el pico III se obtuvieron 0.29 U. Con el objetivo de determinar la actividad de una forma visual se tomaron las fracciones antes señaladas para realizar su detección por medio de electroforesis ácida (Figura 9, parte superior).

En el zimograma obtenido se observa que sólo la fracción PII es en la que se detecta actividad proteolítica. Sin embargo el que no se haya detectado actividad en las fracciones PI y PIII en los zimogramas se atribuye a que la actividad de estas fracciones se encuentra muy por debajo de la fracción PII. Para corroborar que la actividad expresada en la fracción PII corresponde a la familia de las proteasas aspárticas, la enzima se incubó con inhibidores específicos previamente al desarrollo de la electroforesis, tal como se mencionó en el apartado de materiales y métodos (Figura 10).

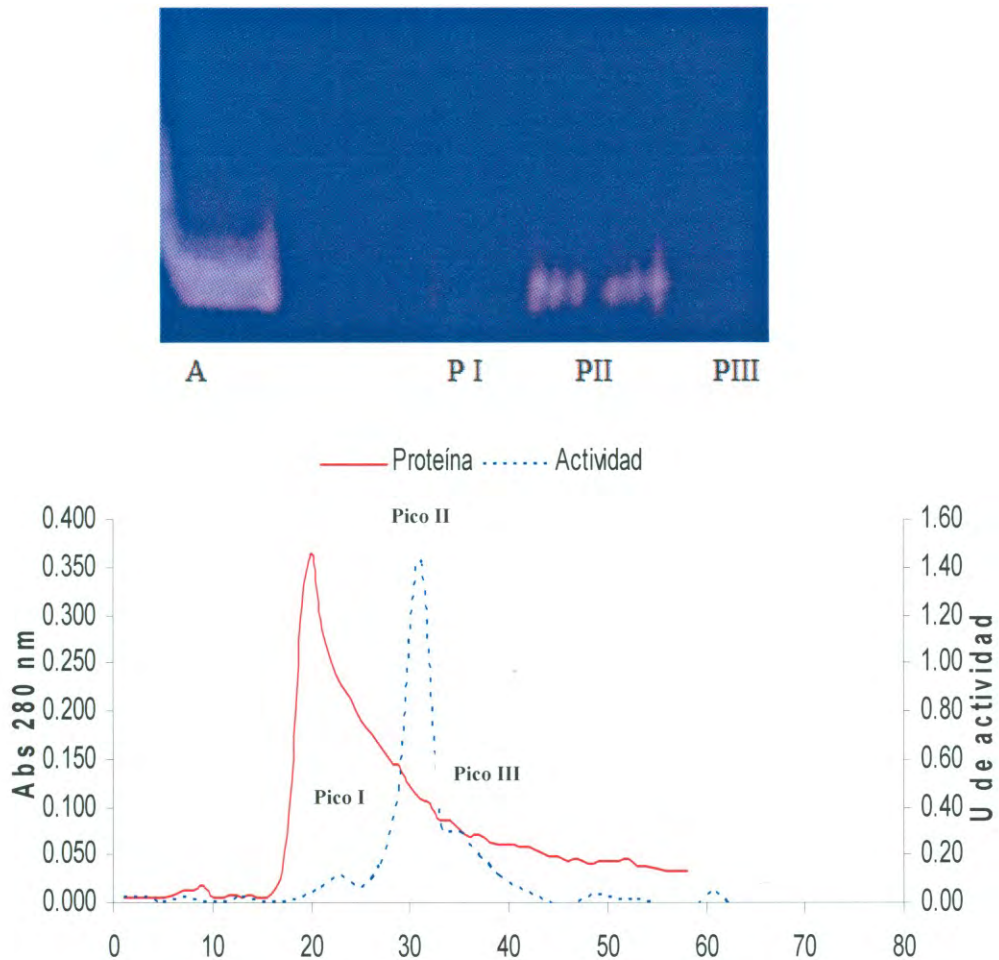


Figura 9. Cromatograma de actividad de la FII de saturación con sulfato de amonio obtenida del extracto crudo del hepatopáncreas de calmar gigante. Elución con acetato de sodio 20 mM y con 60 mM NaCl. Donde las fracciones con actividad proteolítica: pico I (PI), pico II(PII) y pico III (PIII), fueron tomados, y se hizo un zimograma de actividad por electroforesis ácida (gel superior).

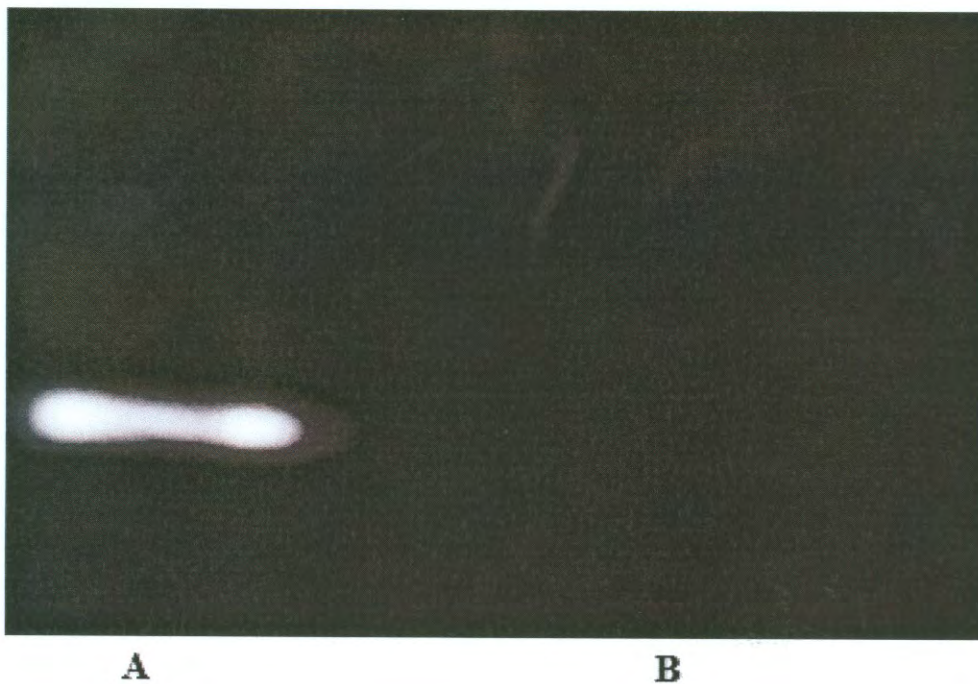


Figura10. Inhibición en zimograma de la fracción # 31 obtenida de la cromatografía de exclusión molecular (Bio gel p-100 grueso), se partió de la inyección de la FII saturación con sulfato de amonio obtenida del extracto crudo del hepatopáncreas de calamar gigante. Utilizando como inhibidor pepstatina 100 μM . donde A) fracción # 31 sin pepstatina.

En la figura 10 (línea B) se aprecia, que cuando se incubó la fracción PII con la pepstatina, no se detectó actividad en gel, es decir la enzima fue inhibida por este inhibidor específico para proteasas aspárticas, esto indica que existe la presencia de proteasas aspárticas y que esta familia de enzimas es la predominante.

Se sabe que las proteasas aspárticas maduras están formadas aproximadamente de una cadena de 300 a 350 aminoácidos, por lo tanto su peso molecular se encuentra en un rango de los 30kDa a los 40kDa, y esto depende del grado de glucosilación (Fusek *et al.*, 1995), por lo que al evaluar los pesos moleculares de la fracciones obtenidas después de la electroforesis de la PII (Figura 11), donde se detectaron cuatro bandas, con pesos moleculares entre 18.1 y 51 kDa, la fracción con peso de 36.31 kDa coincide con la catepsina D que se ha encontrado en otras especies de animales marinos. Una catepsina D purificada e identificada del hepatopáncreas de calamar japonés (*Todarodes pacificus*), presentaba un peso molecular de 36 kDa, la cual fue bautizada como “todarepsina”. (Komai *et al.*, 2007). Gildberg A. (1987) reportó en el calamar *Todarodes sagittatus* a esta misma proteasa aspártica (catepsina D) con un peso molecular de 38 kDa. Doke (1979) al estudiar el músculo esquelético de Tilapia mozambica (*Oreochromis mossambicus*) detectó actividad de la proteasa aspártica con un peso molecular de 38 kDa. En el músculo de cangrejo, la catepsina D purificada presentó una masa molecular de 41 kDa (Makinoda 1980). Waing *et al.*, (2007), al estudiar el hígado de bacalao aislaron y caracterizaron catepsina D con una masa molecular de 40 kDa, a diferencia de la proteasa aislada del intestinos de carpa donde presentó un peso

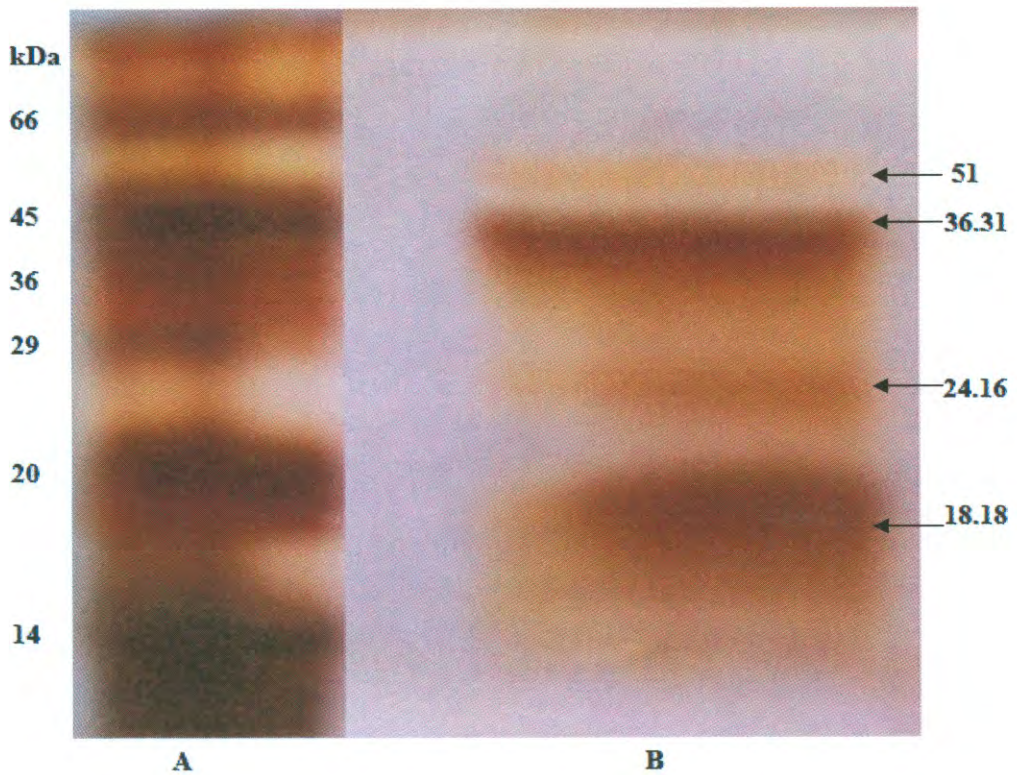


Figura 11. Detección del peso molecular de la fracción # 31 obtenida en la cromatografía de filtración Bio gel p-100 grueso, donde se partió de la inyección de la fracción de 30-70% saturación con sulfato de amonio obtenida del extracto crudo del hepatopáncreas de calamar gigante, donde A) marcadores de bajo peso molecular y B) es la fracción # 31 del pico II obtenido de la corrida cromatográfica.

molecular de 28.5 kDa. Las diferencias detectadas en cuanto a los pesos moleculares entre especies y tejido evaluado, se atribuyen al hábitat, desarrollo fisiológico, así como al papel que cada tejido posee en el organismo.

Para los siguientes estudios, de las fracciones obtenidas después de la cromatografía, se obtuvo una mezcla que abarcó desde la fracción # 27 hasta la # 33. Por lo que primeramente se corroboró que se seguía trabajando con proteasas aspárticas, relacionadas con la Catepsina D. De la prueba de inhibición usando pepstatina se detectó que la actividad proteolítica fue totalmente inhibida (Figura 12). Esta inhibición fue confirmada al realizar las evaluaciones de actividad por un análisis zimográfico en electroforesis ácida (Figura 13), corroborándose así que en la mezcla se tenía mayoritariamente actividad aspártica. Sin embargo, al realizar la evaluación de los pesos moleculares, contrario a lo que se esperaba, sólo se detectó una sola banda con un peso molecular de 14.73 kDa (Figura 14). Debido a que no se estaba trabajando con una enzima pura, y que en esta fase se estaba ya trabajando con mezcla de fracción, además que ya se ha reportado que las proteasas son muy activas, y tienden a auto degradarse (Withaker, 1994), por lo que este comportamiento se atribuye a que hubo una auto-degradación de la enzima, y sólo se estén observando fragmentos de las proteínas degradadas con pesos moleculares muy cercanos, de ahí que sólo se observe una sola banda muy ancha. Sin embargo, se requerirían realizar otros estudios para corroborar lo anterior, como la evaluación de la actividad en relación al tiempo e ir cuantificando la proteína soluble durante dicha evaluación.

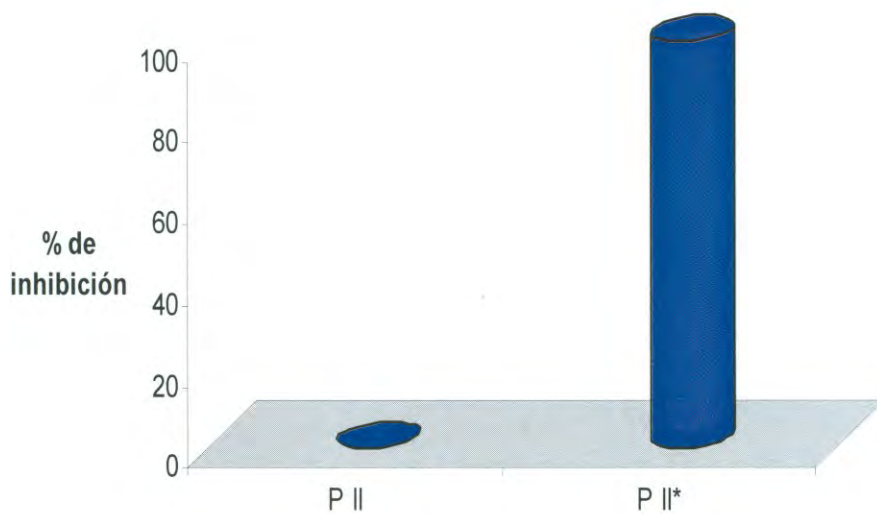


Figura 12. Determinación del por ciento de inhibición de las fracciones # 27 a la 33 (PII) obtenidas de la corrida cromatográfica, donde se partió de la inyección de la fracción 30-70% de saturación con sulfato de amonio obtenida del extracto crudo del hepatopáncreas de calamar gigante. El PII sin pepstatina y PII* con pepstatina (inhibidor de proteasas aspárticas).



30-70%

PII

PII*

Figura 13. Inhibición en zimograma de la fracciones # 27 a la 33 de PII obtenida de la cromatografía de exclusión molecular en Bio gel P-100. Utilizando como inhibidor pepstatina 100 μ M donde; carril No 1 (30-70 % de saturación con sulfato de amonio), pico II fracciones # 27 a la 33 y pico II* relación 1:1 fracciones # 27 a la 33 con pepstatina.

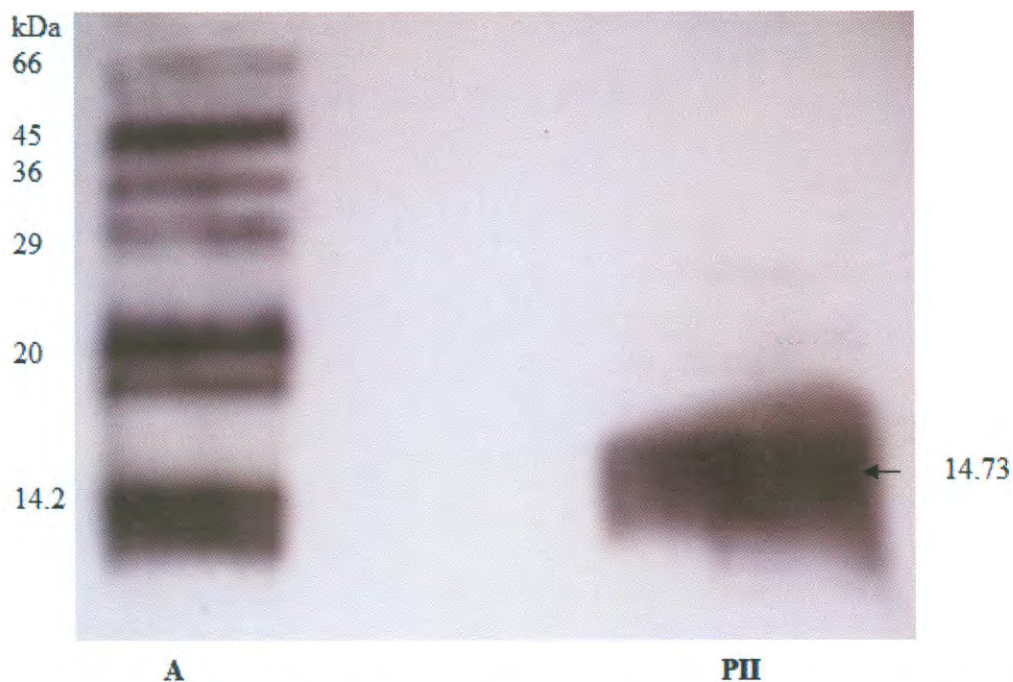


Figura 14. Detección del peso molecular de las fracciones # 27 a la 33 (PII) obtenidas del cromatograma de la exclusión molecular bio gel p-100 grueso de donde se partió de la inyección de la fracción de 30-70% de saturación obtenida del ECHC. A) marcadores de bajo peso molecular y (PII)fracciones # 27 a la 33.

Grado de Purificación

Los pasos de purificación de la actividad proteolítica, realizados en el ECHC, se muestran en la Tabla 5. En los procesos de purificación se experimenta normalmente la pérdida de proteína y actividad biológica. Se puede observar que del total de proteína extraída de un volumen de 50 ml del ECHC, solamente alrededor del 51% se obtuvo en la fracción proteica precipitada con sulfato de amonio en el rango de 30 a 70% de saturación. La cuantificación de la actividad proteolítica de esta fracción representó aproximadamente 87% del total de la actividad inicial detectada en el extracto crudo. La actividad específica y el factor de purificación se incrementaron 1.5 y 1.6 veces respectivamente. Se detectó que después de la precipitación con sulfato de amonio la actividad era de 1.5 U/gr, resultados similares fueron detectados por otros autores (Gildberg, 1987; Komai *et al.*, 2004). La sal de amonio lo que hace es favorecer la precipitación de la proteína por el efecto del “salting out” (Badui, 2006).

Posteriormente se detectó que la fracción # 31 obtenida de la cromatografía de exclusión molecular Bio gel p-100, representó sólo un 0.6% de la proteína total aplicada a la columna y un 0.3% de la proteína total presente en el ECHC, con un grado de purificación de 48 veces, un 14 % de rendimiento de recuperación de la actividad.

Tabla 5. Tabla de purificación del extracto crudo del hepatopáncreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

| Purificación | Volumen | Actividad (U) | Actividad total (U) | Proteína total mg | Actividad específica U/mg | Purificación X | Rendimiento % |
|---|---------|---------------|---------------------|-------------------|---------------------------|----------------|---------------|
| EC | 50 | 4,25 | 212,5 | 236 | 0,9 | 1 | 100 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ (30-70 %) y dializado | 21 | 8,9 | 186,9 | 121,8 | 1,5 | 1,66 | 87 |
| FG * fracción #31 | 21 | 1,43 | 30,06 | 0,7 | 43 | 48 | 14 |

* calculado a partir de una inyección de 2 ml de fracción precipitada con sulfato de amonio (30-70%)

Caracterización Parcial de las Proteasas Aspárticas Presentes en las Fracciones con Actividad

Actividad en Función de la Temperatura

En la figura 15, se observa el efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica de las proteasas aspárticas, detectándose un pico de máxima actividad a los 60°C. Kolodziejaska *et al.*, (1994) reportaron la presencia de proteasas del tipo aspártico, por medio de la inhibición enzimática de un extracto crudo, hepatopáncreas de calamar *Illex argentinus*, estos investigadores reportaron que la máxima actividad mostrada fue en un rango de temperatura entre 45 a 50°C. Estas diferencias pueden atribuirse a la especie, así como a la época de captura, ya que se ha reportado que la actividad proteolítica del hepatopáncreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) varió dependiendo de la época de captura, en noviembre obtuvieron una máxima actividad en un rango de temperatura de los 40 a los 70°C y en abril el pico máximo se obtuvo a los 70°C (Ezquerria-Brauer *et al.*, 2002). En otras especies marinas como en carpa, tilapia, y sardina el pico máximo de actividad detectado para este tipo de enzimas estuvo entre los 50°C a los 55°C (Makimoda *et al.*, 1980; Doke *et al.*, 1979; Gómez-Guillén y Batista 1997).

Actividad en Función del pH

En anteriores estudios las proteasas aspárticas se han definido de acuerdo a su óptimo pH de catálisis, que se encuentra entre 1.5 y 5 (Fusek *et al.*, 1995). En cuanto a la evaluación de pH, se decidió trabajar en aquella temperatura donde se detectó la máxima actividad, detectándose que la enzima presentó dos picos de máxima actividad en función del pH 4.5 y 5.5 (Figura 16).

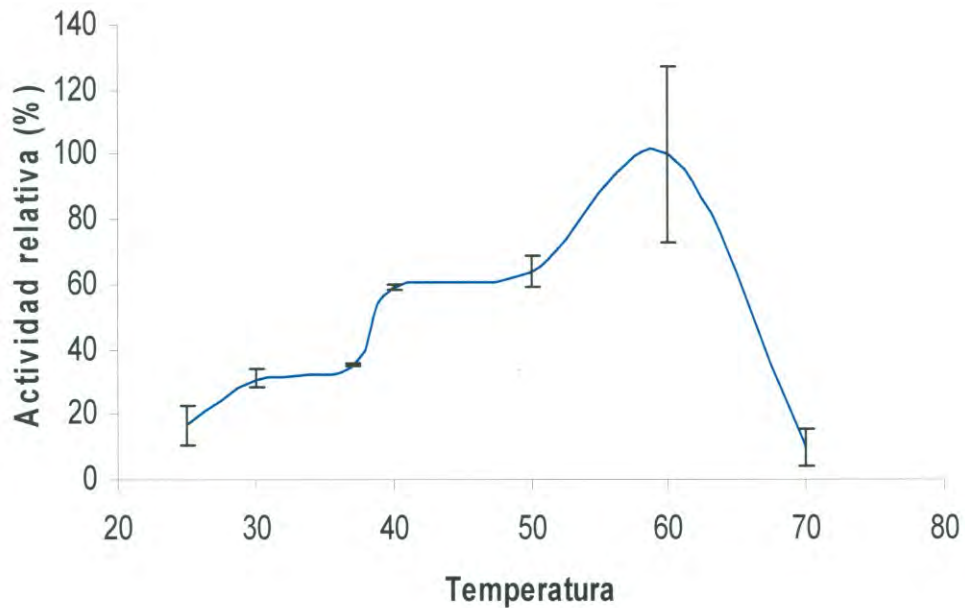


Figura 15. Detección de la temperatura óptima de las proteasas aspárticas obtenidas de la fracciones # 27 a la 33 (PII), de la cromatografía de filtración Bio gel p-100 grueso de donde se partió de la inyección de la fracción de 30-70% de saturación obtenida del ECHC. Se utilizó un pH 3.5.

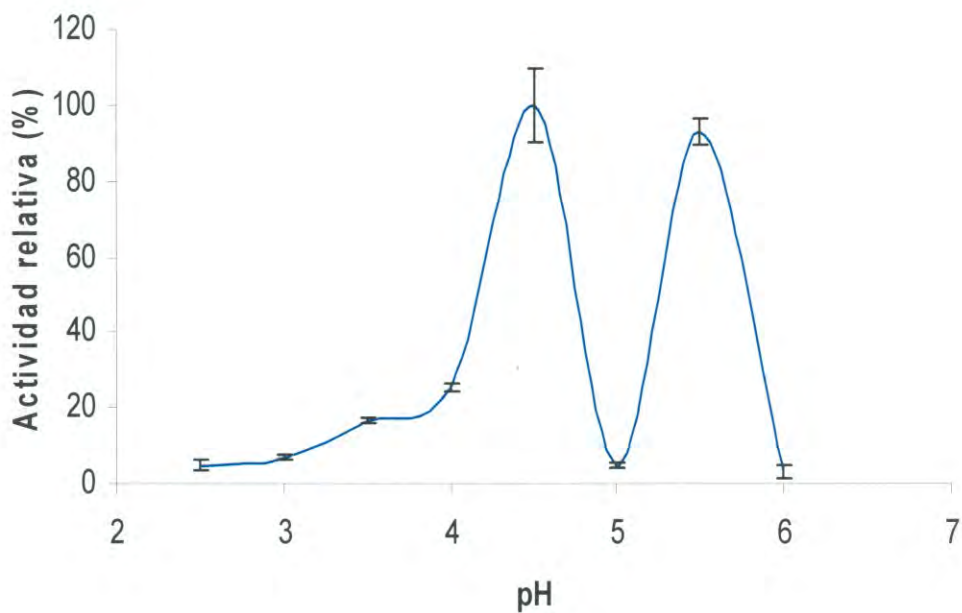


Figura 16. Detección del pH óptimo de las proteasas aspárticas obtenidas de la fracciones # 27 a la 33 que conforman el PII de la cromatografía de filtración Bio gel p-100 grueso de donde se partió de la inyección de la fracción de 30-70% de saturación obtenida del ECHC. Se utilizó una temperatura óptima de 60°C.

Este comportamiento se puede atribuir a varios factores, tales como: la presencia de más de un tipo de enzimas proteolíticas con actividad aspártica, la presencia de isoformas, activas a diferentes pH y a la temperatura que se corrió el ensayo. Para corroborar esto es necesario purificar más a la enzima y evaluar también la actividad variando no sólo el pH sino también la temperatura. De las proteasas aspárticas que pueden estar presentes y haber influido en este comportamiento están la pepsina, la gastricsina, la quimiosina y la catepsina D (Geist y Crawford, 1974; Mc Lay, 1980; Makinodan *et al.*, 1982; Chen y Zall 1986; Gildberg 1987; Jiang *et al.*, 1991, 1992 y 1993). En las proteasas aspárticas presentes en el hepatopáncreas de calamar argentino (*Illex argentinus*) se detectó que eran capaces de actuar en un rango de pH de 2.6 a 4 con un óptimo a 3. La catepsina D del hepatopáncreas de *Todarodes pacificus* presentó un pH óptimo de 3.5 a 37°C (Komai *et al.*, 2004). Por otra parte, en el calamar *Todarodes sagittatus* se determinó que la catepsina D purificada del hepatopáncreas mostró un óptimo pH de 3.7 (Gildberg, 1987). En otros organismos marinos como la carpa (*Ctenopharyngodon edelles*) se atribuyó a la catepsina D la actividad proteolítica que se detecta a pH 2.5. La catepsina D también se ha aislado y detectado su actividad en función del pH, del músculo de varios organismos marinos, ya que se considera que es la responsable de los cambios postmortem (Gómez-Guillén y Batista, 1997). En el manto de calamar presentó actividad en un rango de pH de 2.5 a 5 (Sarai-Suzuki *et al.*, 1983), en el músculo oscuro de sardina (*Sardina pilchardus*) el pH fue 3.2, en el salmón (*Atlantic cod*) trabajó mejor a pH 3 (Gómez-Guillén y Batista 1997; Waing *et al.*, 2007), mientras que en tilapia (*Oreochromis korogwe*) fue a un pH de 3.8 (Doke y Nadkarni

1979). Por lo que en función de los pH donde se detectó el máximo de actividad se puede suponer que se estaba trabajando con un grupo de proteasas aspárticas, y probablemente dentro de este grupo estaba presente la catepsina tipo D.

CONCLUSIONES

Se detectó actividad de proteasas tipo aspárticas en la glándula digestiva (hepatopáncreas) del calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Se logró aislar parcialmente proteasas con actividad aspártica de la glándula digestiva del calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Una de las bandas presentes en la fracción enriquecida con proteasas aspárticas tiene un peso molecular aproximado de 36 kDa lo cual coincide con la catepsina D que se ha encontrado en otras especies de animales al igual que la temperatura óptima se encuentra en el rango de 60°C, por lo que pudiera ser identificada como tal si se continua su purificación y caracterización

Con este trabajo se sientan las bases para que en futuros estudios se lleve a cabo la completa identificación y caracterización de la proteasa aspártica presente en la glándula digestiva (hepatopáncreas) del calamar gigante, una vez que ésta sea purificada.

RECOMENDACIONES

Continuar con otros pasos de purificación del extracto crudo del hepatopáncreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*), utilizando métodos cromatográficos para obtener la proteasa aspártica a homogeneidad.

Identificar y caracterizar, de una manera más amplia, a la proteasa que muestra actividad del tipo aspártica en el hepatopáncreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Llevar a cabo estudios de inhibición de la proteasa que muestra actividad del tipo aspártica, para detallar su mecanismo de acción.

BIBLIOGRAFÍA

- Amersham Biociences. 2001. Protein Purification-Handbook, AC ed. Ed. Imagination at work. pp. 95.
- Anson M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology*. 22: 79-89.
- Aoyagi T., Morishima H., Nishizawa R., Kunimoto S. y Takeuchi T. 1972. Biological activity of pepstatins, pepstanone A and partial peptides of pepsin, cathepsin D and renin. *Antibiotics*. 25: 689-694.
- Applebaum S., Perez L., Lazo y Holt. 2001. Characterization of chymotrypsin activity during early ontogeny of larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 25: 291-300.
- Aranishi F., Ogata H., Hara K., Osatomi K. y Ishihara T. 1997. Purification and characterization of cathepsin L from hepatopancreas of carp (*Cyprinus carpio*) *D Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*. 118:531-537.
- Asgiersson B. y Bjarnason J.B. 1991. Structural and kinetic properties of chymotrypsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with bovine trypsin. *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*. 9:327-335.
- Ashie I. y Simpson B. 1996. Application of high hydrostatic pressure to control enzyme-related fresh seafood texture deterioration. *Food Research International*. 29:569-575.
- Badui S., 1999. Química de los alimentos. 4^{ra} ed. Ed Pearson Educación. pp 203-204.
- Belozersky M., Sarbakanova S. y Dunaevsky Y. 1989. Aspartic proteinases from wheat seeds: isolation, properties and action on gliadin. *Planta*. 177:321-326.
- Bjarnason B.A. 1976. Squid fishing. *Infofish International*. 2:38-40
- Blum H., Beier H. y Gross H. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 8:93-99.
- Blundell T., Cooper J., Foundling S., Jones D., Atrash B. y Szelke M. 1987. On the rational design of renin inhibitors: X-ray studies of aspartic proteinases complexed with transition-state analogues. *Biochemistry*. 26:5585-5589.

- Borderías J., Aguirre M., Montero P., An H. y Gémez M. 1999. Partial protease activity characterization of squid (*Todarodes eblanae*) mantle. Food science and Technology International. 5:391-396.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248-254.
- Brewer P., Helbig N. y Haard, N. F. 1984. Atlantic cod pepsin. Characterization and use as a rennet substitute. Canadian International Food Science and Technology Journal. 17:38-43.
- Cano-Lopez A., Simpson B. y Haard N. 1987. Extraction of carotenoprotein from shrimp processing wastes with the aid of trypsin from Atlantic cod. Journal of Food Science. 52, 503-506.
- Cao M., Osatomi K., Suzuki M., Hara K., Tachibana K. y Ishihara T. 2000. Purification and characterization of two anionic trypsin from Atlantic cod. Journal of Food Science. 52:503-506.
- Cardenas-Lopez J. y Haard N. 2005. Cysteine proteinase activity in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas extracts. Journal of Food Biochemistry. 29(2):171-186.
- Cardenas-Lopez J. y Haard N. 2009. Identification of cysteine proteinase from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas as cathepsin L. Food Chemistry. 112(2):442-447.
- Castillo-Yañez F.J., Pacheco-Aguilar R., García-Carreño F.I. y Navarrete-Del Toro A. 2004. Characterization of acidic proteolytic enzymes from monterey sardine (*Sardinops sagar caerulea*) Viscera. Food Chemistry. 85:343-350.
- Castillo-Yanez F.J., Pacheco-Aguilar R.P., Garcia-Carreño F.L., Navarrete del Toro M. y Lopez M.F. 2006. Purification and biochemical characterization of chymotrypsin from the vicera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). Food Chemistry. 99:252-259.
- Celis-Guerreo L., García-Garreño F. y Navarrete del Toro. 2004. Characterization of proteases in the digestive system of spiny lobster (*Panulirus interruptus*). Marine Biotechnology. 6:269-269.
- Chen H. y Zall R. 1986. Partial purification and characterization of cathepsin D and B-like acid proteinase from surf clam viscera. Journal of Food Science. 51:71-75.

- Chitpinyol S. y Crabbe M. 1998. Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chemistry*. 61(4):395-418.
- Chong A., Hashim R., Chow-Yang L. y Ali A.B. 2002. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquaculture*. 203, 321-333.
- Clake M. y Trueman E. 1998. *The Molluscan. Paleontology and neontology of cephalopods*. Vol. 2. Ed. Academic Press Inc. USA. pp 5.
- Córdova-Murueta J.H. y García-Carreño F.L. 2002. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture*. 210:317-384.
- De Vecchi S. y Coppes Z. 1996. Marine fish digestive proteases in food industry and its relevance to the South-West Atlantic region. *Journal of Food Biochemistry*. 10, 193-214.
- Díaz-López M., Moyano-López F., Alarcón-Lopez F., García-Carreño F. y Navarrete del Toro M. 1998. Characterization of fish acid proteases by substrate-gel electrophoresis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 121:369-377.
- Díaz-Tenorio L., García-Carreño F. y Navarrete del Toro A. 2006. Characterization of proteases in the digestive system of spiny lobster (*Panulirus interruptus*). *Invertebrate Biology* 125 (2): 125-135.
- Doi E., Shibata D., Matoba T. y Yonezawa D. 1980. Characterization of pepstatin-sensitive acid protease in resting rice seeds. *Agriculture Biology Chemistry*. 44:741-749.
- Doke S., Ninjoor V. y Nadkarni G. 1979. Characterization of cathepsin D from the skeletal muscle of fresh water fish, *Tilapia mossambica*. *Agriculture Biology Chemistry*. 44 (7):1521-1528.
- Donald K., Day A., Smerdon G., Cross L. y Hawkins A. 2003. Quantification of gene transcription and enzyme activity for functionally important proteolytic enzymes during early development in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 136:383-392.
- Ehrhardt N., Jacquemin F., Garcia B., Gonzdlez D., López B., Ortiz C. y Solis N. 1983. On the fishery and biology of the giant squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, Mexico. En *Advances in assessment of world cephalopod resources* (J. F. Caddy, ed.), p. 306-339. FAO Fish. Tech. Pp. 231.

- Essed Z., Fernández I., Alarcón F. y Moyano F. 2002. Caracterización de actividad proteasa digestiva de atún rojo *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758). Bulletin Institute Species Oceanography. 18 (1-4) 99-107.
- Ezquerria-Brauer J., Haard N., Ramirez-Olivas Rosalina., Olivas-Burrola H. y Velazquez-Sanchez C. 2002. Influence of harvest season on the proteolytic activity of hepatopancreas and mantle tissues from jumbo squid (*Dosidicus gigas*). Journal of Food Biochemistry. 26:459-475.
- Fang L. y Lee B. (1992). Ontogenic changes in digestive enzymes in *Penaeus monodon*. Comparative Biochemistry and Physiology. 103B:1033-1037.
- FAO/SIDP Species Identification Sheets. Distribución geográfica del calamar gigante (*Dosidicus gigas*). www.oceansatlas.org/.../Dosidicus/gigas_2721.htm
- FAO 2003. Recursos Mundiales de Calamar. www.fao.org/docrep/009/y5852s/Y585209.htm
- Fennema O. y Tannenbaum S. 2000. Introducción a la química de los alimentos. Capítulo 7, 2ª ed. Acibia S.A. Zaragoza España. pp.515-625.
- Fusek M., Vetvicka V. Cathepsin D en: Fusek M., Vetvicka 5ª ed. Aspartic proteinases: Physiology and Pathology. Chapter II. Boca Raton: CRC Press, 1995. p. 143-184.
- Galgani F. y Nagayama F. 1987. Digestive proteinases in the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. Comparative Biochemistry and Physiology. 87 B:889-893.
- García-Carreño F.L., Hernández-Cortés M.P. y Haard N. 1994. Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive system of a fresh water and a marine decapod. Journal Agriculture Food Chemistry 42:145-146.
- García-Carreño F.C. y Hernandez-Cortes P. 2000. Use of protease inhibitors in seafood products. En Seafood Enzymes: Utilization and influence on postharvest seafood quality, N.F. Haard and B.K. Simpson. New York., pp. 531-540.
- Geist G. y Crawford D. 1974. Muscle cathepsins in three species of Pacific. Journal of Food Science. 39:548-551.
- Gildberg A. 1987. Purification and characterization of cathepsin D from the digestive gland of the pelagic squid *Todarodes sagittatus*. Journal Science Food Agriculture. 39:85-94.

- Gildberg A. 1988. Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology* 91B:425-435.
- Gildberg A. y Overbo K. 1990. Purification and characterization of pancreatic elastase from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 97B, 775-782.
- Gómez-Guillén M. y Batista I. 1997. Seasonal changes and preliminary characterization of cathepsin D-like activity in sardine (*Sardina pilchardus*) muscle. *International Journal of Food Science and Technology*. 32:255-260.
- Guevara M., Oliva C., Machinandiarena M. y Daleo G. 1999. Purification and properties of an aspartic protease from potato tuber that is inhibited by a basic chitinase. *Physiologia Plantarum*. 106:164-169.
- Guilloteau M., Laloi M., Michaux S., Bucheli P. y McCarthy J. 2005. Identification and characterization of the major aspartic proteinase activity in *Theobroma cacao* seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.85:549-562.
- Guizani N., Rolle R., Marshall M., Wei C. 1991. Isolation and characterization of a trypsin from the pyloric ceca of mullet (*Mugil cephalus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 98:517-521.
- 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: 17-35.
- Haard N.F. 1994. Protein hydrolysis in seafoods. En *Seafood chemistry. Processing Technology and Quality*, F. Shahidi y J.R. Botta, editors. Chapman y Hall, New York, pp.10-33.
- Haard N.F. 1995. Enzymes as food processing aids. Universidad de California, Davis, pp. 1-2.
- Haard N.F. 1998. Speciality enzymes from marine organisms. *Food Technology* 53(7), 64-67.
- Haard N. y Simpson BK. 2000. Seafood enzymes. Ed. Marcel Dekker.pp. 191-207.
- Hatate H., Tanaka R., Suzuki N. y Hama Y. 2000. Comparison of protease activity in liver among several species of squid and cuttlefish. *Fisheries Science*. 66:182-183.

- Hammed K. y Haard N. 1985. Isolation and characterization of cathepsin C from atlantic short finned squid *Illex Illecebrus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 82B:241-246.
- Hernández-Cortés P., Whitaker J. y García-Carreño F. 1997. Purification and characterization of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (Crustacea: decapoda). *Journal of Food Biochemistry*. 21: 497-514.
- INEGI. 2005. Sistemas Nacionales Estadísticos y de Información Geográfica. <http://www.inegi.gob.mx/inegi/default.asp>
- James M., Hsu I. y Delbaere L. 1977. Mechanism of acid protease catalysis base on the crystal structure of penicillopepsin. *Nature*. 267:808-813.
- James M., Sielecki A., Salituro F., Rich D., y Hofmann T. 1982. Conformational flexibility in the active sites of aspartyl proteinases revealed by a pepstatin fragment binding to penicillopepsin. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*. 79:6137-6141.
- James M. y Sielecki A. 1985. Stereochemical analysis of peptide bond hydrolysis catalyzed by the aspartic proteinases penicillopepsin. *Biochemistry*. 22:3701-3713.
- James M., Sielecki A. Hayakawa K. y Gelb M. 1992. Crystallographic analysis of transition state mimics bound to penicillopepsin: difluorostatine and difluorostatine-containing peptides. *Biochemistry*. 31:3872-3886.
- Jiang S., Hev Y., Lee J. y Wang J. 1991. Purification and characterization of a proteinase identified as cathepsin D from Tilapia muscle (*Tilapia nilotica* X *Tilapia aures*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 39:1597-1601.
- Jiang S., Hev Y., Lee J. y Wang J. 1992. Comparative study on the cathepsin D from banded shrimp (*Penaeus japonicas*) and graa shrimp (*Penaeus monodon*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 40:961-966.
- Jiang S., Hev Y., Lee J. y Wang J. 1993. Comparison of the cathepsin D from mackerel (*Scomber australasicus*) and milkfish (*Chanos chanos*) muscle. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 57(4):571-577.
- Kafienah W., Bromme D., Buttle D.J., Croucher L.J. y Hollander P. 1998. Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *Journal Biochemistry*. 331:727-732.
- Kageyama T. 1995. Procathepsin E y cathepsin E. *Methods in Enzymology*. 248:120-136.

- Kawabata C., Komai T. y Gocho S. 1996. Elimination of bitterness of bitter peptides by squid liver carboxypeptidase. En *biotechnology for Improved foods and flavors*, pp. 167-172, American Chemical Society.
- Kay J. 1985. En: *Aspartic proteases and their inhibitors*, Kostka, 5^a ed. Ed. Walter de Gruyter, Berlin, pp. 1-17.
- Kishimura H., Tokuda Y., Klomklao S., Benjakul S. y Ando, S. 2006. Enzymatic characteristics of trypsin from pyloric ceca of spotted mackerel (*Scomber Australasicus*). *Journal of Food Biochemistry*. 30, 466-477.
- Klett A. 1982. Jumbo squid fishery in the Gulf of California, Mexico. En *proceedings of the international squid symposium, August 9-12, 1981, Boston, Massachusetts* (prepared by the New-England Fisheries Development Found., Inc.), pp. 81-100. UNIPUB, New York, NY.
- Klett-Traulsen A. 1996. Pesquería de calamar gigante *Dosidicus gigas*. pp. 127-149 En Casas-Valdez y G. Ponce-Díaz. 2003. Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. Vol. I, pp 350. En: *Alternativas para fortalecer la cadena productiva de la pesquería de calamar gigante*. Cibnor.
- Klomklao S., Benjakul S. y Visessanguan, W. 2004. Comparative studies on proteolytic activity of spleen extracts from three tuna species commonly used in Thailand. *Journal of Food Biochemistry*. 28:355-372.
- Klomklao S., Benjakul S., Visessanguan W., Simpson, B. y Kishimura H. 2005. Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*. 40:3061-3067.
- Klomklao S., Benjakul S., Visessanguan W., Kishimura H. y Simpon B.k. 2006a. Purification and characterization of trypsin from the spleen of tongol tuna (*Thunnus tonggol*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:5617-5622.
- Klomklao S., Benjakul S., Visessanguan W., Kishimura H., Simpson B.k. y Saeki H. 2006b. Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: Purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*. 144:47-56.
- Klomklao S., Kishimura H., Yabe M. y Benjakul S. 2007. Purification and characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*). *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology B*. 147: 682-689.

- Klomklao S. 2008. Digestive proteinase from marine organisms and their applications. *Journal Science Technology*. 30 (1):37-46.
- Knight C. Barrett A. 1976. Interaction of human cathepsin D with the inhibitor pepstatin. *Journal Biochemistry*. 155:117-125.
- Komai T., Kawabata C., Amano M., Lee B. y Ichishima E. 2004. Todarepsin, a new cathepsin D from hepatopancreas of Japanese common squid (*Todarodes pacificus*). *Comparative biochemistry and physiology. Part B. Biochemistry and molecular biology* .173:373-382.
- Komai T., Kawabata C., Tojo H., Gocho S. y Ichishima E. 2007. Purification of serine carboxypeptidase from the hepatopancreas of japanese common squid *Todarodes pacificus* and its application for elimination of bitterness from bitter peptides. *Fisheries Science*. 73(2):404-411.
- Konno K, Fukazawa C. 1993. Autolysis of squid mantle muscle protein as affected by storage conditions and inhibitors. *Journal Food Science*. 58(6):1198-1202.
- Kolodziejska I., Szyk E., Karamac M. y Sikorski Z.1994. Proteolytic activity of crude enzyme extracts of squid *Illex argentinus* liver. *Journal Food Biochemistry*. 18, 43-53.
- Kreuzer R. 1986. Cephalopods: Handling, processing and products. FAO fisheries technical paper 254. Food and Agriculture Organization of the United National. Rome, Italiy.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-404.
- Leblanc E.L. y Gill T.A. 1982. Comparative study of proteolysis in shortfinned (*Illex illecebrosus*) and long-finned (*Loligo pealei Leseur*) squid. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 73B, 201-210.
- Lemos D., Garcia-Carreño F., Hernadez P., y Navarrete del Toro. 2002. Ontogenetic variation in digestive proteinase activity, RNA and DNA content of larval and postlarval white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Aquaculture*. 214 (1-4) 363-380.
- Liu Z., Wang Z., Zhang J. 2008. An acidic protease from the grass carp intestine (*Ctenopharyngodon idelles*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B*. 149:83-90.

- Maciewicz R.A. y Etherington D.J. 1988. A comparison of four cathepsins (B, L, N and S) with collagenolytic activity from rabbit spleen. *Journal Biochemistry*. 256:433-440.
- Makinoda Y., Akasaka T., Toyohara H., Ikeda S. 1980. Purification and properties of carp muscle cathepsin D. *Journal of Food Science*. 47:647-652.
- Makinoda Y., Akasaka T., Toyohara H. y Ikeda S. 1982. Purification and properties of carp muscle cathepsin D. *Journal of Food Science*. 47:647-652.
- Mangold K. 1976. La migration chez les Cephalopodes. *Oceanis* 2(8):381-389.
- Martinez A., Olsea R.L. y Serra J.L. 1988. Purification and characterization of two-trypsin-like enzymes from the digestive tract of anchovy, *Engraulis encrasicolus*. *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*. 91:677-684.
- McLay R. 1980. Activities of cathepsin A and D in cod muscle. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 31:1050-1054.
- Mizuta S., Yoshikawa R., Sato M. y Sakaguchi M. 1996. Effect of pepsin digestion on two distinct types of collagen in the muscle and skin of squid *Todarodes pacificus*. *Fisheries Science*. 62:965-969.
- Mihalyi E. 1978. Application of proteolytic enzymes to protein structure studies. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A. En Klomklao S. 2008. Digestive proteinase from marine organisms and their applications. *Journal of Science Technology*. 30 (1):37-46.
- Morris P., Miller R. y Bowles D. 1985. Endopeptidases activity in dry harvest-ripe wheat and barley grains. *Plant Science*. 39:121-124.
- Murray R. Mayer P., Granner D. y Rodwell V. 2001. *Bioquímica de Harper*. 15 ed. Ed manual moderno. pp. 87-127.
- Nagai T. y Suzuki N. 2002. Preparation and partial characterization of collagen from paper nautilus (*Argonauta argo*, *Linnaeus*) outer skin. *Food Chemistry*. 76:149-153.
- Najafi M., Deobagkar D. y Deobagkar. 2005. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. *Electronic Journal of Biotechnology*. 8:79-85.

- Nalananon S., Benjakul S., Visessanguan W. y Kishimura H. 2007. Use of pepsin for collagen extration from the skin of bigeye snapper (*Priccanthus tayenus*). Food Chemistry. 104:593-601.
- Navarrete del Toro M., García-Carreño F., Díaz M., Celis.Guerrero L. y Saborowski R. 2005. Aspartic Proteinases in the digestive tract of marine decapod crustaceans. Journal of Experimental, Zoology. 305A:645-654.
- Navarrete-Del Toro M., García-Carreño F., Díaz-López M., Celis-Guerrero L. y Saborowski R. 2006. Aspartic proteinases in the Digestive Tract of Marine Decapod Crustaceans. Journal of Experimental Zoology. 305A:645-654.
- Nesis K. N. 1983. *Dosidicus gigas*. En Rosenthal J., y Gilly W. F. 2005. Tagging studies on the jumbo squid (*Dosidicus gigas*) in the Gulf of California, Mexico. Bulletin Fisheries. 103:219-226.
- Neurath H. 1984. Evolution of proteolytic enzymes. Science 224:350–356.
- Nevárez-Martínez M., Hernández-Herrera, Morales-Bojórquez, Bolmori-Ramírez., Cisneros-Mata M.A. y Morales-Azpeitia R. 2000. Biomass and distribution of the jumbo squid (*Dosidicus gigas* d'Orbigny, 1835) in the Gulf of California, México. Fisheries Research. 49:129-140.
- Nigmatulin CH., Nesis K.N. y Arkhipkin A.I. 2001. A Review of biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). Fisheries Research. 54:9-19.
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-INBMB). <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>.
- Okamoto Y., Otsuka-Fuchino H., Horiuchi S., Tamiya T., Matsumoto J. y Tsuchiya T. 1993. Purification and characterization of two metalloproteinases from squid mantle muscle, myosinase I and myosinase II. Biochimica et Biophysica Acta. 1161:97–104.
- Osuna Ruíz Idalia. 2003. Purificación de una aminopeptidasa del hepatopáncreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y evaluación de su capacidad hidrolítica sobre caseína y gluten de trigo cristalino (*Triticum durum*). Tesis de maestría. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora. Hermosillo. Sonora
- Pangkey H., Hara K., Tachibana K., Cao M.J., Osatomi K and Ishihara, T. 2000. Purification and characterization of cathepsin S from hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio*. Fisheries Science. 66:1130-1137.

- Pearl L. 1987. The catalyst mechanism of aspartic proteinases. *Febs Letters*. 214:8-12.
- Polgar L. 1987. The mechanism of action of aspartic proteases involves "push-pull" catalysis. *Febs Letters*. 219(1):1-4.
- Raksakulthai N., Lee Y.Z. t Haard N.F. 1986. Effect of enzyme supplements on the production of fish sauce from male capelin (*Mallotus villosus*). *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*.19:28-33.
- Raksakulthai R., y Haard N., 1998. Purification and characterization of aminopeptidase fractions from squid (*Illex illecebrosus*) hepatopancreas. *Journal of Food Biochemistry*. 23:123-144.
- Raksakulthai R. y Haard N. 2001. Purification and characterization of a carboxypeptidase from squid hepatopancreas (*Illex illecebrosus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 5019–5030.
- Ramirez-Olivas R. 2000. Actividad proteolítica y su relación con cambios en textura del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Tesis de maestría. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora. Hermosillo. Sonora
- Rao M., Tanksale A., Ghatge M. y Deshpande V.1998. Review Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology*. P. 597-635.
- Reid R. y Rauchert, K. 1976. Catheptic endopeptidases and protein digestion in the horse clam *Tresus capax* (Gould). *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*. 54, 467-472.
- Roper, F., Sweeney y Nauen C. 1984. *FAO species catalogue: vol. 3, Cephalopods of the world.*, FAO, Rome. pp 272.
- Saito M., Kunisaki N., Urano N. y Kimura S. 2000. Characterization of cDNA clone encoding the matrix metalloproteinase 2 from rainbow trout fibroblast. *Fisheries Science*. 66:334-342.
- Salles C., Gagliano P., Leitao S., Salles J., Guedes H., Cassano V. y De-Simone S. 2007. Identification and characterization of proteases from skin mucus of tambacu, a neotropical hybrid fish. *Fish Physiology and Biochemistry*. 33(2):173-179.
- Sakai J, Matsumoto J. 1981. Proteolytic enzymes of squid mantle muscle. *Biochemistry Physiology*. 68B(3):389-395.

- Sakai-Suzuki J., Sakaguchi Y., Hoshino S., y Matsumoto J. 1983. Separation of cathepsin D-like proteinase and acid thiol proteinase of squid mantle muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 75B:409-414.
- Seed R. 1983. Structural organization, adaptive radiation, and classification of molluscs. En: *The mollusca, metabolic biochemistry and molecular biomechanics* (P. Hochachka, ed.) pp. 1-54, Academic Press, New York.
- Segel I.H. 1968. Chapter 4: Enzymes. En: *Biochemical calculations*. 2nd edition. John Wiley.
- Semarnat. 2000. Pesquería de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el norte del Pacífico. <http://www.semarnat.gob.mx>.
- Simpson B.K. y Haard H.F. 1987. Cold-adapted enzymes from fish. En Klomklo S. 2008. Digestive proteinase from marine organisms and their applications. *Journal Science Technology*. 30 (1):37-46.
- Simpson B. K. 2000. Digestive proteinases from marine animals. Chapter 8. pp. 191-213. En: Haard N. F. y Simpson B. K. 2000. *Seafood enzymes. Utilization and influence on postharvest seafood quality*. Ed Marcel Dekker Inc. USA. pp. 681.
- Suda A. 1973. Development of fisheries for not conventional species. *Journal of Fisheries and Reseach*. 30:2121-2158.
- Sugiyama M., Lousu S., Hanabe M. y Okuda Y. 1989. Organs and other tissues. En *Utilization of Squid*, (A.A. Bakeman Rotterdam, ed.) pp. 90-101.
- Sukarno K., Takahashi K., Hatano M. y Sakurai Y. 1995. Proteinase from the liver of neon flying squid: purification and properties. *Bulletin of Faculty of Fisheries, Hokkaido University*, 46, 63-70.
- Tang J., Sepulveda P., Marciniszyn J., Chen K., Huang W., Tao N., Liu D. y Lanier J. 1973. Amino-acid sequence of porcine pepsin. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States*. USA. 70:3437-3439.
- Teschke M. y Saborowski R. 2005. Cysteine proteinases substitute for serine proteinases in the midgut glands of *Crangon crangon* and *Crangon allmani* (Decapoda: Caridea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 316:213-229.

- Veerapandian B., Cooper J., Sali A. y Blundell T. 1990. X-y analyses of aspartic proteinases. III. Threedimensional structure of endothiapsin complexed with a transition-state isostere inhibitor of renin at 1.6 Å resolution. *Journal Molecular Biology*. 216:1017-1029.
- Venugopal V. 1995. By-products from industrial fishery processing. *Indian Food Industry*. 14:22-24.
- Waing P., Stenvik J., Larsen R., Maehre H, Olsen R. 2007. Cathepsin D from atlantic cod (*Gadus morhua*) liver. Isolation and comparative studies. *Biochemistry Physiology B Biochemistry Molecular Biology*. 147(3):504:511.
- Wei X., Gang Y., Changhu X., Yong X. y Yan Ren. 2008. Biochemical changes associated with fast fermentation of squid processing by-products for low salt fish sauce. *Food Chemistry* 107:1597-1604.
- Whitaker J.R. 1994. Classification and nomenclature of enzymes. En *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, Marcel Dekker, New York., pp. 367-385.
- Whitaker J., John R., Voragen A. y Wong D. 2003. *Handbook of Food Enzymology*. Marcel Dekker Inc. Ed. USA. pp. 993-1018.
- Yetty N., Roshada H. Ahyaudin A., y Alexander. 2004. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (*Osteoglossidae*). *Aquaculture*. 233 (1-4): 305-320.
- Yohko Miura-Yokota Youco Matsubara, Tetsuya Ebihara, Shunji Hattori, y Shinkichi Irie 2004. A cysteine-activated protease isolated from *Todarodes pacificus* squid degrades collagen below its denaturation temperature. *Connective Tissue Research*. 45(2): 109-121.
- Zhang Y., Liu W., Li G., Shi B., Miao Y. y Wu X. 2007. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Chemistry*. 103: 906-912.
- Zeef A. y Dennison C. 1988. A novel cathepsin from the mussel (*Perna perna* Linne). *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*. 90:204-210.

ANEXOS

ANEXO I

Procedimiento Para Realizar una Electroforesis en Condiciones Ácidas. Descrito por Díaz-López *et al.*, 1998.

Reactivos ha Preparar y Condiciones Necesarias para Obtener un gel en Condiciones Ácidas.

| | Gel de separación 12% | Gel de empackado 4% |
|------------------------|--------------------------|------------------------|
| Acrilamida /bis (30:5) | 4 ml | 0.65 ml |
| Buffer 6.8 | ----- | 4.35 ml |
| Buffer 4.3 | 6 ml | ----- |
| Persulfato de amonio* | 100 µl | 75 µl |
| TEMED | 50 µl | 15 µl |
| Total | 10.150 ml | 5.9 ml |

*En fresco: 100 mg/ ml de agua deionizada.
Se corre a 100 V/gel con amperaje variable.

Nota: La corrida se realizó colocando el equipo a -40°C, de esta manera se evito el calentamiento del gel.

Condiciones ácidas

| | |
|---|--|
| Gel concentrador o superior Acrilamida-bisacrilamida (30:5) | 0.127 M de ácido acético, KOH 0.12 pH 6.8 |
| Gel de separación o inferior Acrilamida-bisacrilamida (30:5) | 0.376 M de ácido acético, KOH 0.06 pH 4.3 |
| Buffer del electrodo | 0.14 M de ácido acético, 0.35 M de glicina |
| Buffer muestra (dilución 1:1 con la muestra) | 0.127 M de ácido acético, KOH 0.12 pH 6.8. 20% de glicerol y 0.02% de azul de metileno |
| Tiempo de corrida | 3-4 h |

Fuente: Díaz-López *et al.*, 1998.

Reactivos y Pasos ha Seguir, para Teñir los Geles Obtenidos de la Electroforesis Ácida.

Tinción con Coomassie

Solución desteñidota

| | |
|----------------|-------|
| Metanol | 50 ml |
| Ácido acético | 10 ml |
| Agua destilada | 40 ml |

Solución colorante de Coomassie 0.5%

| | |
|-------------------------|--------|
| Azul de Coomassie R-250 | 500 mg |
| Solución desteñidota | 100 ml |

Disolver utilizando un agitador magnético, durante 2-4 h, dejar reposar toda la noche. Filtrar y guardarlo en un frasco ambar, protegido de la luz directa.

Solución conservadora

| | |
|----------------|-------|
| Agua destilada | 80 ml |
| Metanol | 15 ml |
| Glicerol | 5 ml |

Hemoglobina al 0.5%

- 1) Disolver 0.5 g de hemoglobina en 50 ml de HCl 0.06 M. Agregar despacio.
- 2) Dializar contra 4 litros de HCl 60 mM con 2 cambios de buffer en 20 h.
- 3) Dializar contra 4 litros de HCl 1 mM pH 3 con 2 cambios de buffer en 24 h.
- 4) Ajustar el volumen a 100 ml con agua deionizada y ajustar el pH a 3.
- 5) Hacer alícuotas de 20 ml y congelar a -40°C hasta su ocupación.

Tinción del gel ácido

- a) Una vez que se ha corrido el gel, es sometido a un baño con acetato de sodio 20 mM a un pH 3.5 por 15 min. lo cual se hace para aclimatar al gel a dicho pH, debe de manejarse en frío, 0°C .
- b) Retirar el acetato de sodio y enjuagar el gen con agua fría, para después agregar la hemoglobina contenida en HCl 60 mM a pH 3.5.
- c) Se coloca el gel con la hemoglobina a 37°C por 2 h.
- d) Después, se remueve la hemoglobina y enjuaga el gel con agua deionizada, para después teñirlo con azul de Coomassie R-250 al 0.5%, durante toda la noche.
- e) Se remueve el azul de Coomassie R-250 y sumerge el gel en solución desteñidota. El gel se coloca en solución conservadora.

ANEXO II

Tinción de Plata Utilizada Para Teñir los Geles Electroforéticos. Descrito por
Blum, *et al.*, 1987.

Tinción de Plata

1. **Fijación en:**

| | |
|---|------------|
| MeOH..... | 50 ml |
| AcOH..... | 12 ml |
| 37% formaldehído..... | 50 μ l |
| Aforar con H ₂ O deionizada..... | 100 ml |

2. **Lavar 3 veces el gel en 50% de EtOH, por 20 min cada uno.**
3. **Sensibilización**
 Prepara el gel para tinción. Lavar el gel exactamente 1 min en:

| | |
|----------------------------------|--------------------|
| Tiosulfato de sodio..... | 20 mg ^a |
| H ₂ O demonizada..... | 100 ml |

4. **Enjuagar el gel 3 veces con H₂O deionizada, por 20 s cada uno.**
5. **Tinción: Nitrato de plata**
 Sumergir el gel en la solución de nitrato por 20 min.

| | |
|---|------------|
| AgNO ₃ | 0.2 g |
| 37% formaldehído..... | 75 μ l |
| Aforar con H ₂ O demonizada..... | 100 ml |

6. **Enjuagar el gel 2 veces con H₂O deionizada, por 2 s cada uno.**
7. **Revelado**
 Sumergir el gel por 10 min, o hasta que las bandas aparezcan, con:

| | |
|---|---------------------|
| Na ₂ CO ₃ | 6 g |
| 37% formaldehído..... | 50 μ l |
| Tiosulfato de sodio..... | 0.4 mg ^b |
| Aforar con H ₂ O deionizada..... | 100 ml |

8. **Lavar el gel dos veces con H₂O deionizada, 2 min cada uno.**
9. **Fijación**
 Detener la tinción del gel por 10 min con:

| | |
|---|--------|
| MeOH..... | 50 ml |
| AcOH..... | 12 ml |
| Aforar con H ₂ O deionizada..... | 100 ml |
10. **Conservar el gel en 50% MeOH por lo menos 20 minutos hasta que esté listo para deshidratar.^c**

^a Las soluciones que contienen tiosulfato tienen que ser recién preparada con el fin de obtener sensibles y reproducibles tinciones

^b Se toman 2 ml de la solución pasos # 3.

^c Después de 10 min, transferir el gel a 4°C.