



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos
Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Especialidad en Conservación y Procesamiento de Productos Marinos

Purificación y Caracterización de una Aminopeptidasa del
Hepatopáncreas de Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*)

TESIS

que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Idalia Osuna Ruíz

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

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

	Página
APROBACIÓN.....	ii
DEL AUTOR.....	iii
DEDICATORIAS.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
OBJETIVOS.....	5
ANTECEDENTES.....	6
Generalidades de los Moluscos.....	6
Clasificación.....	7
Calamar.....	8
Clasificación e importancia.....	8
Calamar Gigante.....	8
Distribución.....	8
Migración y Movimientos del Calamar Gigante.....	9
Morfología.....	14
La Pesquería de Calamar Gigante en México.....	14
Importancia.....	14
Tecnología Enzimática.....	18
Generalidades de las Enzimas.....	19
Características Importantes en el Estudio de las Enzimas.....	20
Factores que Afectan la Velocidad de Reacción de una Enzima.....	20
Concentración de enzima.....	21
Concentración y especificidad de ligandos.....	21
pH.....	23
Fuerza iónica.....	23
Temperatura.....	24
Fuentes Enzimáticas.....	24
Proteasas de Origen Marino.....	26
Clasificación de proteasas digestivas de animales marinos.....	27
Aminopeptidasas.....	30
Características generales.....	30
Mecanismo de catálisis.....	33
Importancia.....	35
Usos de Aminopeptidasas en la Industria de Alimentos.....	35
Utilización Tecnológica de Aminopeptidasas de Origen Marino.....	37

MATERIALES Y METODOS.....	39
Muestras.....	39
Etapa de Purificación.....	39
Obtención de la Fracción Aminopeptídica.....	39
Cromatografía de Intercambio Iónico.....	40
Matriz.....	40
Empacado.....	41
Condiciones de corrida.....	42
Caracterización.....	43
Determinación de Parámetros Cinéticos.....	43
Actividad Aminopeptidasa con Substratos Específicos.....	44
Influencia del pH Sobre la Actividad Enzimática.....	45
Influencia de la Temperatura Sobre la Actividad Enzimática.....	46
Estabilidad al pH y Temperatura.....	46
Efecto de la Presencia de Metales e Inhibidores.....	47
Electroforesis en SDS-Poliacrilamida.....	48
Actividad en Gel (Zimogramas).....	49
Actividad Hidrolítica Sobre Caseína.....	50
Hidrolizados.....	50
Cuantificación de aminoácidos liberados.....	50
Determinación del grado de hidrólisis.....	51
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
Muestras.....	52
Purificación de la Fracción Aminopeptídica.....	54
Electroforesis SDS-Poliacrilamida.....	59
Caracterización.....	63
Determinación de Parámetros Cinéticos.....	63
Actividad Aminopeptidasa con Substratos Específicos.....	67
Efecto del pH sobre la Actividad y Estabilidad de la Aminopeptidasa Purificada.....	67
Efecto de la Temperatura Sobre la Actividad y Estabilidad de la Aminopeptidasa Purificada.....	71
Efecto de la Presencia de Metales e Inhibidores.....	73
Actividad en Gel (Zimogramas).....	78
Inhibición de Aminopeptidasas en Gel.....	79
Actividad Hidrolítica Sobre Caseína.....	83
CONCLUSIONES.....	86
RECOMENDACIONES.....	88
BIBLIOGRAFIA.....	90

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Esquema de purificación de la aminopeptidasa proveniente del hepatopáncreas de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	57
Tabla 2. Comparativo de los valores de Km reportados para aminopeptidasas provenientes de diversas fuentes.....	66
Tabla 3. Actividad de la aminopeptidasa de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) empleando diferentes sustratos específicos.....	68

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Ubicación geográfica de la distribución de <i>Dosidicus gigas</i>	10
Figura 2.	Zona de mayor biomasa de <i>Dosidicus gigas</i> (Golfo de California).....	11
Figura 3.	Migración de <i>Dosidicus gigas</i> , descrita por Ehrhardt <i>et al.</i> (1983) durante invierno-primavera.....	12
Figura 4.	Migración de <i>Dosidicus gigas</i> , descrita por Ehrhardt <i>et al.</i> (1983) durante verano-otoño.....	13
Figura 5.	Morfología externa de <i>Dosidicus gigas</i>	15
Figura 6.	Anatomía interna del calamar.....	16
Figura 7.	Sitio activo de Leucina-aminopeptidasa mostrando la unión de dos iones de Zn^{+2} y los aminoácidos involucrados.....	32
Figura 8.	Mecanismos de catálisis propuestos para Leucina-aminopeptidasa de bovino.....	34
Figura 9.	Perfil cromatográfico de un extracto con actividad aminopeptidasa proveniente de hepatopáncreas de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) empleando DEAE-celulosa.....	55
Figura 10.	Patrones electroforéticos en SDS-PAGE 12% de poliacrilamida, durante el proceso de purificación de aminopeptidasa de hepatopáncreas de calamar gigante.....	60
Figura 11.	Comparación del patrón electroforético de la aminopeptidasa de hepatopáncreas de calamar gigante con leucina aminopeptidasa de bovino comercial.....	61
Figura 12	Cinética de reacción de la aminopeptidasa purificada de hepatopáncreas de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) obtenida mediante el método de Lineweaver-Burk.....	65

	Página
Figura 13. Efecto del pH sobre la actividad de aminopeptidasa de hepatopáncreas de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	70
Figura 14. Efecto de la temperatura sobre la actividad de aminopeptidasa de hepatopáncreas de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	72
Figura 15. Efecto de la presencia de metales sobre la actividad de la aminopeptidasa purificada a partir del hepatopáncreas de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	75
Figura 16. Inhibición de la actividad de la aminopeptidasa purificada del hepatopáncreas de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	77
Figura 17. Actividad proteolítica en gel de aminopeptidasa de calamar gigante comparado con enzimas comerciales.....	80
Figura 18. Comparación del efecto de inhibidores sobre la actividad en gel de aminopeptidasa de calamar gigante y Leucina aminopeptidasa comercial de bovino	81
Figura 19. Monitoreo de la liberación de aminoácidos en la hidrólisis que efectúa AP de calamar gigante sobre caseína.....	85

RESUMEN

Sonora es un gran productor nacional de calamar gigante (*Dosidicus gigas*), aprovechándose la porción comestible (manto), el cual representa el 42% del peso total del organismo, mientras que los desechos de esta pesquería entre los cuales se incluye la glándula digestiva o hepatopáncreas (2.3%), no reciben tratamiento alguno. El hepatopáncreas es una fuente de enzimas proteolíticas entre las que se encuentran las aminopeptidasas, las cuales pueden impartir atributos sensoriales de calidad a hidrolizados proteicos, alimentos fermentados y madurados. Por lo anterior, la purificación y caracterización de estas enzimas a partir de calamar gigante puede representar una alternativa viable para impartir valor agregado a la pesquería de esta especie.

En este estudio se purificó una fracción aminopeptidasa a partir de hepatopáncreas de calamar gigante empleando cromatografía de intercambio iónico (DEAE-celulosa, pH 8.5, 0.2 M NaCl) y un gradiente de elución de 0-0.35 M de NaCl; la fracción eluyó entre 0.25 y 0.3 M NaCl.

La fracción aminopeptidasa obtenida contuvo una concentración de proteína de 0.14 mg/mL y una actividad aminopeptidasa específica de 0.0127 U/mg proteína, empleando como sustrato específico L-leucina-p-NA. El rendimiento del proceso de purificación empleado fue del 0.84%.

La actividad aminopeptídica se detectó en 7 sustratos sintéticos, para los cuales la afinidad fue: L-prolina>L-metionina>Ac. L- γ -glutámico>L-glicina>L-

Leucina>L-alanina>L-lisina-p-NA; la aminopeptidasa purificada presentó un peso molecular aproximado de 55 kDa, una K_m de 0.3 mM y una V_{max} de $2.54 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1}$; el pH óptimo de actividad con L-leucina-p-NA fue de 8 a 37°C y la temperatura de máxima actividad se encontró a 30°C con pH 7.2. La actividad de la fracción fue altamente estable a pH de 7 a 25°C y se inactivó a temperaturas superiores a 80°C a pH 7. La actividad L-Leucina aminopeptidasa de la fracción purificada fue activada por Zn^{+2} y Ca^{+2} e inactivada por Hg^{+2} , bestatin, EDTA y PCMB (38.46, 100, 50.12 y 36.29%, respectivamente). La fracción es capaz de hidrolizar caseína en solución, exhibiendo un grado de hidrólisis del 6%.

Con base en los resultados obtenidos se concluyó que la fracción aminopeptidasa purificada del hepatopáncreas de calamar gigante es una metaloproteasa zinc-dependiente, con un grupo cistéico en su estructura que participa en la estabilidad de conformación del sitio activo. Aparentemente se trata de una leucina aminopeptidasa por sus características de inhibición ante bestatin. En base a la capacidad que esta fracción posee para hidrolizar caseína y permanecer estable a 70°C , puede proponerse su posible utilización en procesos de hidrólisis controlada en la industria de alimentos.

INTRODUCCION

La industria pesquera a nivel internacional se ha incrementado en los últimos años, el aumento se ha atribuido al consumo per cápita de pescados y mariscos (Morrisey, 2002), lo cual ha propiciado el interés de diversos sectores hacia el desarrollo de esta industria.

En México este crecimiento no ha sido tan marcado, pero las expectativas son de obtener una mayor derrama económica por la actividad pesquera. El Estado de Sonora es considerado uno de los principales productores pesqueros a nivel nacional, sin embargo, al igual que en el resto de la República Mexicana, su industria se basa principalmente en la captura y manejo en fresco y congelado de algunas especies, dentro de las cuales destaca el calamar gigante (SAGARPA, 2002).

Durante el manejo de calamar, al igual que muchas otras especies se aprovecha principalmente el músculo. El resto del organismo, piel, pluma y vísceras son desechados, representando un desperdicio, ya que estos desechos pueden ser aprovechados de manera integral y darle un valor agregado a la especie. Dentro de los desperdicios, está la glándula digestiva del calamar, conocida como hepatopáncreas (HP). En diversas especies de calamar se ha detectado que el HP es una excelente fuente de enzimas proteolíticas (Sugiyama *et al.*, 1989; Raksakulthai y Haard, 1999). En estudios realizados por diversos investigadores, se observó que las proteasas de hepatopáncreas de calamar pueden ser agregadas durante el procesamiento de

algunos alimentos (Lee *et al.*, 1986; Kolodesiejska *et al.*, 1992; Raksakulthai y Haard, 1999). De las enzimas detectadas y evaluadas están las peptidasas, amino- y carboxipeptidasas, las cuales se ha observado que favorecen la producción de sabores deseables, eliminación de péptidos responsable del sabor amargo y proveen características de calidad en diversos alimentos (Gobbetti *et al.*, 1994; Rul *et al.*, 1994; Bhowmik y Matrh, 1988; Sanz *et al.*, 1997; García-Carreño *et al.*, 1998; Raksakulthai y Haard, 1999; Parra *et al.*, 1999).

Las aminopeptidasas (AP) son proteasas sumamente específicas, forman parte del grupo de las exopeptidasas e hidrolizan las uniones amino terminal de las cadenas polipeptídicas. En estudios previos en el extracto crudo de HP de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) se detectó actividad tipo aminopeptidasa (Ezquerro *et al.*, 2002) la cual fue caracterizada parcialmente por Osuna *et al.* (2002), sin embargo hasta el momento ninguna de las enzimas con actividad aminopeptidasa en esta especie ha sido purificada.

Debido a lo anterior, el objetivo general que se planteó en este trabajo fue extraer, purificar y caracterizar la aminopeptidasa presente en HP de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Estos estudios permitirán conocer las características de la aminopeptidasa presente en la glándula digestiva de esta especie de gran importancia comercial y presumiblemente, con los resultados obtenidos pueden proponerse condiciones de manejo, dando la pauta para siguientes investigaciones de aplicación en la industria de alimentos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Purificar y caracterizar una aminopeptidasa proveniente del hepatopáncreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Objetivos Particulares

Establecer las condiciones de purificación de una aminopeptidasa partiendo del hepatopáncreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Caracterizar la aminopeptidasa purificada en base a la cinética de reacción, peso molecular, pH, temperatura, actividad en presencia de metales e inhibidores y capacidad hidrolítica sobre caseína.

ANTECEDENTES

Generalidades de los Moluscos

El término molusco proviene del latín *mollis* que significa “suave” (debido a lo blando del cuerpo, el cual está protegido solamente por una hoja de tejido llamado manto) y se emplea para determinar a un grupo diverso de animales acuáticos, entre los que se incluyen desde bivalvos microscópicos, almejas que alcanzan un metro de largo (clase *Tridacnidae*), calamares de más de 10 metros (*Architeuthis*) o pulpos gigantes de 6 m de largo y con pesos superiores a los 40 kg (Allen, 1976; Brusca y Brusca, 1990).

Los moluscos de mayor abundancia son los gasterópodos marinos, seguidos de moluscos bivalvos y cefalópodos. Estos últimos se consideran los más activos y especializados de todos los moluscos y son predadores carnívoros (Brusca y Brusca, 1990).

La anatomía de los cefalópodos incluye generalmente tres regiones: cabeza, la cual contiene ojos, boca y tentáculos; pies, musculares y variables en forma y función; y masa visceral, que incluye los órganos internos. Estos organismos son fácilmente adaptables por lo que se pueden encontrar en una gran variedad de habitats y particularmente en la zona intermareal y sublitoral, algunos son pelágicos y otros bentónicos (Clarke y Trueman, 1988.).

Clasificación

La clasificación de los moluscos está basada en la estructura de los pies o brazos, piel, manto y sistema nervioso, presencia o ausencia de caparazón, tipo y número de válvulas en el caparazón y en la presencia o ausencia de tentáculos y ventosas (Brusca y Brusca, 1990). Generalmente se consideran siete clases, de las cuales los gasterópodos, bivalvos y cefalópodos son las mayores (Brusca, 1989).

Los gasterópodos se caracterizan por poseer concha usualmente de una pieza. La mayoría son marinos, pueden ser microherbívoros o carnívoros (Barnes, 1987). Los moluscos bivalvos poseen concha en forma de dos valvas calcáreas unidas por un ligamento elástico. Llevan a cabo la extensión de su manto y de su concha seguida por una compresión del cuerpo, incluyendo la masa visceral y los pies, son organismos acuáticos, generalmente marinos (Barnes, 1987; Brusca y Brusca, 1990). Los cefalópodos son la clase más organizada de los moluscos e incluye al pulpo, calamar, sepia y nautilus. Se caracterizan por tener el cuerpo un poco elongado y cubierto por el manto. La cabeza, tentáculos y brazos forman una sola estructura, con la boca situada en el medio de éstos. La cabeza posee ojos bien desarrollados y tiene una cavidad visceral muy espaciosa (Clarke y Trueman, 1988). Desde el punto de vista de explotación y consumo a nivel mundial, los calamares son las especies más importantes dentro de esta clase.

Calamar

Clasificación e importancia. El calamar es un molusco carnívoro que pertenece a la clase *Cephalopoda*, subclase Coleoidea, orden Teuthida, suborden Oegopsida y dentro de este suborden se conocen 15 familias (Clarke y Trueman, 1988), de las cuales existen cerca de 100 especies distribuidas en todo el mundo, pero solo unas cuantas se emplean para consumo humano (Bjarnason, 1989).

Se consideran comercialmente importantes, las familias: Loliginidae, que son calamares neríticos cuyas especies más representativas son *Loligo forbesi*, *L. patagónica*, *L. carlbergensis* y *L. vulgaris*; la familia Ommastrephidae, incluye las subfamilias como Todarodinae, Illicinae y Ommastrephinae, cuyas especies más representativas son *Tadarodes pacificus*, *Nototodarus sloani*, *Illex argentinus*, *Illex illecebrosus* y *Dosidicus gigas*, cada una de las cuales se encuentra distribuida en diversas regiones geográficas (Kreuzer, 1986).

Calamar Gigante

Distribución

El calamar *Dosidicus gigas* (perteneciente a la subfamilia ommastrephinae) se distribuye en el Océano Pacífico oriental desde la frontera

de México y los Estados Unidos hasta Chile. Puede encontrarse desde la superficie hasta más de 400 m de profundidad (Suda, 1973) (Figura 1). Estos calamares se presenta con mayor abundancia en las costas del Perú y México (Nigmatullin *et al.*, 2001), siendo el Golfo de California la región con ejemplares de mayor peso y tamaño según constan estimaciones de biomasa realizadas durante 1996 a 1999 por Névarez-Martínez *et al.* (2000) (Figura 2).

Migración y Movimientos del Calamar Gigante

Dosidicus gigas es una especie migratoria. En las figuras 3 y 4 se muestra la migración del calamar gigante en el Golfo de California. Esta especie migra desde el océano Pacífico hacia aguas territoriales dentro y fuera del Golfo de California dependiendo de sus requerimientos de alimentación (Ehrhardt, 1991).

La migración hacia dentro del Golfo de California inicia el mes de enero y el calamar se mueve hacia el norte en el mes de abril. De mayo a agosto se sitúan ligeramente en la parte superior del centro del Golfo. Durante el mes de julio algunos calamares se dispersan hacia el lado este y la mayoría ocupan la parte central, lo que provoca una mezcla de organismos con una gran variedad de tallas. Al final del mes de agosto y durante todo el mes de septiembre, la migración se realiza hacia el sur del Golfo de California y unos cuantos organismos permanecen en la parte superior del Golfo durante el invierno. Este patrón puede modificarse debido a la temperatura (Ehrhardt, 1991).

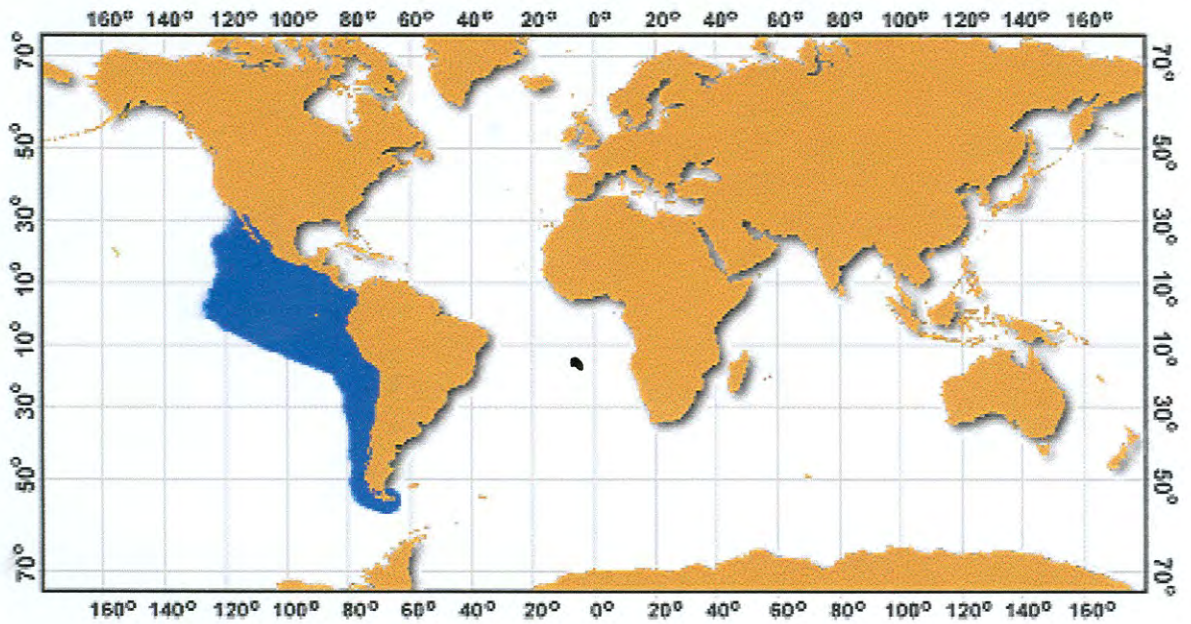


Figura 1. Ubicación geográfica de la distribución de *Dosidicus gigas*.
Fuente: FAO, 2003.

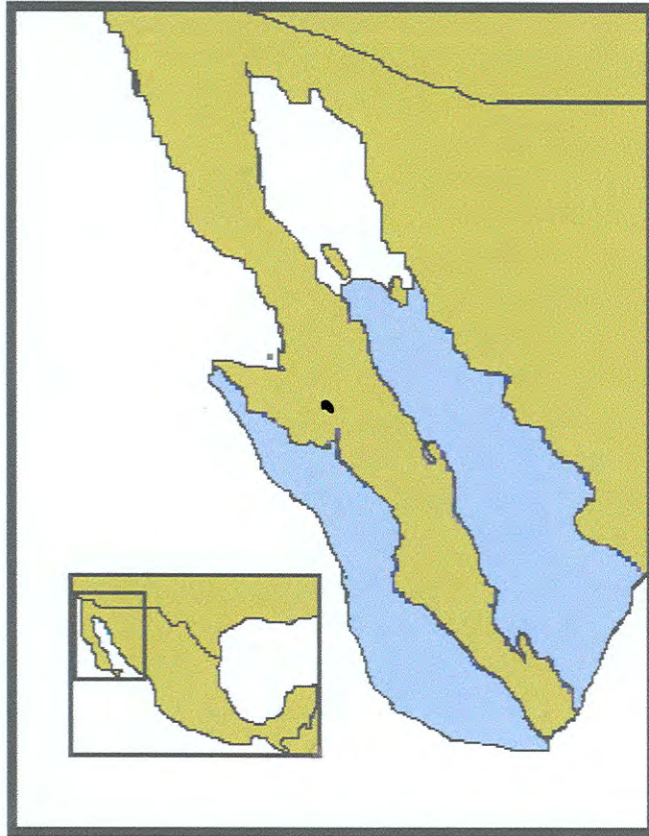


Figura 2. Zona de Mayor biomasa de *Dosidicus gigas* (Golfo de California)
Fuente: FAO, 2003.

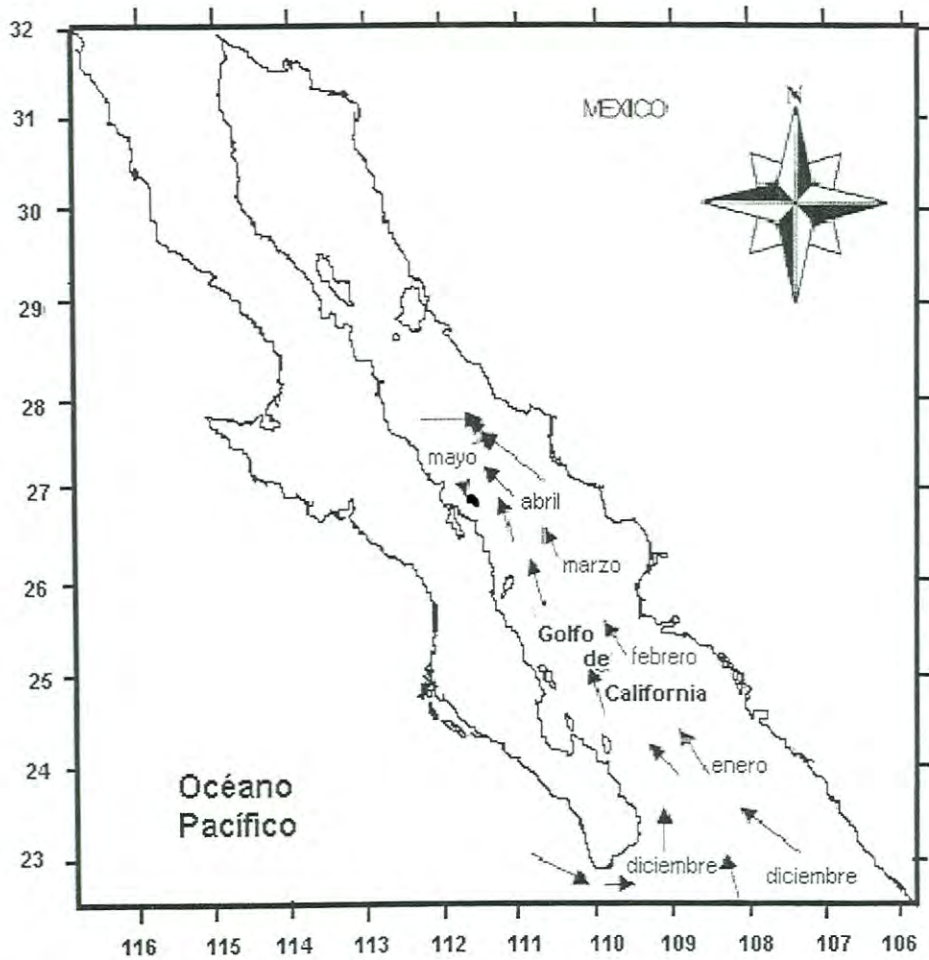


Figura 3. Migración de *Dosidicus gigas*, descrita por Ehrhardt *et al.* (1983) durante invierno-primavera.

Fuente: Morales-Bojórquez *et al.*, 2001.

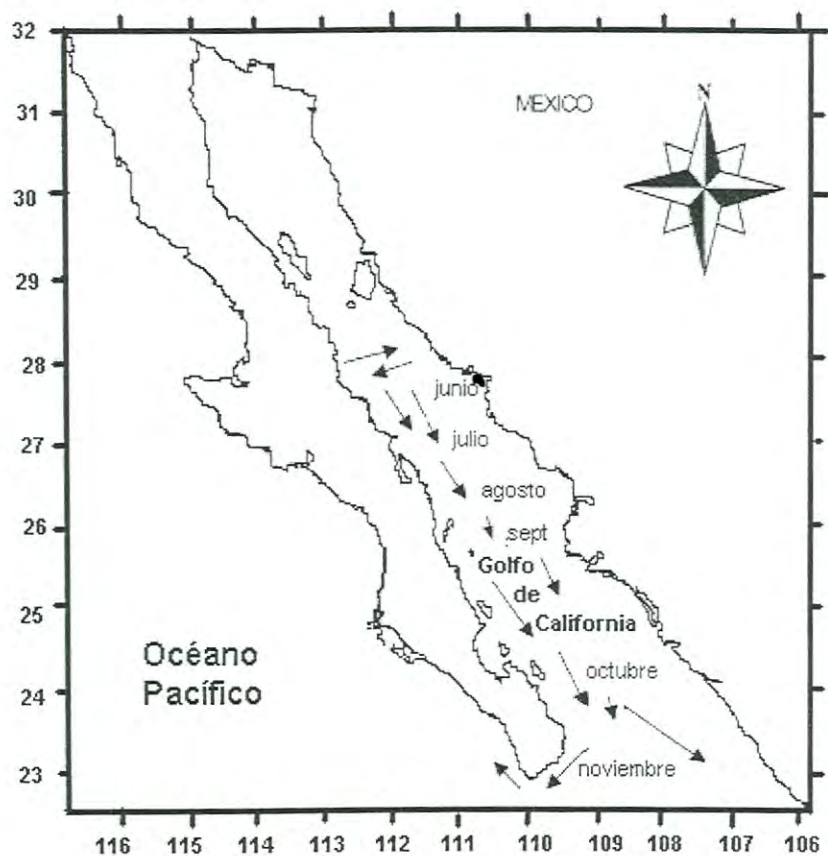


Figura 4. Migración de *Dosidicus gigas*, descrita por Ehrhardt *et al.* (1983) durante verano-otoño.

Fuente: Morales-Bojórquez *et al.*, 2001.

Morfología

El calamar gigante posee una cabeza relativamente grande al igual que su cerebro. En esta sección se encuentran 8 tentáculos cortos y 2 de mayor longitud con los que atrapan a sus presas y las aproxima a los otros tentáculos y a su boca, la cual presenta un par de dientes que asemejan el pico de un perico. Su cuerpo es esférico con dos aletas laterales en el extremo terminal del manto empleadas para dirección en el desplazamiento, el manto representa la mayor parte del organismo y su función es proporcionar protección a la cavidad interna en la cual se alojan las vísceras, el sistema locomotor (sifón) y el sistema nervioso central (Figuras 5 y 6). *Dosidicus gigas* se caracteriza por su alimentación voraz, es un predador activo de crustáceos, peces y calamares de menor tamaño, razón por la que presenta un rápido desarrollo, posee un ciclo de vida corto de máximo dos años y con altas tasas de crecimiento, alcanzando tallas de alrededor de los 87 cm de longitud de manto (LM) y peso máximo de 13 kg (Hernández-Herrera *et al.*, 1998). Otra característica de esta especie es la coloración de su músculo debida a cromóforos e iridocitos en su piel (Bjarnason, 1989). Esta coloración varía con el hábitat y va desde tonalidades rosas hasta morado.

La Pesquería de Calamar Gigante en México

Importancia. En México, el recurso calamar está compuesto de varias especies de los géneros *Loligo*, *Lolliguncula*, *Loliolopsis*, *Illex*, *Ommastrephes* y

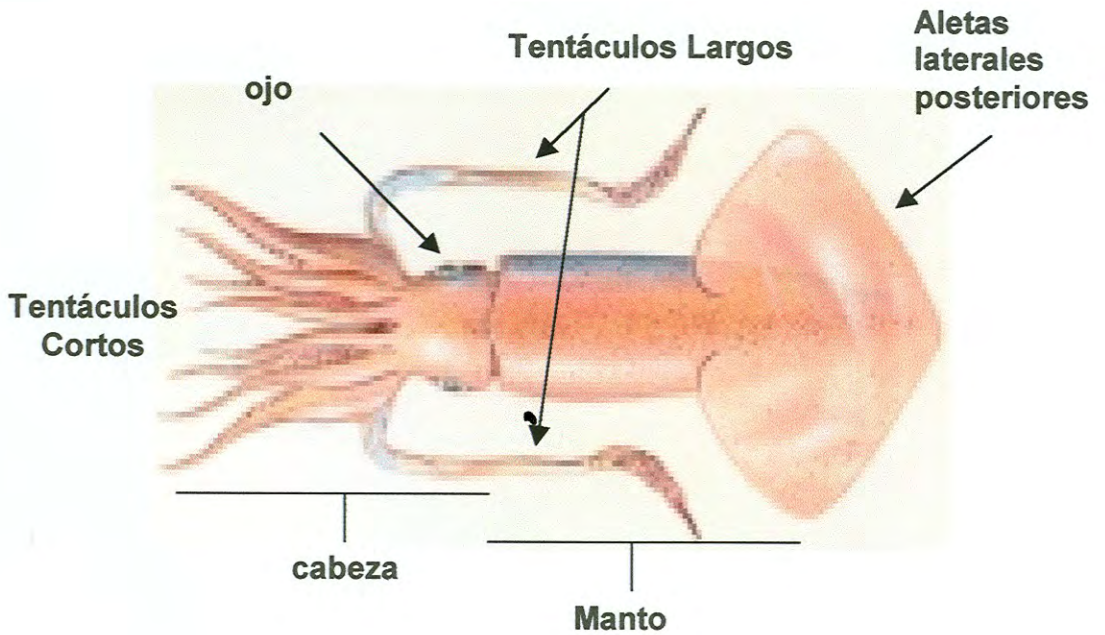


Figura 5. Morfología Externa de *Dosidicus gigas*.
Fuente: FAO, 2003.

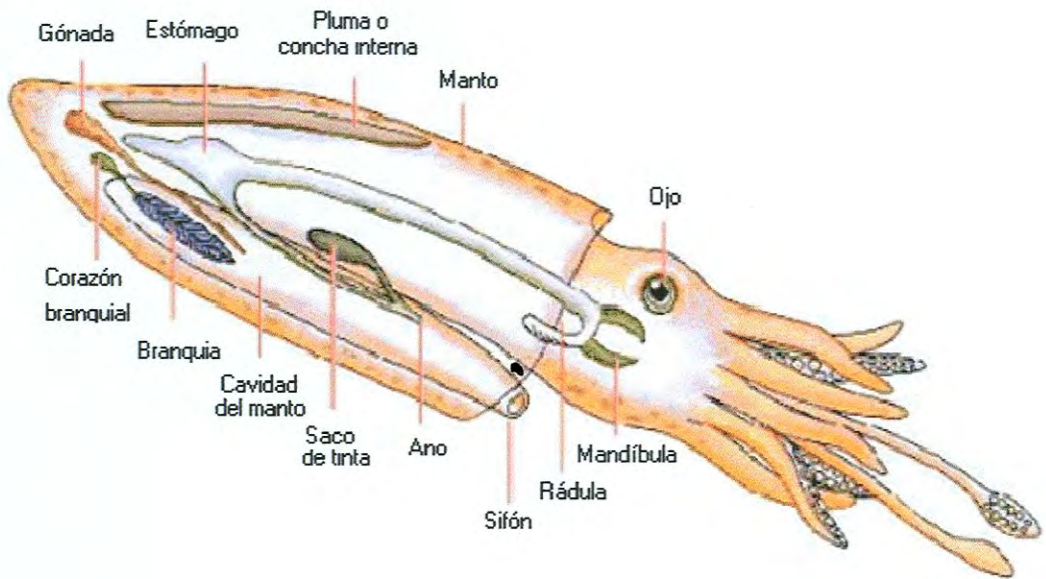


Figura 6. Anatomía interna del Calamar.
Fuente: Encarta® (1998).

Symplectoteuthis. La mayoría se pesca en forma incidental y solamente el calamar gigante *Dosidicus gigas* es la especie que constituye la única pesquería con un grado de desarrollo importante en el Pacífico norte de México (Semarnat, 2000). En 2001 y 2002 el volumen de captura de calamar gigante en Sonora fue de 43807 ton y 12482 ton respectivamente, aproximadamente el 36% de la producción total nacional (SAGARPA, 2002). Los ingresos en divisas de calamar en México fueron del orden de 17121 dólares por exportación de 12482 ton hacia el 2002 (SAGARPA, 2002).

A pesar de ello, la pesquería de calamar en nuestro país se considera en desarrollo, sin embargo debido a los esfuerzos realizados por la Secretaría de Pesca en conjunto con grupos de investigación, se ha tratado de lograr que las capturas se mantengan o bien aumenten, esto apoyado por el estudio de la biología de la especie relacionada con sus ciclos reproductivos, permitiendo que mediante “el escape” de especies en edad reproductiva el recurso no se agote (Névarez-Martínez *et al.* 2000; Nigmatullin, 2001).

Los principales países que compran el calamar gigante a México son Corea del Norte, Japón, Corea del Sur, Hong Kong, Estados Unidos, Chile y España. Tanto el mercado nacional como el internacional están sujetos a la demanda, para el mercado nacional se presenta en filete congelado y enlatado, para otros países se procesa como filete congelado, filete precocido, precocido con sal, precocido con azúcar, con ambos o con otros sazonadores (Semarnat, 2000).

En la pesquería de calamar al igual que el resto de las pesquerías en nuestro país, solo se aprovecha la parte comestible y el resto es desechado. Estos desechos pueden ser empleados para obtención de enzimas y otros subproductos de alto valor comercial. Si se considera el hecho de que existe poca investigación en especies de aguas tropicales en general, particularmente, en *D. gigas* existen muy pocos estudios. Las investigaciones orientadas al estudio de la utilización de los desechos de calamar gigante como fuente de enzimas (la parte comestible o manto solo representa el 42%) puede dar un valor agregado a la industria e impulsar un desarrollo sustentable y redituable de la misma.

Tecnología Enzimática

La tecnología enzimática involucra la obtención y aprovechamiento de enzimas, debido a que éstas son una herramienta importante en la biotecnología, procesamiento de alimentos y otras industrias. Existe una demanda considerable de enzimas con determinadas propiedades para usos muy específicos (Haard, 1990; Garcia-Carreño, 1991).

Para entender la importancia de la tecnología enzimática es necesario conocer las características de las enzimas y las cualidades que poseen para ser

consideradas compuestos de utilidad en la industria de alimentos, principalmente.

Generalidades de las Enzimas

Las enzimas son proteínas que controlan de manera específica las reacciones químicas fundamentales para la vida de todos los organismos. Las definiciones de enzimas varían dependiendo del autor, pero una definición sencilla es “enzima es una proteína con propiedades catalíticas debido a su poder específico de activación” (Whitaker, 1994), sin embargo, este concepto se ha modificado debido a que actualmente se conocen algunas moléculas de ácido ribonucleico (ARN) que pueden actuar como catalizadores biológicos (Whitaker, 1994).

Las enzimas cumplen con numerosas funciones en la célula, una de ellas es ayudar a convertir al alimento en energía y nuevo material para crecimiento y reparación de los órganos en los que se encuentran (Mathewson, 1998). Como catalizadores, están involucradas en la modificación de proteínas durante los procesos orgánicos como digestión y mecanismos postmortem de ablandamiento (enzima edógenas) y deterioro (enzimas endógenas y exógenas) de la carne (Haard, 1995).

Debido a su naturaleza proteica las enzimas son susceptibles a la pérdida de poder catalítico por condiciones que desnaturalicen a la proteína, son hidrolizadas por proteinasas y son fáciles de modificar aplicando la ingeniería de proteínas y técnicas de recombinación de ADN (Haard, 1995).

Características Importantes en el Estudio de las Enzimas

El hecho de que las enzimas sean proteínas les confiere características de inestabilidad bajo condiciones específicas. La pérdida o modificación de alguno de los niveles de organización (cuaternario, terciario, secundario y/o primario) estructural de la enzima con relación a su estado activo provoca desde una inactivación que puede ser reversible, hasta la pérdida completa de su poder catalítico, por lo que es indispensable tomar en cuenta todos los factores que pueden afectar la actividad enzimática cuando se trabaja con estas moléculas biológicas.

Factores que Afectan la Velocidad de Reacción de una Enzima

La velocidad a la cual ocurre una reacción catalizada por enzimas depende de varios factores, los más importantes son: la concentración de enzima, la concentración y especificidad de los ligandos (substratos, productos, inhibidores y activadores), el pH, la fuerza iónica y la temperatura (Segel, 1968).

Concentración de enzima. Una reacción catalizada por una enzima procede de 10^6 a 10^{15} veces más rápida que sin catalizar (Segel, 1968). Para una catálisis adecuada es necesario tener una concentración apropiada de enzima para obtener la máxima velocidad; una concentración elevada de enzima aumenta la velocidad de formación de productos, pero esto no siempre resulta deseable, ya que la concentración de enzima en el medio de reacción dependerá del resultado que se desea obtener (Godfrey y Reichelt, 1983).

Concentración y especificidad de ligandos. Entre los ligandos se incluyen los substratos, los productos, los inhibidores y los activadores.

Substratos.

- a) **Especificidad:** La especificidad de una enzima incluye la naturaleza química del substrato y el tipo de transformación química (Haard, 1995); pequeñas modificaciones en la estructura del substrato puede provocar que la enzima sea incapaz de realizar la catálisis (Whitaker, 1994).
- b) **Concentración:** La saturación de la enzima con substrato (elevadas concentraciones de substrato) conllevan a que la velocidad de reacción sea independiente de la concentración de substrato y dependa exclusivamente de la concentración de enzima (orden cero) (Segel, 1968). En ese momento se alcanza la velocidad máxima (V_{max}), ya que las colisiones exitosas se

obtienen más rápidamente, asegurando que muchas enzimas formen el complejo enzima-substrato (Mathewson, 1998).

Productos. Los productos generados en una reacción enzimática pueden ser responsables de la disminución en la velocidad debido a que la acumulación de éstos en el medio producen cambios que pueden afectar a la enzima y modificarla.

Inhibidores. Cualquier compuesto que reduce la velocidad de reacción es un inhibidor (Segel, 1968; Stauffer, 1989; Whitaker, 1994). El grado y tipo de inhibición dependen de la naturaleza y concentración del inhibidor. Algunos inhibidores compiten con el substrato por el sitio activo (Inhibición competitiva), otros pueden unirse tanto a la enzima libre como al complejo enzima-substrato (Inhibición no competitiva) y finalmente, existen inhibidores que se unen exclusivamente al complejo enzima-substrato (Inhibición acompetitiva); todos estos tipos de inhibición pueden ser reversibles o irreversibles (Whitaker, 1994).

Activadores. La actividad de algunas enzimas depende exclusivamente de su estructura proteica, otras en cambio, necesitan de cofactores que pueden ser de naturaleza orgánica como las coenzimas o bien un ión metálico, que debe formar un complejo enzima-cofactor (holoenzima) para estar en su forma activa, cuando se separa del cofactor (apoenzima) pierde su actividad (Lehninger, 1995).

pH. Los sitios activos de las enzimas están frecuentemente compuestos de grupos ionizables. Este carácter iónico es necesario para mantener la conformación del sitio activo, unir substratos o catalizar la reacción (Segel, 1968). La capacidad que tengan los aminoácidos presentes en el sitio activo para interactuar con un substrato, depende de su estado electrostático y su orientación espacial. Si el pH es inadecuado, la carga sobre uno o todos los aminoácidos requeridos no permitirá la unión con el substrato y por consiguiente la catálisis no se realizará. Las enzimas presentan rangos de pH para llevar a cabo una catálisis eficiente (Matewson, 1998); la mayoría poseen un pH de máxima actividad (óptimo) (Berk, 1980; Lehninger, 1995; Fersht, 1999). El pH óptimo depende de diversos factores como tiempo de reacción, temperatura, naturaleza y concentración de substrato, naturaleza y concentración del amortiguador empleado, fuerza iónica del medio de reacción, pureza de la enzima, entre otros (Segel, 1968).

Fuerza iónica. Debido a sus características proteicas las enzimas son afectadas por la fuerza iónica del medio de reacción. Valores adecuados en la fuerza iónica favorecen estabilidad de la enzima y la conformación del sitio activo, en algunos casos es necesaria la presencia de ciertos iones en el medio de reacción para mantener la actividad de la enzima (Fersht, 1999).

Temperatura. El efecto de la temperatura es similar al del pH. En algunos casos puede aumentar la velocidad de reacción y en otros inactivar la enzima (Stauffer, 1989). El aumento de calor en el sistema ayuda a superar la barrera de energía de activación, debido a que se incrementa el movimiento de las moléculas en solución, provocando un aumento en las colisiones de los reactantes, esto eleva la posibilidad de que el substrato se sitúe en el sitio activo y se realice la catálisis (Whitaker, 1994). La velocidad de reacción se aumenta generalmente con el aumento de la temperatura dentro del intervalo de estabilidad de la enzima. La velocidad de muchas reacciones enzimáticas se duplican aproximadamente por cada 10°C de aumento en la temperatura ($Q_{10}=2$) (Lehninger, 1995).

Fuentes Enzimáticas

Tradicionalmente se conocen tres fuentes básicas de enzimas: células vegetales, animales y microbianas (Fowler, 1996). En un principio las fuentes tradicionales de enzimas fueron las plantas y animales (Fowler, 1996; Mathewson, 1998). El proceso de obtención de enzimas a partir de estas fuentes consistía en picar y macerar en un líquido adecuado a las plantas o músculo, después eliminaban el material sólido por filtración y el líquido que contenía la actividad enzimática era concentrado por evaporación. Este proceso

cambió con el auge de aplicación de enzimas en procesos industriales, ya que aumentó la demanda de éstas. Debido a que las enzimas de origen microbiano poseen propiedades más adecuadas de termoestabilidad, resisten más las fluctuaciones del pH y son más fáciles de producir en cantidades industriales, la fermentación microbiana ha reemplazado a los extractos de plantas y animales en la producción industrial de enzimas (López, 1987).

A pesar de que la producción de enzimas por fermentación microbiana es un método más eficiente de manufactura, es un proceso complicado en constante evolución. A pesar del gran potencial que representan las enzimas microbianas, solo algunas especies de microorganismos son utilizadas para producir enzimas industriales. El costo de conseguir un microorganismo aprobado por las autoridades regulatorias es considerable y muy pocos de estos microorganismos han sido estrictamente evaluados y aceptados como seguros o productos GRAS (Generally Recognized As Safe), es decir, sustancias usadas en alimentos que han sido aprobadas como seguras para su uso durante un período de tiempo (Simpson y Haard, 1987; Haard, 1995). Por otro lado las enzimas obtenidas de ganado han sido restringidas a pocas partes de animales como el estómago de bovino y porcino (Simpson y Haard, 1987) y no se conocen adecuadamente sus características de catálisis, además su disponibilidad es dependiente de las políticas y reglamentaciones agrícolas que controlan la producción de ganado para matanza (Godfrey y Reichelt, 1983). Sin embargo, con el uso de técnicas de biología molecular, la industria es capaz

de emplear microorganismos GRAS para producir enzimas tradicionalmente obtenidas de otros microorganismos, animales o plantas (Haard, 1995).

Las enzimas aisladas de organismos acuáticos han sido recientemente consideradas para uso industrial. Existen reportes de enzimas purificadas de pescado y moluscos en Japón. En países como Islandia, Gran Bretaña y Dinamarca, se desarrolla la explotación comercial de algunas enzimas purificadas de organismos acuáticos (Haard, 1993). Las tendencias actuales en tecnología enzimática van encaminadas al aprovechamiento de los desechos originados en industrias como la pesquera, considerando el hecho de que los desechos originados (principalmente las vísceras) contiene una gran cantidad de proteasas con características muy particulares y que son consideradas como "seguras". La investigación encaminada al estudio de estas fuentes de enzimas es sumamente importante, un ejemplo es Noruega, país en el que empieza a comercializarse proteasas digestivas y otras enzimas de los desechos de la pesca (Haard, 1993).

Proteasas de Origen Marino

Al igual que las proteasas de plantas, animales y microorganismos, las proteasas digestivas de animales marinos son hidrolíticas y catalizan el rompimiento de enlaces peptídicos con la participación de moléculas de agua como reactantes. En términos de su aplicación a la industria de alimentos (y otras industrias), las proteasas son muy importantes (Simpson, 2000). Las

proteasas constitutivas importantes en productos pesqueros están presentes en células musculares, matriz extracelular y tejido conectivo circundantes a las células musculares, sistema digestivo y otros órganos (Haard, 1995).

Clasificación de proteasas digestivas de animales marinos. Las proteasas digestivas de animales marinos pueden ser clasificadas por los mismos criterios usados para las proteasas de otros animales, plantas y microorganismos. En base al método estándar de clasificación propuesto por la Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímicos (IUB), basada en el modo de catálisis, las proteasas digestivas de animales marinos son clasificadas dentro de 4 categorías: ácidas o aspartil proteasas, serin proteasas, thiol o cisteína proteasas y metaloproteasas (Simpson, 2000).

Proteasas ácidas. Son un grupo de endoproteasas caracterizadas por una alta actividad a pH ácido. El término "aspartil" (o carboxil proteasas) se debe a que sus sitios catalíticos están compuestos de grupos carboxilos de dos residuos de ácido aspártico. Las proteasas ácidas más comunes purificadas y caracterizadas de estómagos de animales marinos son: pepsina (EC. 3.4.23.1) que hidrolizan preferentemente aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina y triptófano; quimosina (renina) (EC. 3.4.23.4) con especificidad similar a pepsina y gastricina (pepsina C) (EC. 3.4.23.3) con especificidad preferencial sobre tirosina (Simpson, 2000).

Serina proteasas. Son endoproteasas que se caracterizan por la presencia de un residuo de serina junto con un grupo imidazol y un grupo carbonilo de aspártico en sus sitios activos. Son inhibidas por DFP (diisopropilfluorofosfato), debido a que reacciona con el grupo hidroxilo del residuo de serina del sitio activo. Las principales en organismos marinos son: tripsina (EC. 3.4.21.4) que actúa sobre enlaces peptídicos hacia el carboxilo de arginina y lisina; quimotripsina (EC. 3.4.21.1) que hidroliza en enlaces peptídicos que involucran aminoácidos con cadenas largas y aminoácidos no polares como tirosina y elastasa (EC. 3.4.21.11) cuya especificidad es preferencial por alanina, valina y glicina (Simpson, 2000).

Cisteína proteasas. Estas enzimas contienen residuos de cisteína e histidina en sus sitios activos y requieren de grupos –SH disponible para que el residuo de cisteína permanezca intacto y poder realizar la catálisis, estas enzimas son inhibidas por metales pesados. Un ejemplo de este tipo de enzimas en glándulas digestivas de organismos marinos es catepsina B (EC. 3.4.22.1) (Simpson, 2000).

Metaloproteasas. Son enzimas hidrolíticas cuya actividad depende de la presencia y unión de cationes divalentes. Estudios de modificaciones químicas sugieren que pueden contener un residuo de tirosina y uno de imidazol asociados con el sitio activo. Son inhibidas por agentes quelantes como 1,10-fenantrolina y EDTA (etilendiamintetracético), en algunos casos se inhiben por un proceso de diálisis. La mayoría de las metaloproteasas

conocidas son exopeptidasas. Todas tienen en común los primeros tres dígitos de la clasificación EC. 3.4.24. (Simpson, 2000).

Todas las enzimas mencionadas son importantes en el proceso de digestión de proteínas en organismos marinos, este proceso involucra primeramente una hidrólisis por enzimas proteolíticas que incluyen endopeptidasas y exopeptidasas. Las endopeptidasas hidrolizan proteínas mediante cortes internos de enlaces peptídicos y las exopeptidasas actúan con rompimientos consecutivos $-\text{COOH}$ o $-\text{NH}_2$ (o NH) de aminoácidos terminales del final de una cadena peptídica y son llamadas carboxi- y aminopeptidasas respectivamente, estas enzimas en conjunto con otras exopeptidasas, aseguran la viabilidad de aminoácidos libres que pueden ser absorbidos por el lumen del tracto digestivo (De la Ruelle *et al.*, 1992).

En los últimos años el estudio de las exopeptidasas y particularmente las aminopeptidasas de organismos marinos ha tomado gran relevancia, debido a las cualidades que estas enzimas pueden impartir a los alimentos proteicos (hidrolizados y madurados), ya sea que las enzimas sean agregadas como parte de la formulación por la adición de músculo o bien se adicionen en forma de extractos crudos y semipurificados a partir de las vísceras de diversas especies (Raksakulthai y Haard, 2003)

Aminopeptidasas

Características Generales

Las aminopeptidasas son enzimas ampliamente distribuidas en muchos tejidos o células superficiales y en solución en forma de secreción de plantas y animales (vertebrados e invertebrados) (Taylor, 1993; Hajjou y Le Gal, 1994; Fanuel *et al.*, 1999) y son exopeptidasas que catalizan la hidrólisis de residuos de aminoácidos por el extremo amino de sustratos peptídicos.

Las clasificaciones de las aminopeptidasas que se utilizan han dependido del interés del investigador. Los criterios van desde el número de residuos que remueve del sustrato, el grado de rompimiento de los péptidos, contenido de iones metálicos, localización y susceptibilidad a inhibidores. Debido a que todos estos criterios pueden ser empleados, existen una serie de nombres no exclusivos, por lo que debe caracterizarse perfectamente a las aminopeptidasas (AP) para distinguir entre ellas y evitar confusiones (Taylor, 1993).

Muchas son L-aminopeptidasas, es decir, los productos liberados por su acción sobre sustratos peptídicos son L-aminoácidos. Estas AP exhiben una gran variedad de masas moleculares, estructuras cuaternarias, residuos catalíticos y perfiles específicos (Fanuel *et al.*, 1999). Se ha reportado la presencia de tres tipos de actividad aminopeptidasa en tejidos humanos, el primer tipo tiene propiedades de leucina-AP (LAP), la actividad de esta enzima se caracteriza por la activación con iones Mn^{+2} y Mg^{+2} (su nombre deriva del

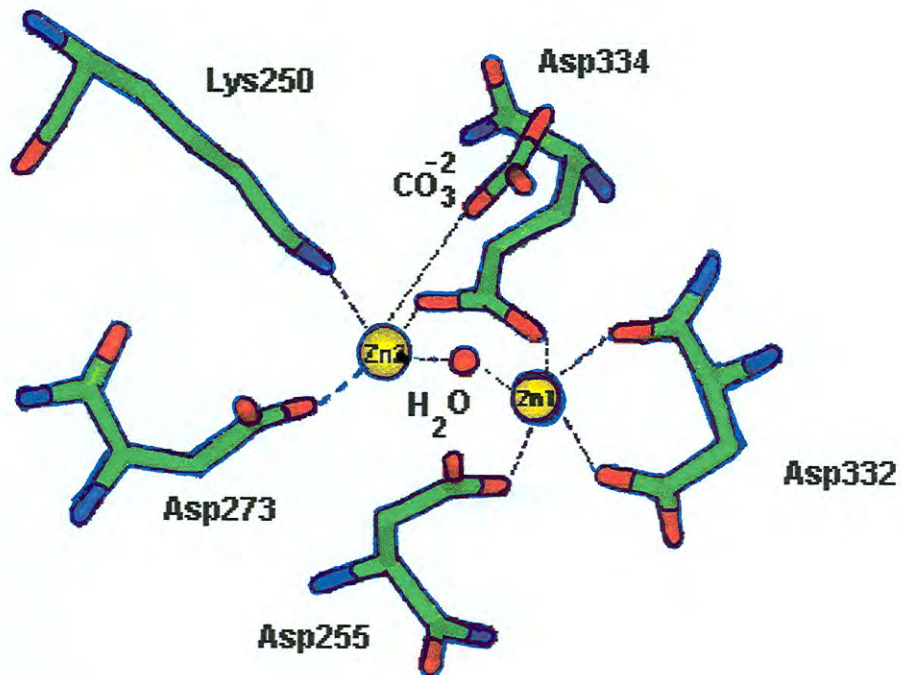


Figura 7. Sitio activo de Leucina-aminopeptidasa mostrando la unión de dos iones de Zn^{+2} y los aminoácidos involucrados. Lys: residuo de lisina. Asp: residuo de aspártico.

Fuente: Protein Data Bank (PDB), 2003.

Mecanismo de Catálisis

Mediante la unión con inhibidores específicos como bestatin [(2S,3R)-3-amino-2-hidroxy-4-fenil-botanoil]-L-leucina hidrocloreto] y L-leucinal, se ha logrado caracterizar el sitio activo y proponer mecanismos de catálisis. Cada subunidad de bLAP une una molécula del inhibidor. La estabilización de la unión con bestatin involucra los residuos Lys262, Asp273 y Leu360 mediante puentes de hidrógeno (Taylor, 1993) y la estabilización con L-leucinal involucra Lys262 y Arg336.

Los mecanismos propuestos involucran directamente a los iones de Zn^{+2} presentes en el sitio activo. El mecanismo de catálisis propuesto para Leu-AP mediante el empleo de L-leucinal consiste en que el sustrato se une con la N-terminal del amino libre alrededor del Zn_2 y el grupo carbonil, sexto ligando del Zn_1 (Figura 8a). El paso siguiente es un ataque nucleofílico del Zn mediante una molécula de agua (o ión hidroxilo). Esta enzima requiere dos iones Zn^{+2} para activar la catálisis de la molécula de agua. Ambos iones, Lys262 y tres moléculas de agua unidas mediante puentes de hidrógeno con Arg336 estabilizan el estado de transición. En cuanto al mecanismo elucidado por la unión con bestatin, sugiere dos sitios de unión: S_1 , formado por Met270, Thr359, Gly362, Ala451 y S_1' , formado por Ala330, Ala333, Ile421 (Figura 8b). La hidrólisis es iniciada por atracción electrofílica entre el oxígeno del carbonilo del enlace peptídico a hidrolizar y el Zn^{+2} . El grupo hidroxilo del agua o el ligando de Zn^{+2} , provee un ataque nucleofílico sobre el carbono del carbonilo

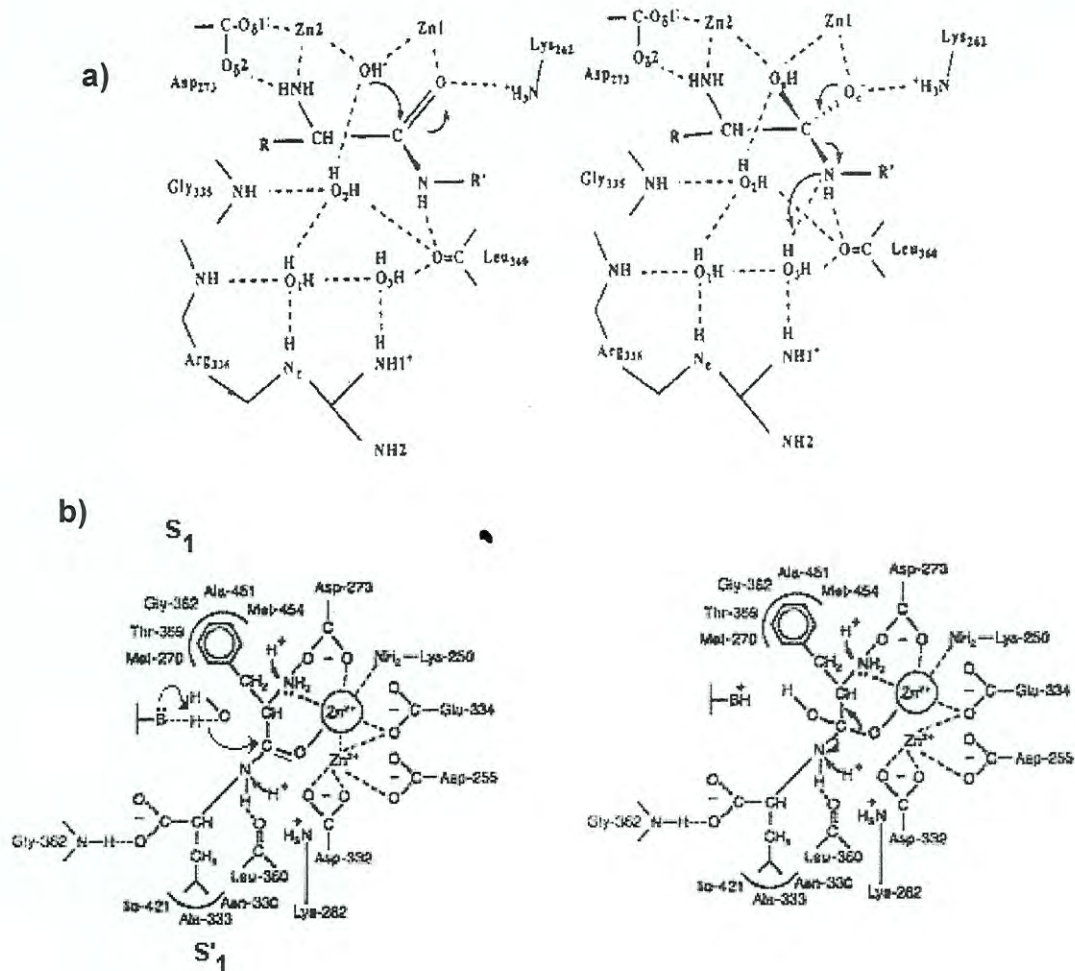


Figura 8. Mecanismos de catálisis propuestos para Leucina-aminopeptidasa de bovino. (a) Mecanismo propuesto mediante la unión con L-Leucinal (PDB. 2003). (b) Mecanismo propuesto mediante la unión con bestatin (Taylor, 1993).

del enlace a hidrolizar y forma un tetraedro intermedio el cual es estabilizado por Zn^{+2} con puentes de hidrógeno. Cuando el tetraedro se colapsa, el resultado es la hidrólisis.

Importancia

Las AP tienen varias funciones biológicas, entre las cuales se han sugerido la maduración de proteínas, degradación terminal de proteínas, regulación del nivel hormonal y control del ciclo celular. Ciertas alteraciones en la actividad de AP se han asociado con una variedad de condiciones y patologías incluyendo envejecimiento, cánceres, cataratas, fibrosis quística y leucemias (Taylor, 1993).

Las AP participan en los procesos de suplementación de aminoácidos y energía durante el periodo de ayuno y/o diferenciación y degradación de péptidos exógenos hasta aminoácidos para nutrición (Taylor, 1993). Estas enzimas tienen aplicación industrial, ya que por su acción específica son efectivas para lograr aumentar las cualidades de ciertos productos alimenticios.

Usos de Aminopeptidasas en la Industria de Alimentos

Las AP tienen usos industriales empleándose en la modificación del amino terminal en proteínas (Taylor, 1993). Pueden estar presentes en los ingredientes alimentarios en forma natural o adicionarse con el fin de proveer ciertas características de calidad a los productos.

Se han reportado numerosos estudios de la influencia de AP en el desarrollo de los sabores característicos de muchos alimentos proteicos, reducción del tiempo de producción y en la reducción y/o eliminación de sabores amargos en hidrolizados de proteínas. Por ejemplo, se ha encontrado que la Glu-AP tiene importancia en el proceso de madurado de la carne. La actividad de Glu-AP de la carne disminuye con el avance del proceso de madurado por efectos de pH y por depleción de substratos (Sekikawa *et al.*, 1999).

Se han relacionado las actividades de Leu-, Arg-, Ala-, Tyr- y Glu-AP con la cantidad de los aminoácidos libres de músculo y tejido adiposo en jamones frescos y seco-curados (Toldrá *et al.*, 1992; Virgili *et al.*, 1998). Durante el curado de jamones secos-curados la actividad AP se mantiene y provoca un incremento en la concentración de ácido glutámico, arginina, alanina, valina, leucina y lisina, que contribuyen al desarrollo de sabores característicos del producto. Toldrá *et al.* (1993) encontraron una relación entre la alta actividad AP y un sabor amargo menos intenso en jamones elaborados con carne de puerco (fresca o madurada).

En otro estudio se determinó que la AP proveniente de *Penicillium camemberti* (prolina-AP) en conjunto con carboxipeptidasa del mismo microorganismo, juegan un papel importante en el desarrollo de sabores característicos del queso tipo Camembert durante la maduración (Fuke y Matsuoka, 1993). Así mismo, en la obtención industrial de D,L-aminoácidos se

utiliza LAP proveniente de *Pseudomonas putida* (ATCC 12633) (Hermes *et al.*, 1993).

Por otro lado se ha reportado que el sabor amargo de un péptido es proporcional al número de aminoácidos hidrofóbicos en el N-terminal. Las exopeptidasas como las LAP pueden hidrolizar los aminoácidos hidrofóbicos y por lo tanto son indispensables en la preparación de hidrolizados de proteínas para eliminar el sabor amargo (Kuo *et al.*, 2003).

Utilización Tecnológica de Aminopeptidasas de Origen Marino

Existen pocos estudios de la aplicación de AP marinas en la industria de alimentos, la mayoría de estos relacionados con el contenido enzimático de la materia prima empleada en la producción de hidrolizados proteicos como la salsa de pescado: se ha detectado que el aumento en la actividad aminopeptídica durante el proceso de fermentación es responsable directo de las características sensoriales del producto (Thanh *et al.*, 1984); en otros estudios se ha determinado el efecto de suplementar con especies subutilizadas procesos que requieren de estas enzimas, dentro de éstos destacan las investigaciones realizadas por Raksakulthai y Haard (1992), en los cuales se determinó que la adición de harina de capelin (*Mallotus villosus*) al proceso de producción de salsa de pescado a partir de sardinas, aceleraba la fermentación y se obtenía un producto con un sabor deseable gracias a la acción de dipeptidil-AP contenida en la harina de esta especie.

En otra investigación realizada por Raksakulthai *et al.* (2002) se adicionaron distintas concentraciones de una fracción AP de hepatopáncreas de calamar del atlántico (*Illex illecebrosus*) durante el proceso de maduración de queso cheddar con el fin de eliminar péptidos amargos y disminuir el tiempo de madurado, logrando obtener un producto con el sabor característico cheddar al mes de maduración en lugar de un tiempo superior a 3 meses, los cuales son necesarios para desarrollar el sabor característico del producto sin la adición de esta enzima en el proceso.

A pesar de estas investigaciones, actualmente no existen estudios relacionados con la obtención aminopeptidasas provenientes de especies tropicales como el calamar y su uso en la industria de alimentos.

MATERIALES Y METODOS

Muestras

Para el desarrollo de esta investigación se emplearon 4 organismos con talla promedio de 1.2175 m (\pm 0.1028) y peso de 5005 g (\pm 1325). Los calamares fueron capturados en Guaymas, Sonora en el mes de enero del 2003. Para su traslado a la ciudad de Hermosillo los calamares fueron colocados en camas de hielo y mantenidos a una temperatura no mayor de 0 °C. El trayecto desde el lugar de captura al punto de proceso tuvo una duración aproximada de 8 h. Posteriormente los organismos se pesaron, midieron y evisceraron para obtener la glándula digestiva o Hepatopáncreas (HP). El peso de cada hepatopáncreas se registró, se congelaron a -20 °C y se liofilizaron. Después se molieron en un mortero y se eliminó el tejido epitelial. Los hepatopáncreas molidos se conservaron a una temperatura de -20 °C para su análisis posterior.

Etapas de purificación

Obtención de la Fracción Aminopeptídica

Para obtener la fracción con actividad aminopeptidasa se siguió el protocolo de semipurificación reportado por Raksakulthai *et al.*, (1999), para HP

de calamar de la especie *Illex illecebrosus* con algunas modificaciones. El hepatopáncreas se añadió a una solución amortiguadora de Tris-HCl 200 mM, pH 7.2, a una concentración de 10 mg/mL. La mezcla se incubó por 20 h a 0°C y posteriormente se centrifugó a 10000 g por 30 min a 0 °C, descartando el precipitado y conservando el sobrenadante (S1). S1 se incubó con sulfato de zinc 5 mM a 25°C por 25 min y se enfrió en un baño de hielo, se centrifugó a 10000 x g por 30 min a 0°C, el precipitado se descartó y se conservó el sobrenadante (S2). S2 fue fraccionado con sulfato de amonio (20 a 80 % de saturación), las fracciones fueron colectadas y disueltas en un cantidad mínima de Tris-HCl 50 mM, pH 7.2 (S3). La fracción S3 se dializó por 48 horas empleando una membrana para diálisis (Spectra/Por membrane) MWCO = 50000 Da, contra Tris-HCl 50 mM, pH 7.2 conteniendo 25 mM de sulfato de zinc (S4). La fracción S4 se centrifugó a 10000 x g por 30 min a 0°C, el precipitado se descartó y el sobrenadante (S5) se distribuyó en viales y se congeló a -20°C para su posterior aplicación al sistema de purificación.

Cromatografía de Intercambio Iónico

Matriz. Se empleó una matriz de celulosa con intercambiador aniónico DEAE (dietil-aminoetil-celulosa), la cual se activó lavando 7 g de DEAE-Celluloc (Amersham Life Science) en 500 ml de NaOH 0.25 M, NaCl 0.25 M, seguido de 2 lavados con agua desionizada, filtrada y desgasificada, evitando la formación de burbujas. Se realizó un lavado con HCl 0.25 M con el fin de neutralizar la

matriz, el ácido se sifoneó para eliminar las partículas finas suspendidas y se realizaron lavados subsecuentes con agua, hasta eliminar todas las partículas finas que fuese posible. Finalmente se agregó a la matriz buffer Tris 0.5 M, pH 8.5, 0.2 M NaCl, en una relación (1:3 v/v), evitando la formación de burbujas de aire, con este buffer se lavó 5 veces.

Empacado. El proceso de empacado de la columna es uno de los pasos críticos de la cromatografía, un mal empacado reduce la eficiencia del sistema. Durante el empacado de la columna se debe evitar la inclusión de aire y partículas extrañas, ya que la presencia tanto de burbujas como de impurezas disminuyen la eficiencia y obstruyen puntos de interacción entre el compuesto que se desea purificar y el intercambiador presente en la matriz. Por lo anterior, estos problemas deben evitarse y para ello es necesario que las soluciones empleadas se encuentren filtradas, desgasificadas y libre de iones ajenos a los que se empleen para el intercambio (Pharmacia, 1991).

El procedimiento de empaque consistió en llenar una columna de acrílico con un diámetro interior de 1.6 cm y 25 cm de longitud colocada en un soporte de forma vertical y conectada a una bomba Econopump de Bio Rad, con buffer Tris 50 mM, pH 8.5, 0.2 M NaCl. El llenado se realizó escurriendo por las paredes internas de la columna la matriz previamente activada, evitando en todo momento la inclusión de aire al sistema y permitiendo que la matriz se compacte por efecto de gravedad hasta una altura aproximada de 1 cm, posteriormente se encendió la bomba y se programó a un flujo de 5 mL/min. Se

siguió vertiendo matriz y buffer sin permitir que la matriz se secase, hasta alcanzar una altura de 15 cm.

Condiciones de corrida. La temperatura mantenida en el sistema durante toda la corrida fue de 0°C, lo cual se logró cubriendo la columna con hielo. El volumen de muestra inyectado a la columna por corrida fue de 5 mL y la elusión se realizó empleando un gradiente de 0 a 0.35 M NaCl, en buffer Tris 50 mM, pH 8.5. Se recolectaron 52 fracciones de 5 ml cada una, a las cuales se les determinó absorbancia a 280 nm para localizar los picos de proteína. Además se determinó la concentración de proteína a cada fracción por el método de Bradford (1976), empleando como estándar albúmina de suero de bovino (1 mg/mL) marca Sigma con 95% de pureza. A cada fracción colectada se le determinó actividad aminopeptidasa empleando la técnica de Pfeiderer (1970), este ensayo consistió en añadir 0.05 mL de la fracción a 0.95 mL del substrato L-Leucina-p-Nitroanilida (Leu-p-NA) en una concentración de 0.75 mM en buffer fosfatos 50 mM, pH 7.2. La reacción se llevó a cabo a 37°C por 30 min y se detuvo con 0.25 ml de ácido acético al 30%. La acción de la AP produce p-Nitroanilida, la cual se detecta espectrofotométricamente a 405 nm. Las unidades de actividad se definieron como el cambio de absorbancia por minuto bajo las condiciones del ensayo ($\Delta\text{Abs}_{405\text{nm}}/\text{min}$). La actividad específica se expresó como unidades de actividad por mg de proteína (U/mg proteína).

Caracterización

La cinética enzimática es una herramienta utilizada para determinar los factores que afectan las reacciones catalizadas por enzimas. Los factores más importantes son la concentración de la enzima, la concentración de ligandos (substratos, productos, inhibidores y activadores), el pH, la fuerza iónica y la temperatura. Cuando las propiedades de todos esos factores son analizados, es posible comprender la naturaleza de la reacción (Segel, 1968). Variando la concentración de sustrato es posible deducir el mecanismo cinético de reacción, es decir, el orden en que la enzima reduce a los sustratos, se liberan los productos y si esto tiene un orden o se lleva a cabo al azar (Segel, 1968).

Para la caracterización de la enzima purificada es necesario determinar los parámetros cinéticos de catálisis, así como determinar todas las condiciones requeridas para lograr la máxima actividad de la enzima que se estudia.

Determinación de Parámetros Cinéticos

Dentro de los parámetros cinéticos de importancia se encuentran la K_m (Constante de Michaelis) y la V_{max} (Velocidad máxima de reacción). La K_m es una constante de dinámica o pseudo-equilibrio que expresa la relación entre las concentraciones en el estado basal y las concentraciones una vez que alcanza el equilibrio. Esta constante es importante ya que es inherente a la enzima, por lo que el valor numérico provee una forma de comparación entre enzimas

(Segel, 1968); la V_{max} , es la cantidad de producto producida (ó sustrato consumida) por unidad de tiempo en la reacción enzimática y es dependiente de la concentración de la enzima en el ensayo y la constante de formación de producto (K_p) (Segel, 1968; Whitaker, 1994; Fersht, 1999).

Para determinar la K_m y la V_{max} se realizaron ensayos de actividad aminopeptidasa a diferentes concentraciones de sustrato (0.2 a 2 mM de L-Leucina-p-Nitroanilida). La cinética de reacción obtenida se linearizó mediante el método de Lineaweaver-Burk (Whitaker, 1994), el cual consiste en obtener la ecuación de una línea recta a partir de graficar el inverso de la velocidad de reacción contra el inverso de la concentración de sustrato. La V_{max} es el inverso de la intersección con el eje Y, la K_m es el producto de la pendiente por V_{max} .

Con estos parámetros se determinó la concentración de sustrato necesaria para alcanzar la velocidad máxima de catálisis ($K_m = \frac{1}{2} V_{max}$.) que se establece como la concentración de sustrato óptima a las condiciones experimentales.

Actividad Aminopeptidasa con Sustratos Específicos

La actividad de la aminopeptidasa purificada se probó con distintos sustratos (p-NA-aminoácidos) para determinar el tipo de actividad con mayor presencia en la fracción purificada. Los sustratos empleados fueron alanina-p-NA (ala-p-NA), prolina-p-NA (pro-p-NA), glicina-p-NA (gli-p-NA), leucina-p-NA

(Leu-p-NA), metionina-p-NA (met-p-NA), ácido L- γ -glutámico-p-NA (glu-p-NA) y lisina-p-NA (lis-p-NA). Todos los sustratos se emplearon en una concentración de 0.75 mM en buffer fosfatos 50 mM. pH 7.2, el ensayo de actividad se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Pfeiderer (1970).

Influencia del pH Sobre la Actividad Enzimática

Cuando se ha purificado una enzima es necesario conocer el efecto que tienen factores como el pH. Una enzima presenta su máxima actividad en un rango de pH específico (pH óptimo) (Segel, 1968; Fersht, 1999), éste valor es dependiente de varios parámetros experimentales (tiempo de reacción, temperatura, naturaleza y concentración de sustrato, naturaleza y concentración del amortiguador empleado, fuerza iónica del medio de reacción, pureza de la enzima, entre otros) (Segel, 1968; Whitaker, 1994).

Con el fin de determinar las condiciones óptimas de catálisis, se determinó la actividad de la enzima purificada en una serie de tubos a diferentes valores de pH, se empleó buffer citrato de sodio-HCl 50 mM, para pH de 3, 4 y 5; para pH de 6 y 7, buffer fosfato de sodio 50 mM; y para pH de 8 y 9, Tris-HCl 50 mM (Stauffer, 1989). Todos los ensayos de actividad se realizaron empleando como sustrato específico Leu-p-Na 0.75mM, 37°C, 30 min.

Influencia de la Temperatura Sobre la Actividad Enzimática

La temperatura es un factor de suma importancia en el control de la catálisis (Whitaker, 1994), ya que la velocidad de reacción se aumenta generalmente con el aumento de la temperatura dentro del intervalo de estabilidad de la enzima (Lehninger, 1995).

Para determinar la influencia de la temperatura sobre la actividad enzimática se determinó la actividad AP a diferentes temperaturas de 0 a 70°C, con intervalos de 10°C (Stauffer, 1989). Todos los ensayos de actividad se realizaron empleando como sustrato específico Leu-p-Na 0.75mM, en buffer fosfatos 50mM, pH 7.2, 30 min

Estabilidad al pH y Temperatura

Con el fin de establecer la estabilidad de la enzima purificada a diversos factores a los cuales podría verse sometida en potenciales aplicaciones tecnológicas, se determinó la estabilidad a diferentes niveles de temperatura y pH.

Para determinar su estabilidad a la temperatura se incubaron por espacio de 30 min, 0.05 mL de enzima purificada con 0.05 mL de buffer fosfatos 50mM, pH 7.2 en una serie de tubos a diferentes temperaturas (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80°C). Posteriormente, se determinó la actividad con el sustrato específico Leu-p-Na 0.75 mM y se comparó con la actividad de enzima sin incubar (Stauffer, 1989).

De igual forma para determinar estabilidad al pH se incubaron en una serie de tubos por espacio de 30 min, 0.05 mL de enzima purificada con 0.05 mL de buffer citrato de sodio-HCl 50 mM (pH 3, 4 y 5); buffer fosfato de sodio 50 mM (pH de 6 y 7); Tris-HCl 50 mM (pH de 8 y 9) (Raksakulthai *et al.*, 1999). Transcurrido el tiempo de incubación, se determinó la actividad AP utilizando el substrato específico Leu-p-Na 0.75 mM y se comparó con la actividad de enzima sin incubar (Stauffer, 1989).

Efecto de la Presencia de Metales e Inhibidores

Considerando los posibles usos a nivel industrial para la aminopeptidasa de calamar gigante, resulta necesario determinar si la presencia de metales en el medio de reacción afecta a la enzima, ya sea de manera positiva o negativa. Para este análisis, se emplearon sales conteniendo cationes divalentes tomando como referencia las características de conformación del sitio activo de aminopeptidasas ya estudiadas y se incubó la enzima purificada (dializada por 24 h a 0°C con agua desionizada) con ZnSO₄, ZnCl₂, CaCl₂, HgCl₂ en una relación 1:1 (V/V) la concentración final del catión fue de 1 mM, pH 7.2, 25°C por 30 min y posteriormente se midió la actividad con el substrato específico.

Para tratar de elucidar algunas características del sitio activo se probaron inhibidores con diferente mecanismo de acción, con base al estudio realizado por Raksakulhai y Haard (1999) se emplearon EDTA 0.001 mM (ácido etil diamín tetracético) cuya capacidad para quelar metales se utiliza en la inhibición

de metaloproteasas. Bestatin 0.001 μM [(2S, 3R)-3-amino-2-hidroxy-4-fenilbotanoil]-L-leucina hidrocloreto) el cual es un inhibidor específico de Leucina-aminopeptidasas (LAP). PCMB 0.05 μM (ácido p-cloromercurobenzoico), usado como inhibidor de cisteína proteasas, el cuál muestra efectos inhibitorios sobre la actividad de varias AP. La enzima purificada se incubó con cada inhibidor en una relación 1:1 (V/V), 60 min a 25°C y posteriormente se midió actividad utilizando el sustrato específico.

Electroforesis en SDS-Poliacrilamida

Con la finalidad de confirmar la presencia y pureza de la aminopeptidasa se realizó una corrida electroforética en geles de SDS-poliacrilamida al 12% para determinar su peso molecular (Laemmli, 1970). Las bandas se tiñeron por el método de tinción con nitrato de plata reportado por Blum *et al.* (1987) con algunas modificaciones, las cuales incluyeron el uso de glutaraldehído en las soluciones de tinción y revelado, así como una solución de metanol, formaldehído y EDTA para detener el revelado de las bandas de proteína en el gel de poliácridamida.

Los geles incluyeron proteínas estándares: albúmina de suero de bovino (66 KDa), ovoalbúmina (45 KDa), gliceraldehído-3-fosfato (36 KDa), anhidrasa carbónica (29 KDa), tripsinógeno (24 KDa), inhibidor de tripsina de soya (20.1 KDa), α -lactoalbúmina (14.4 KDa) (Pharmacia Bitech, Alameda, CA) como

marcadores de peso molecular y L-leucina aminopeptidasa (LAP) comercial de bovino.

Actividad en Gel (zimogramas)

La actividad proteolítica se detectó también por zimogramas, de acuerdo con Heussen y Dowdle (1980) con algunas modificaciones de Martínez *et al.*, (2002) que consistieron en el empleo de geles con 12% de poliacrilamida conteniendo 0.2% de gelatina copolimerizada (gelatina tipo A: de piel de porcino, EEC No. 232-554-6). La preparación de las muestras y zimogramas de inhibición de actividad proteasa se llevaron a cabo basándose en el procedimiento descrito por García-Carreño *et al.* (1993).

Las electroforesis se realizaron a temperaturas inferiores a 0 °C, mediante el empleo de buffer de corrida semicongelado, cargando 0.2 µg de proteína en cada carril y realizando la corrida a 200 mV por 1.5 h. Posteriormente los geles se lavaron para eliminar el SDS y restaurar la actividad enzimática de acuerdo al procedimiento de Lacks y Sringhorn (1980). La incubación de los geles se realizó con buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.2 durante 12 h a 37°C. Finalmente los geles se lavaron y tiñeron con azul de Coomasie R-250 al 0.5% disuelto en una mezcla de ácido acético:metanol:agua (10:50:40). Las bandas activas en los zimogramas se revelaron como zonas claras sobre fondo azul de gelatina no hidrolizada.

Actividad Hidrolítica sobre Caseína

Hidrolizados. Para obtener los hidrolizados se empleó caseína (Sigma, 89% de pureza). Se colocó en un vaso de reacción 1 mg de la caseína disuelta en 100 mL de agua alcalinizada con 200 μ L de NaOH 1 N y se ajustó el pH a 8 con HCl 0.1 N. Se adicionó 1 mL de la aminopeptidasa purificada (0.013 U/mg proteína). El tiempo de reacción fue de 36 min a 40°C, se tomaron alícuotas de 1 mL a intervalos de 6 min partiendo de 0. La reacción se detuvo con un volumen igual de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, se eliminó el precipitado por centrifugación (1000 x g, 10 min, 0°C) y a la fracción soluble se le cuantificaron los aminoácidos liberados en la reacción.

Cuantificación de aminoácidos liberados. Se empleó la técnica de OPA (Church *et al.*, 1983), la cual consistió en el empleo de reactivo OPA. Este reactivo se preparó con 25 mL de tetraborato sódico 100 mM, 2.5 mL de N-dodecilsulfato (SDS) 20% (peso/peso), 40 mg de o-ftaldehído (OPA) disuelto en 1 mL de etanol, 100 μ g de β -mercaptoetanol, agua destilada hasta un volumen de 50 mL. La reacción se realizó agregando 1 mL de reactivo OPA a tubos conteniendo 500 μ L de muestra, blanco y estándar cada uno. Después de 2 min de reacción a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 340 nm frente al blanco. Para determinar la concentración de aminoácidos en la fracción soluble en TCA, se empleó una recta patrón con L-leucina (JT Baker, 99.6% de pureza). Los resultados se reportaron como μ g de aminoácidos liberados en el vaso de reacción.

Determinación del grado de hidrólisis. Para determinar el grado de hidrólisis se aplicaron las ecuaciones reportadas por Nielsen *et al.* (2001). Para realizar estos cálculos es necesario determinar el número de enlaces hidrolizados (h), mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Leu-NH}_2 = \frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}}{A_{\text{estandar}} - A_{\text{blanco}}} * 0.9516 \text{ meqv/L} * 0.1 * 100 / X * P$$

Donde: Leu-NH₂ = meqv Leu-NH₂/g proteína ; X= g muestra ; P= % proteína en la muestra; 0.1= volumen de muestra en litros; $h = (\text{Leu-NH}_2 - \beta) / \alpha$ meqv/g proteína. Para caseína $\beta = 0.383$ y $\alpha = 1.039$ (Adler-Nissen, 1979).

Una vez obtenida h, se determinó el grado de hidrólisis (DH) aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{DH} = h/h_{\text{tot}} * 100\%$$

Donde: h_{tot} es el número total de enlaces peptídicos por equivalente de proteína y que para caseína es de 8.2 (Adler-Nissen, 1979), este valor es dependiente de la composición de aminoácidos en el material sin hidrolizar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestras

El peso del hepatopáncreas extraído en fresco fue en promedio de 115 ± 25 g, lo cual representa el 2.32% del peso total. Este porcentaje varía dependiendo de diversos factores tanto extrínsecos como intrínsecos, entre los cuales se pueden mencionar la etapa de desarrollo en la que se encuentra el organismo, factores ambientales, además de diferencias intra e inter especie. En referencia a este último factor, se ha reportado que para especies de calamar de menor talla como es *Illex illecebrosus* el hepatopáncreas constituye del 14 al 20% del peso total del organismo (Raksakulthai y Haard, 1999).

En cuanto a las diferencias intra especie, relacionados con la época de captura y por tanto a factores climatológicos, Ezquerro-Brauer *et al.* (2002) reportaron grandes diferencias en la talla de calamares gigantes (*D. gigas*) capturados durante el mes de abril respecto a organismos de la misma especie capturados en el mes de noviembre; los primeros fueron 10 veces más pequeños que los segundos y con hepatopáncreas de mayor peso relativo; los hepatopáncreas de los calamares capturados en el mes de abril representaron aproximadamente 8.3% del peso del organismo, mientras que los capturados en el mes de noviembre, representaron el 4.6%. Estas diferencias pueden ser explicadas con base al desarrollo y ciclo reproductivo de *D. gigas*, algunos autores han señalado que el calamar presenta picos de desove que suceden en

mayo-julio (Klett, 1996), otros que en verano e invierno (Hernández-Herrera *et al.*, 1998), otros más señalan como picos máximos de desove a octubre-enero (Nigmatullin *et al.*, 2001); estas discrepancias se deben a que los cambios de las condiciones oceanográficas en el Golfo de California y aguas del Pacífico tienen gran influencia en la determinación de los picos reproductivos de *D. gigas* (Ehrhardt *et al.*, 1986). Si se considera que *D. gigas* alcanza la talla máxima de 1.70 m en un período de dos años y si además se toma en cuenta la posible época en que esta especie desova y por último la época en la cual fue capturado el calamar, resulta comprensible las diferencias en la talla debido a la etapa de desarrollo. Por lo que considerando que los calamares empleados en este estudio fueron capturados en enero y con talla aproximada de 1.2 m, podemos elucidar que los organismos eran adultos y se encontraban en su periodo reproductivo de más alto desove.

Con la finalidad de facilitar el manejo y aumentar el periodo de conservación de la actividad enzimática (las reacciones enzimáticas se favorecen en medios acuosos; esto puede provocar que las proteasas presentes en las muestras hidrolicen las proteínas contenidas en el tejido incluyendo las aminopeptidasas), el hepatopáncreas se liofilizó, hasta quedar con un 33% de humedad.

Purificación de la Fracción Aminopeptídica

La etapa de purificación incluyó una precipitación inicial con sulfato de amonio (20-80% de saturación), para eliminar la mayor cantidad de proteínas contenidas en el extracto crudo y obtener una mezcla de enzimas proteolíticas entre las que se encuentran las enzimas con actividad AP y posteriormente esta fracción se aplicó a una columna cromatográfica de intercambio iónico para purificar a la AP. Un factor crítico en la etapa de purificación fué la temperatura, durante el desarrollo de esta etapa se observó una pérdida considerable de actividad cuando se manejaban temperaturas ligeramente superiores a 0°C, por lo que fué necesario manejar temperaturas inferiores y monitorear la actividad aminopeptidasa de cada etapa para determinar las condiciones más favorables de manejo.

En la figura 9, se observa el cromatograma de purificación de aminopeptidasa del hepatopáncreas de calamar gigante, apreciándose que en las primeras 44 fracciones colectadas se detectó la proteína acompañante sin actividad aminopeptidasa específica. Se observa además, que a partir de la fracción 45 la actividad aminopeptídica aumenta, presentando el valor máximo en la fracción 46, logrando el desprendimiento de la enzima de la matriz con la aplicación del gradiente de 0.25 y 0.3 M de NaCl, en este mismo punto se observa una concentración baja de proteína la cuál corresponde a la (o las) enzima (s) de interés. Por cada 5 mL de muestra aplicada a la columna con

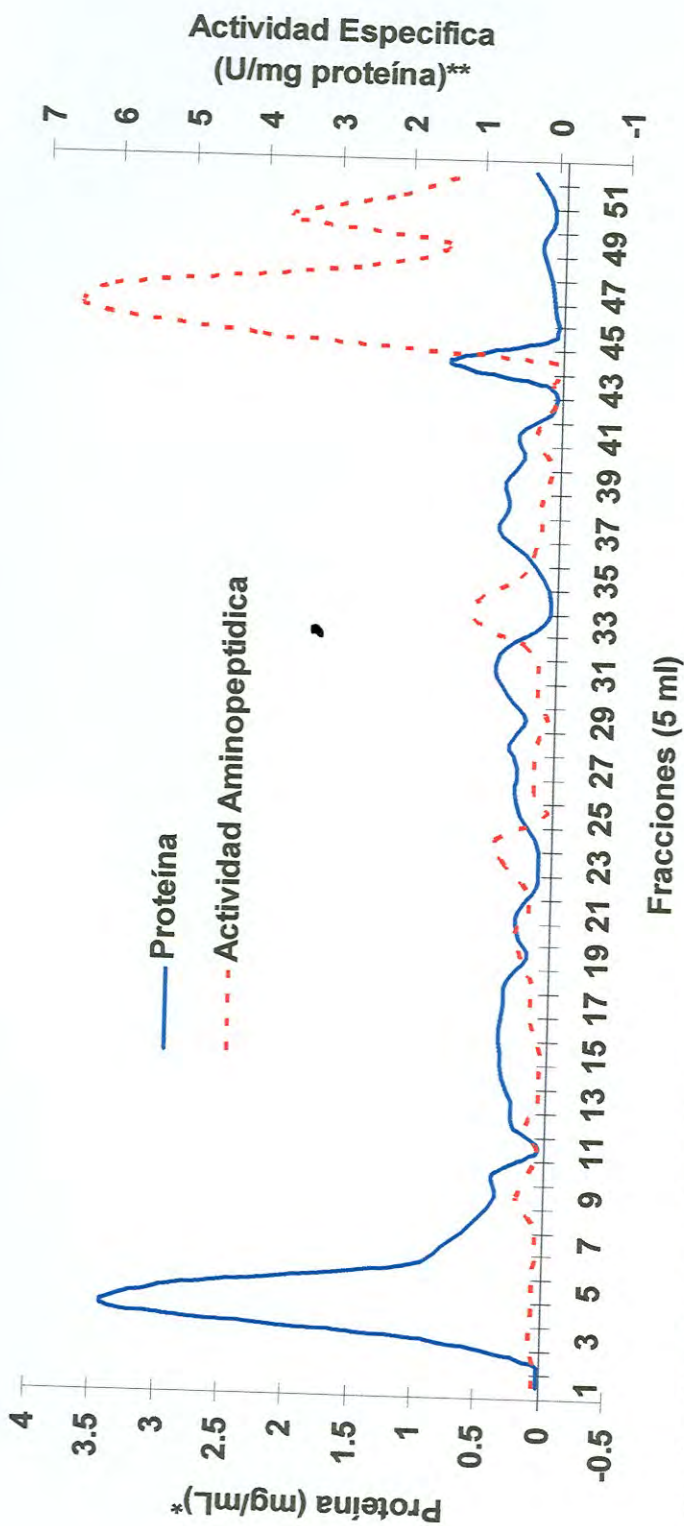


Figura 9. Perfil cromatográfico de un extracto con actividad aminopeptidasa proveniente de hepatopáncreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) empleando DEAE-celulosa.
 *Concentración de proteína determinada por el método de Bradford (1970).
 **Actividad determinada empleando como sustrato L-Leucina-p-NA (Pfeiderer, 1970)

una concentración de proteína de 1.581 mg/mL, se obtuvieron 5 fracciones (25 mL) que contenían actividad aminopeptidasa y una concentración de proteína de 0.14 mg/mL.

En la tabla 1, se presentan los resultados de la etapa de purificación, en esta tabla se puede apreciar que la actividad específica entre etapas se ve incrementada, esto debido a la eliminación de proteínas y enzimas acompañantes, el rendimiento al final del proceso fue de 0.1%. Este rendimiento es bajo comparado con otros sistemas de purificación de aminopeptidasas provenientes de organismos marinos los cuales implican un mayor número de pasos (como el uso de varias columnas cromatográficas); Hajjou y Le Gal (1994) purificaron una aminopeptidasa proveniente de intestino de atún (*Thunnus albacares*) empleando un sistema de purificación que incluía tres columnas en el siguiente orden; DEAE-Celulosa, filtración en gel e IDA-Sefarosa 6B y obtuvieron un rendimiento de 30.5%; Chiou *et al.* (1988), purificaron una aminopeptidasa a partir de huevo de lisa mediante un protocolo que incluyó varias columnas en el siguiente orden: DEAE-Celulosa, Sephadex G-200, DEAE-Celulosa, Sephadex G-200, Sephadex G-200. Estos investigadores reportaron rendimientos comprendidos entre 18 y 24%.

En la semipurificación de la fracción aminopeptidasa del hepatopáncreas de calamar del atlántico (*Illex illecebrosus*) realizada por Raksakulthai y Haard (1999), en la cual se sigue un protocolo similar al empleado en las etapas anteriores a la columna cromatográfica de este estudio, el rendimiento y

Tabla 1. Esquema de purificación de la aminopeptidasa proveniente del hepatopáncreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Proceso	Volumen Total (mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Actividad (U/mL)	Actividad Total (U)	Actividad Específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Purificación
Extracto crudo	100	17.56	1756.80	0.0020	0.200	0.002	100	1
Incubación con ZnSO ₄	80	16.03	1282.56	0.0010	0.080	0.001	73.15	0.42
(NH ₄) ₂ SO ₄ (20-80%)	22	91.23	2007.06	0.0090	0.198	0.002	114.25	0.18
Dialisis	25	15.80	3952.00	0.0040	0.100	0.005	22.48	0.54
DEAE-Celulosa	125	0.14	17.50	0.0002	0.025	0.028	0.99	15.22

Todos los resultados son el promedio de tres determinaciones.

Proteína determinada por el método de Bradford (1970).

U = Δ Abs_{405nm} / min, empleando como sustrato L-Leucina-p-NA (Pfeiderer, 1970).

Actividad específica: U/mg de proteína, bajo las condiciones específicas del ensayo.

Tabla 1. Esquema de purificación de la aminopeptidasa proveniente del hepatopáncreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Proceso	Volumen Total (mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Actividad (U/mL)	Actividad Total (U)	Actividad Específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Purificación
Extracto crudo	100	17.56	1756.80	0.0020	0.200	0.002	100	1
Incubación con ZnSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ (20-80%)	80	16.03	1282.56	0.0010	0.080	0.001	73.15	0.42
Diálisis	22	91.23	2007.06	0.0090	0.198	0.002	114.25	0.18
	25	15.80	3952.00	0.0040	0.100	0.005	22.48	0.54
DEAE-Celulosa	125	0.14	17.50	0.0002	0.025	0.028	0.99	15.22

Todos los resultados son el promedio de tres determinaciones.

Proteína determinada por el método de Bradford (1970).

U = Δ Abs_{405nm} / min, empleando como sustrato L-Leucina-p-NA (Pfeiderer, 1970).

Actividad específica: U/mg de proteína, bajo las condiciones específicas del ensayo.

purificación resultaron mayores que los obtenidos en este caso (27.06%, 8.76 contra 22.48%, 0.54, respectivamente). Las diferencias detectadas entre la purificación de aminopeptidasas de calamar, de *I. illecebrosus* y *D. gigas* pueden atribuirse a las características propias de la enzima relacionadas con la especie de la cual proviene, ya que *D. gigas* es una especie tropical e *I. illecebrosus* es una especie de aguas más frías, lo cual deriva en diferencias a nivel fisiológico del sistema digestivo. El conjunto de enzimas empleadas para la digestión de los calamares al igual que el resto de los organismos, varía en composición y concentración dependiendo de las necesidades individuales, estas necesidades son influenciadas por las condiciones ambientales, la disponibilidad y tipo de alimento consumido y la etapa de desarrollo. Por lo tanto, el comportamiento de la enzima durante las etapas de purificación puede no concordar con lo reportado para especies similares o la misma especie capturada en épocas y/o zonas de captura distintas.

Es importante mencionar que el factor tiempo es de suma importancia, a pesar de que se mantuvo un control en la temperatura durante el proceso de purificación, las corridas comprendían tiempos aproximados de 7 h y el tiempo de monitoreo de proteína y actividad resultaba de alrededor de 6 h más, por lo que los tiempos excesivos y las fluctuaciones de temperatura posiblemente afectaron la actividad en las fracciones, lo cual se reflejó en una disminución de la actividad específica entre las etapas del proceso.

Electroforésis en SDS-poliacrilamida

Para este análisis se utilizaron geles desnaturalizantes con 12% de poliacrilamida cuyos resultados se presentan en la figura 10. En esta figura se observan los patrones electroforéticos obtenidos durante el proceso de purificación de la aminopeptidasa de hepatopáncreas de calamar gigante. Durante la purificación se observa la desaparición de bandas de proteínas debido a la eliminación de fracciones proteicas durante las etapas del proceso de purificación. Al inicio del proceso (extracto crudo, carril B) se observan 6 bandas con un peso molecular aproximado de 96, 70, 56, 49 y 34 kDa. Después de precipitar las proteínas con sulfato de amonio de 20-80% de saturación, se logró eliminar las proteínas de 96 kDa (Figura 10, carril C) Posterior a un proceso de dializado contra Tris-HCl 50 mM, pH 7.2 conteniendo 25 mM de sulfato de zinc, se eliminaron las proteínas de peso molecular superior a 56 kDa (Figura 10, carril D). Finalmente, después del proceso de cromatografía de intercambio iónico, la banda de proteína con un peso aproximado de 55 kDa se mantiene durante todo el proceso, esta banda corresponde a la aminopeptidasa de calamar gigante purificada, la cual difiere con el patrón electroforético de LAP de bovino comercial (Figura 11). LAP (Figura 11, carril B) presenta dos bandas de proteína a 81 y 21 kDa y AP de calamar gigante (Figura 11, carril C) solo presentó una banda con un peso aproximado de 55 kDa. Al tratar la muestra con un agente reductor (β -mercaptoetanol) y hervir por espacio de 15 min, la banda se tornó más ancha (Figura 11, carril D), esto puede significar la

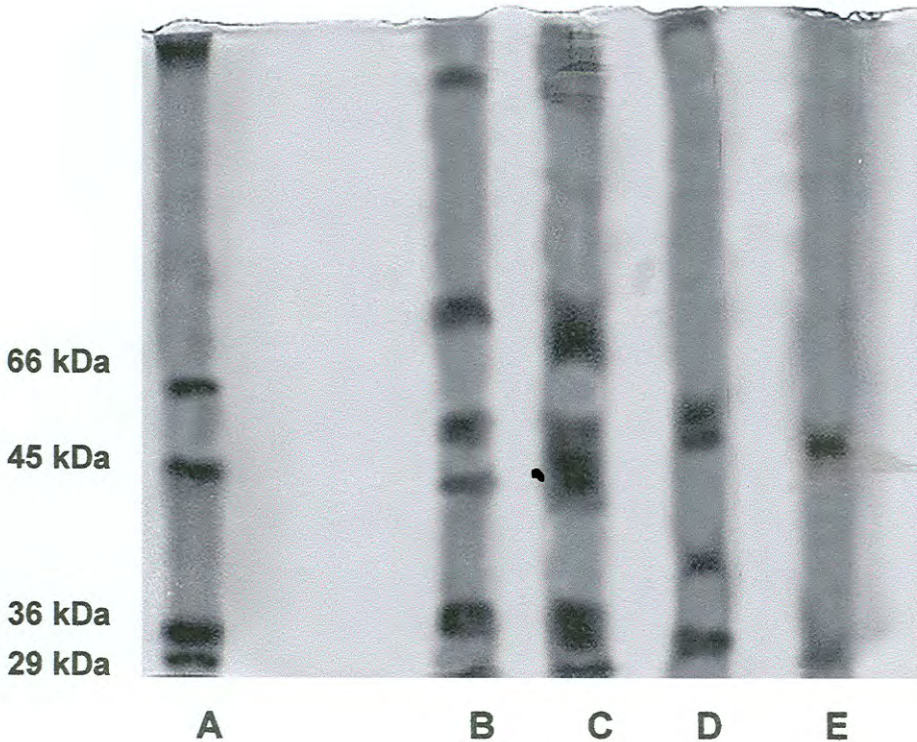


Figura 10. Patrones electroforéticos en SDS-PAGE 12% de poliacrilamida, durante el proceso de purificación de aminopeptidasa de hepatopáncreas de calamar gigante. Carril A: marcadores de peso molecular. Carril B: extracto crudo de HP de calamar gigante. Carril C: precipitación con sulfato de amonio. Carril D: fracción dializada. Carril E: AP purificada por DEAE-celulosa

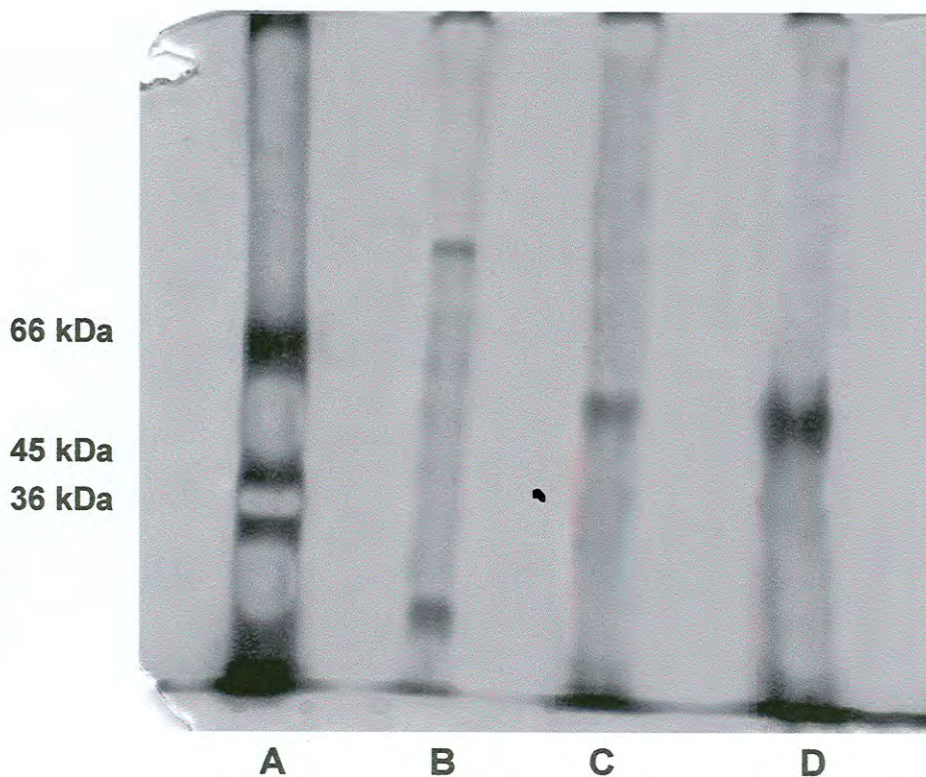


Figura 11. Comparación del patrón electroforético de la aminopeptidasa de hepatopáncreas de calamar gigante con leucina aminopeptidasa de bovino comercial. Carril A: marcadores de peso molecular. Carril B: LAP comercial de bovino. Carril C: AP de calamar gigante. Carril D: AP de calamar gigante bajo condiciones reductoras. A cada carril se aplicó aproximadamente 0.2 μg de proteína.

presencia de una enzima con subunidades del mismo peso molecular, o bien sumamente similares. Para determinar el número de subunidades sería necesario realizar una electroforesis bidimensional, ya que ese tipo de electroforesis es una herramienta útil para determinar la presencia de proteínas con un rango de pesos moleculares muy similares, pues en esta técnica la separación no sólo se da por diferencias en peso molecular y carga eléctrica, si no que también la separación se realiza por diferencias en el punto isoeléctrico (PI) (Estanyol y Bachs, 2003).

Se han reportado una gran variabilidad en el patrón electroforético de las aminopeptidasas provenientes de organismos acuáticos, la AP de intestinos de *Tunnus abalcares* está compuesta por dos subunidades de 72 kDa (Hajjou y Le Gal, 1994); la AP de huevecillos de lisa (*Mugil cephalus*) es un dímero de 184 kDa de peso total (Chiou *et al.*, 1988); en sardinas se ha detectado 2 AP de 370 y 320 kDa de peso total (Thanh *et al.*, 1983); en músculo de *Tilapia mossambica*, Sherekar *et al.* (1990) reportaron una AP de 305 kDa; De la Ruelle *et al.* (1992) aislaron una aminopeptidasa dimérica de 74 kDa compuesta por subunidades de 28 y 46 kDa a partir de HP de *Procambarus clarkii*. En cuanto a otra especie de calamar (*Illex illecebrosus*) Raksakulthai y Haard (1999) detectaron tres bandas en una fracción con actividad AP semipurificada de HP (93, 50 y 24 kDa), este patrón puede ser comparable con el observado en el carril D de la figura 10, ya que se siguió un proceso de semipurificación similar. En el caso de HP de calamar gigante se observaron 4 bandas de pesos

moleculares aproximados de 57, 54, 39 y 30 kDa, este patrón electroforético difiere del reportado para *Illex illecebrosus*, esto significa que la fracción AP de HP de calamar gigante es diferente de la fracción AP de HP de calamar del atlántico.

Caracterización

Determinación de Parámetros Cinéticos

Una vez obtenidos los valores de actividad para distintas concentraciones de sustrato se empleó el método de Lineaweaver-Burk (Figura 12) para obtener el valor de K_m y V_{max} (Withaker, 1994), la ecuación resultante de la gráfica $1/v$ vs. $1/S$, donde, $1/v$ es el inverso de la velocidad expresada en A_{405nm}/seg , $1/S$ es el inverso de la concentración de sustrato expresada en mM^{-1} es la siguiente:

$$y = 118046x + 392794, \text{ con una } R^2 \text{ de } 0.9292$$

De esta ecuación se derivan:

$V_{max} = 1/b$, y $K_m = m \cdot V_{max}$ ($2.54 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1}$ y 0.3 mM , respectivamente), se determinó además que para alcanzar la velocidad máxima se requieren 0.6 mM de L-leucina-p-NA, bajo las condiciones específicas empleadas en este ensayo.

Un valor bajo de K_m indica que la enzima requiere de una pequeña cantidad de sustrato para alcanzar la mitad de su actividad máxima, esto significa que la enzima tiene una elevada afinidad por el sustrato con el cual se

cual se realiza el ensayo. Esto también puede ser un indicativo de la eficiencia de la enzima para llevar a cabo la catálisis. Considerando lo anterior, el valor de K_m obtenido para AP de calamar gigante (0.3 mM) es comparablemente mayor que las K_m (obtenidas empleando Leu-p-NA como substrato específico) reportadas para la AP II de *Penicillium caseicolum* (Matsuoka *et al.*, 1991), AP de *Lactobacillus sake* (Sanz y Toldrá, 1997) y Aminopeptidasa A (Vazeux, 1998) cuyos valores son 0.08 mM, 0.091 mM y 0.068 mM, respectivamente, y menor que la reportada por Bienvenue *et al.* (2002) para AP de *Aeromonas proteolítica* (0.7 mM) y la reportada por Nishimura *et al.* (1994) para Aminopeptidasa H de músculo esquelético de bovino cuyo valor de K_m fué de 3.13 mM. Para esta última AP la V_{max} fué considerablemente mayor (96 seg^{-1}). Estas comparaciones en los valores de K_m de distintas AP se muestran en la tabla 2. El comportamiento cinético diferente indica que las enzimas mencionadas son distintas entre sí y poseen diferentes grados de afinidad por el mismo substrato bajo condiciones de pH y temperatura óptimas particulares. Este resultado es evidente ya que en este estudio se esta comparando una enzima marina con enzimas bacterianas y generalmente las AP bacterianas son menos complejas; las AP bacterianas de las cuales se conocen su secuenciación y conformación son monoméricas o con pocas subunidades, no así la AP H de bovino, la cual posee 8 subunidades.

Con respecto a K_m de AP de organismos acuáticos, existe muy poca información y la que ha sido reportada emplean otros substratos. Como la AP

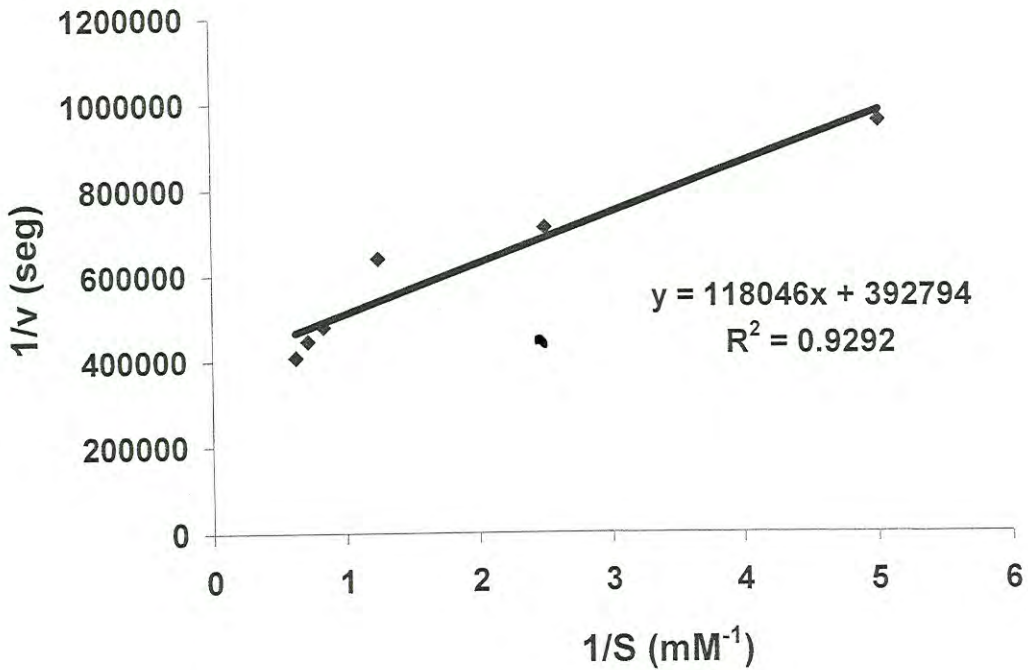


Figura 12. Cinética de reacción de la aminopeptidasa purificada de hepatopáncreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) obtenida mediante el método de Lineweaver-Burk.

Tabla 2. Comparativo de los valores de Km reportados para aminopeptidasas provenientes de diversas fuentes.

Aminopeptidasa	Fuente	Km (mM)	Substrato empleado	Referencia
AP	hepatopáncreas de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)	0.300	Leu-p-NA	Osuna-Ruíz, 2003
AP II	<i>Penicillium caseicola</i>	0.080	Leu-p-NA	Matsuoka <i>et al.</i> , 1991
AP	<i>Lactobacillus sake</i>	0.091	Leu-p-NA	Sanz y Toldrá, 1997
AP A	<i>Lactobacillus sp.</i>	0.068	Leu-p-NA	Vazeux, 1998
AP	<i>Aeromonas proteolytica</i>	0.700	Leu-p-NA	Bienavenue <i>et al.</i> , 2002
AP H	Músculo esquelético de bovino	3.130	Leu-p-NA	Nishimura <i>et al.</i> , 1994
AP	Músculo esquelético de <i>Tilapia mossambica</i>	0.059	betanaftilamida	Sherekar <i>et al.</i> , 1990

de músculo esquelético de *Tilapia mossambica* Sherekar *et al.* (1990) reportaron una K_m de 0.059 mM empleando como sustrato específico betanaftilamida. Debido a que el comportamiento cinético de una enzima varía con el sustrato empleado, con este valor de K_m solo se puede interpretar que la AP de tilapia tiene una alta afinidad por el sustrato empleado y no puede realizarse una comparación con el valor de K_m obtenido para AP de calamar gigante.

Actividad Aminopeptidasa con Sustratos Específicos

La aminopeptidasa de calamar gigante presentó actividad ante los sustratos específicos en el siguiente orden: L-prolina>L-metionina>Ac. L- γ -glutámico>L-glicina>L-Leucina>L-alanina>L-lisina-p-NA (Tabla 3). Esto indica, que la fracción obtenida tiene capacidad de actuar sobre los grupos amino terminal de diferentes aminoácidos en proteínas o péptidos.

Efecto del pH Sobre la Actividad y Estabilidad de la Aminopeptidasa Purificada

En la figura 13 se presenta el efecto del pH sobre la actividad aminopeptidica de la fracción resultante del proceso de purificación. En esta figura se puede apreciar que los mayores valores de actividad aminopeptidasa se detectaron en valores de pH alcalinos, detectándose un máximo de actividad a pH de 8. Comparando los pH óptimos de las AP provenientes de organismos

Tabla 3. Actividad de la aminopeptidasa de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) empleando diferentes sustratos específicos

Sustrato específico	Actividad específica (U/mg de proteína)
prolina-p-Nitroanilida	0.047 ± 0.005
metionina-p-Nitroanilida	0.046 ± 0.001
Ac. L-γ-glutamico-p-Nitroanilida	0.035 ± 0.003
glicina-p-Nitroanilida	0.030 ± 0.003
leucina-p-Nitroanilida	0.028 ± 0.008
alanina-p-Nitroanilida	0.016 ± 0.015
lisina-p-Nitroanilida	0.011 ± 0.003

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Los ensayos se realizaron con una concentración de sustrato de 0.75 mM, buffer fosfatos 50 mM, pH 7.2, 37°C, 30 min (Pfeiderer, 1970).

acuáticos reportados por varios autores, las AP presentan su actividad a pH óptimos alcalinos. Por ejemplo la AP de *Procambarus clarkii* tiene un pH óptimo de 8.6 (De la Ruelle *et al.*, 1992), la de *Thunnus albacares*, 8.8 (Hajjou y Le Gal, 1994), mientras que el pH óptimo de *Mugil cephalus* es de 7.4 (Chiou *et al.*, 1988) y para AP de *Tilapia mossambica*, 6.5-7.5 (Sherekar *et al.*, 1990) y en la fracción AP de *Illex illecebrosus*, 7 (Raksakulthai y Haard 1999)], las diferencias en los pH óptimos de actividad reflejan las variantes que presentan las especies en su fisiología, la cual está influenciada por factores externos a los que están expuestos y la función específica que tiene la AP en el órgano del cual se extrajo.

En cuanto a calamar gigante, Osuna-Ruiz *et al.* (2003) reportaron una actividad AP máxima comprendida en un rango de pH de 4 a 8 en un extracto crudo de HP. Este rango tan amplio de pH se debe a que en un extracto crudo están presentes una gran cantidad de proteasas distintas a AP que pueden hidrolizar el sustrato empleado para detectar la actividad y por lo tanto interferir en la cuantificación aumentando la concentración de producto detectado, una vez que mediante el proceso de purificación se eliminaron las enzimas “acompañantes”, resulta lógico obtener un solo valor de pH óptimo.

La aminopeptidasa de HP de calamar gigante purificada resultó estable a pH alcalinos presentando su máximo de estabilidad a pH de 7. Este resultado es similar al reportado para *Illex illecebrosus*: 6.9 (Raksakulthai y Haard, 1999), lo cual puede interpretarse como una similitud en las características catalíticas

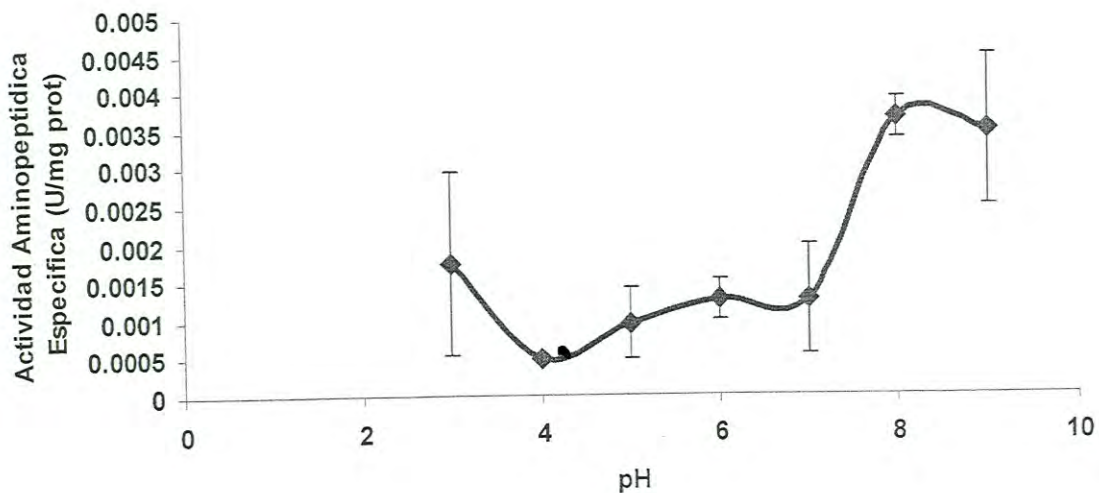


Figura 13. Efecto del pH sobre la actividad de aminopeptidasa de hepatopáncreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

de actividad AP para ambas especies. Este parecido puede relacionarse con las similitudes relacionadas a la fuente de la cual se extrajeron las AP. El hepatopáncreas tiene una función digestiva y la pequeña diferencia (0.1) de pH al cual son estables, se deben a factores relacionados con la especie y factores externos como el hábitat y tipo de alimentación.

Efecto de la Temperatura Sobre la Actividad y Estabilidad de la Aminopeptidasa Purificada

En la figura 14 se muestra el efecto que tiene la temperatura sobre la actividad tipo aminopeptidasa en la fracción purificada. La máxima actividad se observó a temperatura a 30°C. Esta temperatura resulta baja en comparación con la reportada para aminopeptidasas provenientes de otros organismos acuáticos, que varían desde 40 hasta 65°C como es *Procambarus clarkii*, de 55°C (De la Ruelle *et al.*, 1992), *Thunnus albacares* 65°C (Hajjou y Le Gal, 1994), *Mugil cephalus* 45°C (Chiou *et al.* 1988) y *Tilapia mossambica* 43°C (Sherekar *et al.* 1990). Estas variaciones se deben a diferencias inter-especie. Sin embargo, estas diferencias no solo se pueden observar entre especies. Dentro de una misma especie pueden existir diferencias en la temperatura a la cual se exhiben las mayores actividades enzimáticas. Ezquerra-Brauer *et al.* (2002) reportaron diferencias en la actividad proteolítica de extracto de HP de calamar gigante con época de captura: 70°C (captura en abril) y dos picos de máxima actividad a 40 y 70°C (captura en noviembre), lo cual refleja lo complejo

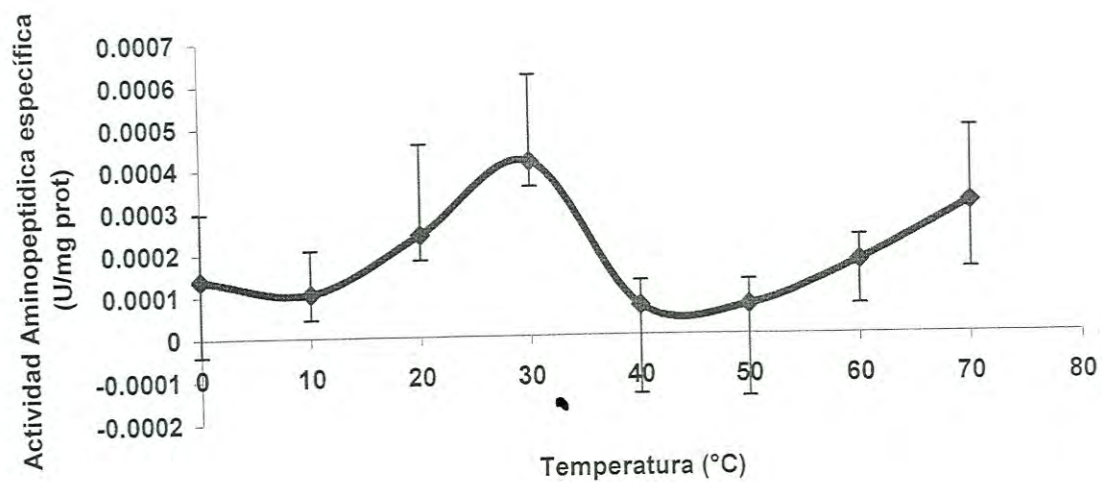


Figura 14. Efecto de la temperatura sobre la actividad de aminopeptidasa de hepatopáncreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

que resulta el estudio de enzimas marinas. Dicha complejidad se debe a la influencia de factores ambientales tales como maduración, época de desove, alimentación y temperatura del hábitat lo cual afecta las actividades de las enzimas en productos marinos (Sirkorksi y Kolakowski, 2000).

La aminopeptidasa purificada resultó relativamente estable a altas temperaturas y perdió totalmente la actividad a partir de los 80°C. Este comportamiento es consistente con el observado para extracto crudo de HP en la misma especie (Osuna-Ruiz *et al.* 2003). En cuanto a otras especies acuáticas para *Tunnus albacares* se reportó una pérdida total de actividad a 70°C (Hajjou y Le Gal, 1994). Estas diferencias en estabilidad pueden ser explicadas basándose en las temperaturas ambientales en las que se desarrollan estos organismos. En términos fisiológicos las especies de aguas tropicales deben poseer mecanismos de adaptación que les permita subsistir en temperaturas elevadas comparadas con las especies de aguas frías. Otro punto importante es el hecho de que ambas especies son migratorias por lo que las diferencias en estabilidad no resultan tan dramáticas (10°C), sin embargo en términos de una posible aplicación tecnológica estas diferencias resultan importantes.

Efecto de la Presencia de Metales e Inhibidores

Las aminopeptidasas son metaloenzimas, es decir necesitan la presencia de iones metálicos (cationes divalentes) para efectuar la catálisis. El metal

forma parte del sitio activo y participa directamente en el proceso de hidrólisis. Considerando lo anterior, resulta de suma importancia determinar si la presencia de metales en el medio de reacción puede tener efectos activadores o inhibitorios de la actividad de estas enzimas. En diversas especies de organismos acuáticos se ha observado que cationes como Co^{+2} tienen un efecto activador en sardinas y tilapias (Thanh *et al.*, 1983; Sherekar *et al.*, 1990), e inhibitorio en lisas y langostinos (Chiou *et al.*, 1988; De la Ruelle *et al.* 1992), metales como Mg^{+2} y Mn^{+2} , activan aminopeptidasas de calamar del atlántico (Raksakulthai y Haard, 1999) e inhiben aminopeptidasas de lisas y langostinos (Chiou *et al.*, 1988; De la Ruelle *et al.*, 1992), el Ca^{+2} activa las aminopeptidasas de calamar del atlántico (Raksakulthai y Haard, 1999) e inhibe en el caso de lisas y langostinos (Chiou *et al.* 1988; De la Ruelle *et al.* 1992); en general el Hg^{+2} es un potente inhibidor de la actividad de metaloproteasas, ya que reacciona rápidamente y en bajas concentraciones con grupos sulfhidrilo además forma complejos con otros grupos de las enzimas incluyendo grupos imidazol, carboxilo y grupos peptídicos (Withaker, 1994).

Al someter la AP purificada a un simple proceso de diálisis contra agua desionizada, la actividad disminuyó en un 94%, lo cual indica una eliminación de los iones presentes en la solución enzimática. Esto puede interpretarse como una dependencia de la enzima por lo iones eliminados para que esta realice adecuadamente la catálisis. En la figura 15 se presenta de manera gráfica el efecto que tienen la presencia de diversos cationes divalentes sobre

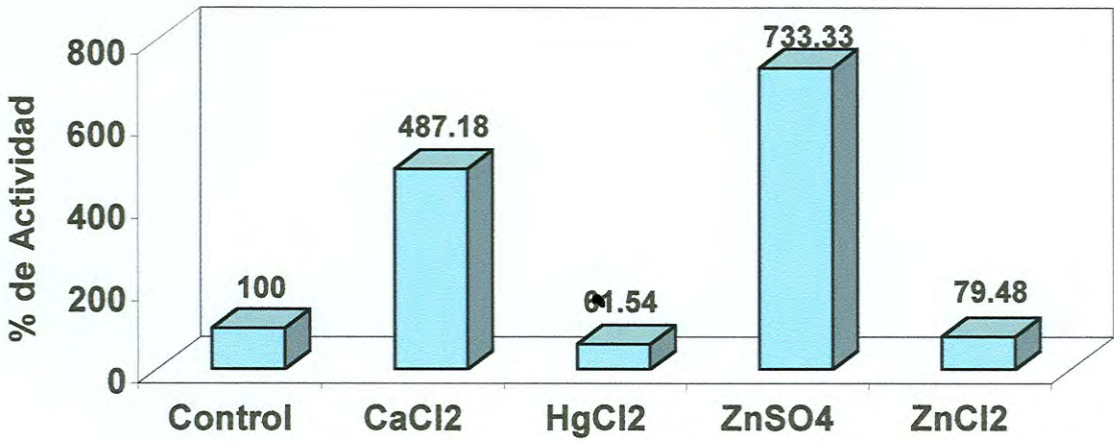


Figura 15. Efecto de la presencia de metales sobre la actividad de la aminopeptidasa purificada a partir del hepatopáncreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

la actividad de la aminopeptidasa purificada, el Ca^{+2} tuvo un efecto activador, así como el Zn^{+2} proveniente de ZnSO_4 , mientras que el Hg^{+2} redujo la actividad en un 39.5 %. Un hecho notable fue que el Zn^{+2} proveniente de ZnCl_2 tuvo un efecto inactivador (20.5 %), lo que significa que el anión acompañante tiene injerencia en el efecto final del catión añadido al medio de reacción. Un comportamiento similar fue observado por Raksakulthai y Haard (1999) para la actividad leucina-aminopeptidasa del HP de calamar del atlántico, pero en su caso el ZnCl_2 tuvo un efecto inhibitor mucho menor (8%). Esta dependencia de la fracción por Zn indica que la aminopeptidasa purificada posee en su sitio activo iones de Zn para activarse, es decir, es una AP Zn dependiente.

En la figura 16 se muestra el efecto de varios inhibidores sobre la actividad de la aminopeptidasa de calamar gigante. Debido a sus características de metaloproteasa, los agentes quelantes como el EDTA inhiben la actividad de la enzima, ya que el EDTA tiene la capacidad de formar complejos con cationes divalentes como el Zn^{+2} , el cual se ha observado es indispensable en la conformación y función del sitio activo de muchas AP (Whitaker, 1994). En este caso la inhibición fue del 50%. Bestatin es un inhibidor específico para LAP; en sardinas, tilapias, atún albacora y en calamar del atlántico, se ha confirmado la presencia de LAP por la inhibición que las aminopeptidasas de estos organismos presentan ante la presencia de bestatin (Van Thanh *et al.*, 1983; Sherekar *et al.*, 1990; Hajjou y Le Gal, 1994; Raksakulthai y Haard, 1999), de igual forma, bestatin inhibió en su totalidad a la AP de calamar gigante, por lo

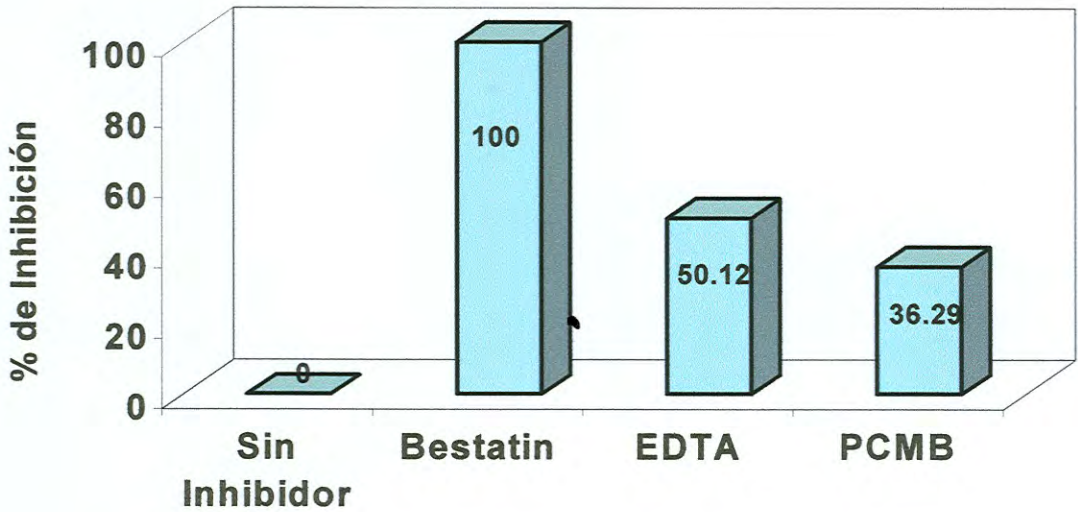


Figura 16. Inhibición de la actividad de la aminopeptidasa purificada del hepatopáncreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

que puede deducirse que se trata de una LAP. PCMB es un inhibidor de cisteína proteasas, es decir, tiene un efecto inhibidor sobre aquellas enzimas que posean cisteína en su sitio activo. A pesar de que LAP no posee cisteína en la conformación de su sitio activo, se ha observado que en diversas especies como lisas, langostinos, atún y calamar del atlántico, el PCMB tienen efectos inhibitorios sobre la actividad AP (Chiou *et al.*, 1988; De la Ruelle *et al.*, 1992; Hajjou y Le Gal, 1994; Raksakulthai y Haard, 1999), lo cual puede deberse a una unión del inhibidor a un sitio distinto al activo que provoca un cambio en la estructura de la enzima de forma tal que disminuye la afinidad por el substrato. En calamar gigante el PCMB inactiva en un 34% la actividad AP. El comportamiento antes observado, en conjunto con lo detectado en el ensayo con iones, hace pensar que la AP purificada además de ser zinc dependiente (metaloproteasas por la disminución en actividad por EDTA), presenta características de una Leucina-aminopeptidasa debido a su inactivación en presencia de bestatin, y posiblemente, posee un grupo cisteico dentro de su estructura. Sin embargo, para confirmar esto se requeriría realizar estudios estructurales en la enzima como RMN y difracción de rayos X que permitan esclarecer este punto.

Actividad en Gel (Zimogramas)

Para confirmar la presencia de actividad aminopeptidasa en la fracción purificada, fue necesario detectar la actividad proteolítica de la AP en geles de

poliacrilamida con gelatina incluida. Para ello se hizo una comparación de la actividad en gel exhibida por AP de calamar gigante y LAP comercial. En la figura 17 se presenta la actividad proteolítica sobre gelatina. Se puede observar que el extracto crudo de HP de calamar gigante presenta 4 bandas (carril A), la AP del calamar gigante (B) se observa como una banda bien definida que corresponde con la banda 2 de EC. En el carril C se encuentra una banda que coincide con la banda 4 de EC, esta banda en una peptidasa comercial. LAP comercial (carril D) presenta dos bandas de actividad, las cuales no tienen correspondencia con las encontradas para EC y AP de calamar gigante, lo cual indica que AP de calamar gigante es distinta a la AP de bovino.

Inhibición de Aminopeptidasas en Gel

En la figura 18, se observa el zimograma de inhibición de AP de calamar gigante (carril A a D) y es comparado con inhibición de LAP de bovino (carril E a H). Las muestras de los carriles A y E tienen como inhibidor bestatin, este compuesto es un inhibidor específico para aminopeptidasas. En ambos carriles se observa inhibición (desaparición de bandas claras), en el caso de AP comercial se inhibe en su totalidad la banda superior (81 kDa), esta inhibición confirma que la banda del carril A efectivamente se trata de una fracción proteica con actividad aminopeptídica. Los carriles B y F, contienen como agente inhibidor EDTA, por sus propiedades quelantes, este compuesto es empleado para eliminar metales y por lo tanto tiene efectos inhibitorios sobre

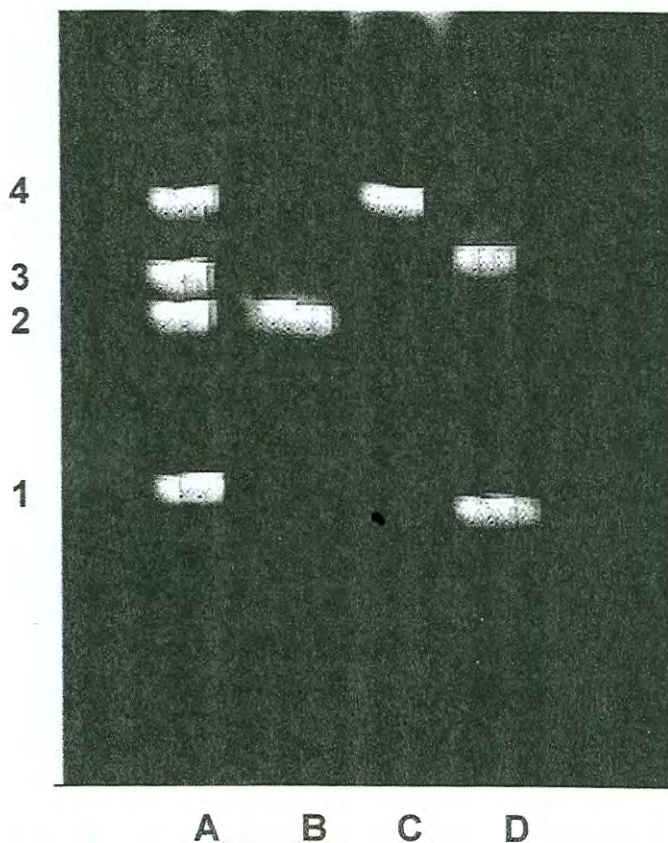


Figura 17. Actividad proteolítica en gel de aminopeptidasa de calamar gigante comparado con enzimas comerciales. Carril A: extracto crudo. Carril B: aminopeptidasa de calamar gigante. Carril C: peptidasa comercial. Carril D: leucina aminopeptidasa de bovino comercial. Para fines de comparación, los números en el costado izquierdo del gel indican el orden de pesos moleculares de las proteínas con actividad proteolítica.

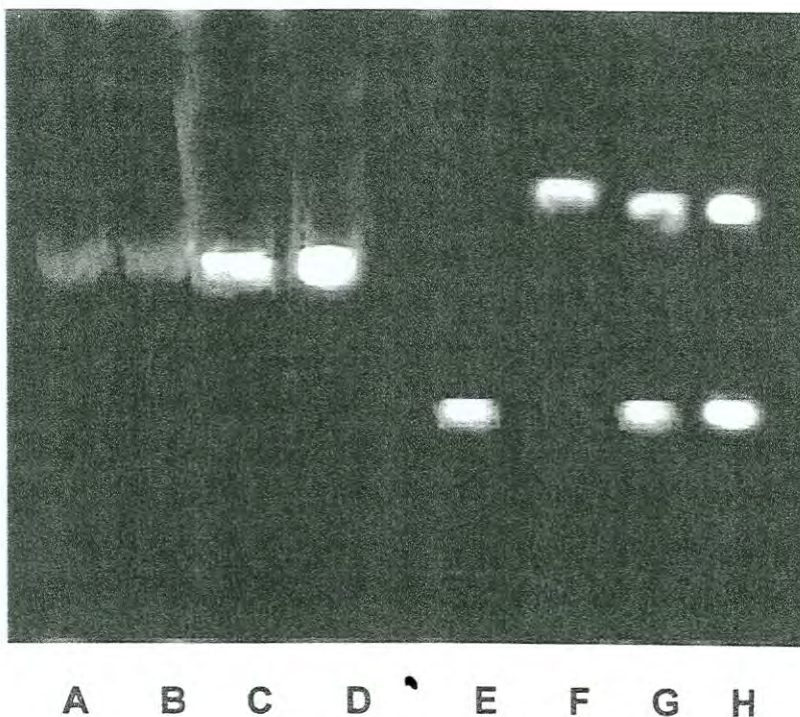


Figura 18. Comparación del efecto de inhibidores sobre la actividad en gel de aminopeptidasa de calamar gigante y Leucina aminopeptidasa comercial de bovino. Carril A: AP de calamar gigante con bestatin. Carril B: AP de calamar gigante con EDTA. Carril C: AP de calamar gigante con PCMB. Carril D: AP de calamar gigante sin inhibidor. Carril E: LAP comercial de bovino con bestatin. Carril F: LAP comercial de bovino con EDTA. Carril G: LAP comercial de bovino con PCMB. Carril H: LAP comercial de bovino sin inhibidor.

aquellas enzimas que requieren la presencia de metales para su actividad (metaloproteasas), ambas muestras se ven inhibidas por EDTA, lo cual demuestra la dependencia a metales en ambas enzimas, sin embargo nuevamente en la LAP de bovino comercial se observa una sola banda inhibida (21 KDa). En los carriles C y G, con el inhibidor PCMB, exclusivo para cisteína proteasas, solo la banda de AP de calamar presenta una ligera inhibición casi imperceptible, esto es un indicador de que la presencia de este compuesto pudiese actuar uniéndose a residuos de cisteína en un sitio distinto al centro catalítico de la enzima modificando ligeramente la actividad proteolítica de la misma sobre la gelatina presente en el gel. Estos resultados de inhibición fueron perceptiblemente menores que los obtenidos por los ensayos de inhibición en tubo, ya que la inhibición por bestatin en gel no fue total como lo fue en tubo, esto se debe a que en los ensayos en tubo se empleó un substrato específico (Leu-p-NA) y en los zimogramas de inhibición el substrato empleado para detectar la actividad proteolítica es general (gelatina), es decir en los ensayos en tubo sólo fue determinada la inhibición efectuada por bestatin sobre LAP, como bestatin es un inhibidor específico para esta enzima, el efecto de bestatin sobre el resto de las actividades (la AP purificada presentó actividad sobre varios residuos amino de diferentes aminoácidos) no fue determinada, por lo que en el zimograma la inhibición es general sobre la actividad total de la enzima. En el caso de la inhibición aparente en el zimograma con PCMB

respecto a la detectada en tubo, las diferencias pueden ser explicadas en este mismo sentido.

Actividad Hidrolítica Sobre Caseína

Las aminopeptidasas al igual que muchas enzimas, pueden ser inhibidas por la presencia de diversos compuestos producidos durante la catálisis. En el caso de las proteasas, la presencia de ciertos péptidos y aminoácidos en concentraciones específicas, pueden disminuir la eficiencia de la catálisis, ya sea por obstrucción del sitio activo o bien por provocar cambios en las condiciones del medio de reacción, por ejemplo cambios en el pH. En el caso del empleo de proteasas con fines de adición a alimentos, es necesario determinar la capacidad para hidrolizar proteasas de interés tecnológico y el efecto que pudiesen tener los productos formados sobre la actividad hidrolítica de la enzima involucrada. Diversos autores han observado que la presencia de L-aminoácidos inhiben la actividad de ciertas aminopeptidasas, tal es el caso de la AP purificada de huevecillos de lisa que es inhibida por la presencia de varios L-aminoácidos y particularmente por la presencia de glutámico (Chiou *et al.*, 1988), este tipo de efecto se observó también en la AP purificada de intestino de atún albacora (Hajjou y Le Gal, 1994).

La importancia de la aplicación de AP en tecnología de alimentos ha sido mencionada por diversos autores, por ejemplo, se ha reportado que la adición de exopeptidasas provenientes de calamar en la producción de diversos

hidrolizados como las salsas de pescado (Raksakulthai y Haard, 2003), mejora las características sensoriales del producto atribuido a la eliminación de sabores amargos debido a la acción de AP presentes. Raksakulthai *et al.* (2002) determinaron que una fracción aminopeptidasa obtenida de HP de *Illex illecebrosus* es capaz de realizar una hidrólisis adecuada de la caseína durante la maduración del queso cheddar eliminando sabores amargos producidos por los péptidos hidrofóbicos producidos durante el proceso de maduración del producto. Por lo que, asumiendo una posible aplicación tecnológica de la AP purificada de HP de calamar gigante, se realizó una hidrólisis de una solución de caseína monitoreando la concentración de aminoácidos producidos y el posible efecto de los productos formados sobre la actividad.

En la figura 19 se muestra una gráfica de la liberación de aminoácidos generados durante la hidrólisis. Como se puede observar después de 30 min de hidrólisis la cantidad de aminoácidos liberados en el vaso de reacción aumenta y se mantiene constante. La AP de calamar gigante tuvo capacidad de hidrolizar el 6% de la caseína. Esto indica que esta fracción presenta baja capacidad para hidrolizar a esta proteína, lo cual puede ser aprovechado cuando se buscan procesos de maduración con hidrólisis controladas. Sin embargo es necesario llevar a cabo más estudios al respecto para corroborar la eficacia de la enzima.

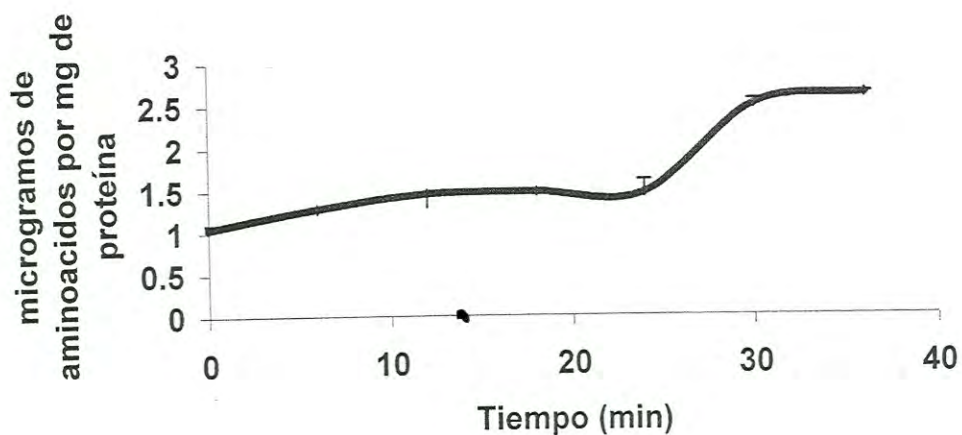


Figura 19. Monitoreo de la liberación de aminoácidos en la hidrólisis que efectúa AP de calamar gigante sobre caseína.

CONCLUSIONES

En base a la caracterización y ensayos de actividad aminopeptidica empleando diferentes sustratos específicos, podemos afirmar que mediante el proceso de purificación empleado fue posible obtener una fracción proveniente del hepatopáncreas de calamar gigante, la cual presentó actividad aminopeptídica sobre 7 sustratos sintéticos, con mayor afinidad por prolina-p-NA. El pH óptimo de actividad determinada empleando leucina-p-NA fué de 8 y su temperatura óptima de 30°C, con un peso molecular aproximado de 55 kDa, una Km de 0.3 mM y una Vmax de $2.54 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1}$.

Debido a que su actividad se inhibe totalmente por bestatin y parcialmente por la presencia de EDTA y PCMB, y además que requiere de la presencia de cationes divalentes como calcio y zinc, para llevar a cabo su acción catalítica, la fracción obtenida es una aminopeptidasa zinc-dependiente con un grupo cistéico en su estructura que participa en la estabilidad de conformación del sitio activo y por sus características de inhibición ante bestatin, aparentemente se trata de una leucina aminopeptidasa.

La fracción obtenida conserva su actividad en un rango de pH comprendido de 5 a 9 (25°C), presentando la máxima estabilidad a 7; es estable a temperaturas de 70°C (pH 7) e inactivada a partir de los 80°C; además es capaz de hidrolizar caseína en solución, con un grado de hidrólisis del 6%. Estas características pueden hacer que la fracción aminopeptidasa del

hepatopáncreas de calamar gigante sea susceptible de utilizarse en procesos de hidrólisis controlada en la industria de alimentos.

RECOMENDACIONES

Debido a que el rendimiento obtenido mediante el proceso de purificación resulto bajo, se recomiendan algunas estrategias a seguir para elevar la eficiencia del proceso:

1. Disminuir el tiempo de permanencia de la enzima en la columna y evitar al máximo fluctuaciones de temperatura durante el proceso.
2. Modificar algunos de los parámetros fisicoquímicos de la matriz como pH y fuerza iónica, para lograr una mayor separación de las proteínas con actividad aminopeptidica.
3. Establecer un protocolo de purificación con otro método cromatográfico como es cromatografía de afinidad, es ese sentido un ligando posible a emplear es bestatin, ya que es un compuesto que se une de manera reversible al sitio activo de aminopeptidasas y ha demostrado una alta eficiencia en la purificación de AP de origen bacteriano (Acosta *et al.*, 1998)

Para determinar de forma veraz que la fracción aminopeptidasa purificada de hepatopáncreas de calamar gigante es potencialmente aplicable a la industria de alimentos, se recomienda determinar el tipo de aminoácidos liberados y el efecto de estos sobre la actividad de la enzima, ya que se ha observado en varios estudios similares que la presencia de ciertos aminoácidos

pueden inhibir la actividad aminopeptidasa, además es importante determinar la influencia de los productos liberados en el proceso de hidrólisis sobre las características de calidad del alimento al cual desea adicionarse enzimas exógenas. También es recomendable determinar el costo-beneficio, implicado en la obtención y aplicación de enzimas de fuentes alternas a las tradicionales empleadas en la industria de alimentos, como son las aminopeptidasas de calamar gigante.

BIBLIOGRAFIA

- Acosta, D., Goñi, F. and Carmona, C. 1998. Characterization and partial purification of leucine aminopeptidase from *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 84(1): 1-7.
- Adler-Nissen J. 1979. Determination of degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Agric. Food Chem.* 27: 1256-1262.
- Barnes, R. C. 1987. Invertebrate Zoology. 15th Edition. Saunders College Publishing. USA: CBS College Publishing.
- Bhowmik, T., Marth, E. H. 1988. Protease and peptidase activity of *Micrococcus* species. *J. Dairy Sci.* 71(9): 2358.
- Bienvenue D. L., Mathew R. S., Ringe D. and Holz R. C. 2002. The aminopeptidase from *Aeromonas proteolítica* can function as an esterase. *J. Biol. Inorg. Chem.* 7: 129-135.
- Berk, A. 1980. Introducción a la Bioquímica de los Alimentos de J. B. S. Braverman. 1^a edición. Ed. El Manual Moderno. México. pp. 48-51.
- Blum H., Beier H., and Gross H. J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA y DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Bjarnason, B. A. 1989. Squid Fishing. *Infofish International.* 2: 38-40.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

- Brusca, C. R. and Brusca, G. 1990. Invertebrates. First edition. Sinauer associates Inc. Publishers Sunderland , Massachusetts. USA. p.p. 695-770.
- Chiou T-K, Matsui T. and Konosu S. 1988. Purification and properties of an aminopeptidase from mullet (*Mugil cephalus*) roe. *Agric. Biol. Chem.*, 52(1):235-242.
- Church, F. C., Harold, E. S., Porter, D. H. and Catignani G. L. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde on determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66: 1219-1227.
- Clarke, M. R. and Trueman, E. R. 1988. The Mollusca. Paleontology and neontology of cephalopods. Vol. 2. Ed. Academic Press Inc. USA. p. 5.
- De la Ruelle M., Hajjou M., Van Herp F. and Le Gal Y. 1992. Aminopeptidase activity from the hepatopancreas of *Procambarus clarkii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 20(4): 331-337.
- Ehrhardt, N. M. 1991. Potential impact of seasonal migratory jumbo squid (*Dosidicus gigas*) stock on a Gulf of California sardine (*Sardonox sagax caerulia*) population. *Bull. Mar. Sci.* 49(1-2): 325-332.
- Ehrhardt, N. M., A. Solís-Nava, P. S. Jacquemin, J. Ortiz-Cobos, P. Ulloa-Ramírez, G. González-Dávila y F. García-Badillo. 1986. Análisis de la biología y condiciones del stock del calamar gigante *Dosidicus gigas* en el Golfo de California, México, durante 1980. *Ciencia Pesquera* 5: 63-76.

- Estanyol, J. Y Bachs, O. 2003. II Curso de electroforésis bidimensional. Barcelona, España, 29 de septiembre a 1 de octubre. Dpto. de biología celular y anatomía patológica. Universidad de Barcelona. <http://biologia.med.ub.es:8080/Proteomica/Web/Curs2D/CURS2DSET2002OK.HTM>
- Ezquerria-Brauer, J. M., Haard, N. F., Ramírez-Olivas, R., Olivas-Burrola, H. and Velásquez-Sanchez, C. J. 2002. Influence of harvest season on proteolytic activity of hepatopáncreas and mantle tissues from jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *J. of Biochem.* 26(5): 459-475.
- Fanuel, L., Thamm, I., Kostanjevecki, V., Samyn, B., Joris, B., Coffin, C., Brannigan, J., Van Beeumen, J. and Frére, J. M. 1999. Two new aminopeptidases from *Ochrobactrum anthropi* active on D-alanyl-p-nitroanilide. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 55: 812-818.
- FAO. 2003. FIGIS-FAO-SIDP. Species identification sheet *Dosidicus gigas*_Archivos. <http://www.fao.org>
- Fersht, A. 1999. Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis protein folding. Freeman Editors. USA.
- Fowler, M. W. 1996. Tecnología Enzimática. Cap. 9. En: Biotecnología para los ingenieros. Editor: Alan Scragg. Editorial LIMUSA. p.p. 178-184.
- Fuke, Y. and Matsuoka, H. 1993. The purification and characterization of prolyl aminopeptidasa from *Penicillium camemberti*. *J. Dairy Sci.* 76(9): 2478.

- García-Carreño, F. L. 1991. Proteases in food industry. *Biotech. Edu.* 2(4): 150-153.
- García-Carreño, F. L., Dimes, L. E. and Haard, N. F. 1993. Substrate gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinase or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214: 65-69.
- Gobbetti M. and Corsetti A. 1994. Purification and characterization of intracellular aminopeptidase from *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948. *J. Dairy Sci.* 78: 44-54.
- Godfrey, T. and Reichelt, J. 1983. Introduction to industrial enzymology. En: Industrial enzymology. The application of enzymes in industry. *Nature Press*, London, pp. 1-7.
- Haard, N. F. 1993. Enzyme technology in the aquatic foods industry. *Biochem. Aq. Foods*. Haard N. F. 1995. Composition and nutritive value of fish proteins and other nitrogen compounds. Chapter 3. p.p. 77-88. En: Fish and fishery products. Composition nutritive properties and stability. Ed. CAB International. 1995. USA.
- Haard, N. F. 1990. Fish protease in food industry. University of California, Davis, CA 95616 USA. Conferencia. II Simposium sobre Biotecnología Marina. La Paz, B.C.S. México.
- Hajjou, M. and Le Gal, Y. 1994. Purification and characterization of an aminopeptidase from tuna (*Tunnus albacares*) pyloric caeca. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1204: 1-13.

- Hermes, H. F. M., Sonke, T., Peters, P. J. H., Balken, J. A. M., Kamphuis, J., Dijkhuizen, L. and Meijer, E. M. 1993. Purification and characterization of an L-aminopeptidase from *Pseudomonas putida* ATCC 12633. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(12): 4330.
- Hernández-Herrera, A. E., Morales-Bojorquez, M. O., Nevárez-Martínez, A. Balmori and G. I. Rivera. 1996. Distribución de tallas y aspectos reproductivos del calamar gigante (*Dosidicus gigas*, D'Orbigny, 1835) en el Golfo de California, México. *Ciencia Pesquera* 12:85-89.
- Hernández-Herrera, A., E. Morales-Bojórquez, M.A. Cisneros-Mata, M. O. Nevárez-Martínez and G.I. Rivera-Parra. 1998. Management strategy for the giant squid (*Dosidicus gigas*) fishery in the Gulf of California, Mexico. *Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep.* 39: 212-218.
- Heussen, C. and Dowdle, E. 1980. Electrophoresis analysis of plasminogen activators in polyacrilamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* 102: 196-202.
- Klett, T. A. 1996. Pesquería del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) En: Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. Instituto Nacional de la Pesca. SEPESCA. México.
- Kolodesiejska, I., Acana, J. and Sikorski, Z. E. 1992. Effect of squid liver extract on proteins and the texture of cooked squid mantle. *J. Food Biochem.* 16: 141-150.

- Kreuzer, Roy. 1986. Cephalopods: Handling, processing and products. FAO fisheries technical paper 254. Food and agriculture organization of the United Nations. Rome, Italy.
- Kuo, L-Y., Hwang, G-Y., Lai, Y-J., Yang, S-L. and Lin, L-L. 2003. Overexpression, Purification, and characterization of the recombinant leucine aminopeptidase II of *Bacillus stearothermophilus*. *Current Microbiol.* 43: 40-45.
- Lacks, S. A., Sringhorn, S. S. 1980. Renaturation of enzymes after polyacrilamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *J. Biol. Chem.* 255:7467-7473.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee, Y. Z., Simpson, B. K., Haard, N. F. 1986. Supplementation of squid fermentation with proteolytic enzymes. *J. Food Biochem.* 6: 127-134.
- Lehninger, A. L. 1995. Bioquímica. 18^a reimpresión. Ediciones Omega, Barcelona, España. pp. 201-202.
- López Murguía C. Agustín. 1987. Tecnología enzimática. Compilación. Universidad Nacional Autónoma de México. p. 117.
- Martínez, M. T., Newbold, C. J., Wallace, R. J. and Moyano, F. J. 2002. Effects of high-molecular-mass substrates on protein migration during sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 23: 1-7.

- Mathewson, P. R. 1998. Enzymes. Ed. Eagan Press.
- Matsuoka H., Fuke Y., Kaminogawa S., Yamauchi K. 1991. Purification and debittering effect of aminopeptidase II from *Penicillium caseicolum*. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1392-1395.
- Morales-Bojórquez, E., Cisneros-Mata, M. A., Nevárez-Martínez, M. O., Hernández-Herrera, A. 2001. Review of stock assessment and fishery biology of *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, México. *Fisheries Research* 54: 83-94.
- Morrissey, M. T. 2002. Fish waste utilization. Marine biotechnology workshop. CIBNOR. La Paz Baja California Sur. Mex.
- Nesis, K. N. 1970. The biology of the giant squid of Peru and Chile, *Dosidicus gigas*. *Oceanology*. 10: 108-11
- Nevárez-Martínez, M., A. Hernández-Herrera, E. Morales-Bojórquez, A. Balmori-Ramírez, M.A. Cisneros-Mata and R. Morales-Azpeitia. 2000. Biomass and distribution of the jumbo squid (*Dosidicus gigas* d'Orbigny, 1835) in the Gulf of California, Mexico. *Fish. Res.* 49:129-140.
- Nielsen, P. M., Petersen, D. and Dambmann, C. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J. of Food Sci.* 66(5): 642-646.
- Nigmatullin, Ch. M., Nesis, K. N. and Arkhipkin, A. I. 2001. A Review of biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fisheries Research* 54: 9-19.

- Nishimura T., Mee R. R., Hiromichi K., Soichi A. 1994. Purification and properties of aminopeptidase H from bovine skeletal muscle. *J. Agric. Food Chem.* 42: 2709-2712.
- Osuna-Ruíz, I., Ezquerro-Brauer, J. M., Pacheco-Aguilar, R. and Rouzaud-Sandez, O. 2003. Partial Characterization of Aminopeptidase Enzyme in Crude Extract Hepatopáncreas of Jumbo Squid (*Dosidicus gigas*). Poster. Topic: by-Products and wastes. 53° Congress of Pacific Fisheries Technologists. Astoria, OR.
- Parra, L., Fernandez de Palencia P., Casal V., Requena T., Pelaez C. 1999. Hydrolysis of β -casei (193-209) fragment by Whole Cells and Fractions of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*. *J. Food Sci.* 64(5): 899-902.
- PDB. 2003. Protein Data Bank. <http://www.pdb.org>
- Pfeiderer, G. 1970. Particle bound peptidase from pig kidney. En *Methods in enzymology*, Vol. XIX, pp. 514-521, Academic Press, New York.
- Pharmacia. 1991. Ion Exchange Chromatography. Principles and methods. Manual. Edited by Laboratory Separation Division S-751 82. Uppsala, Sweden.
- Raksakulthai R. and Haard, N. F. 1999. Purification and characterization of aminopeptidase fractions from squid (*Illex illecebrosus*) hepatopancreas. *J. of Food Biochem.* 23: 123-144.

- Raksakulthai R. and Haard N. F. 1992. Fish sauce from capelin (*Mallotus villosus*): contribution of cathepsin C to the fermentation. *ASEAN Food J.* 7(3): 147.
- Raksakulthai R., Rosenberg M., Haard N. F. 2002. Accelerated cheddar Cheese ripening with an aminopeptidase fraction from squid hepatopancreas. *J. Food Sci.* 67(3): 923-929.
- Raksakulthai, R. and Haard, N. F. 2003. Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food: a review. *CRC. Critical Reviews in Food Sci. and Nut.*, 43(4): 401-445.
- Rul F., Monnet V., Gripon J-C. 1994. Purification and characterization of a general aminopeptidase (St-PepN) from *Streptococcus salivarius* ssp. thermophilus CNRZ 302. *J. Dairy Sci.* 77: 2880-2889.
- SAGARPA. 2002. Anuarios estadísticos de pesca. www.sagarpa.gobmx/pesca/Anuarios/Anuario2000/anuario.pdf
- SAGARPA. Anuario estadístico de pesca, 2000. México, 2001. Aspectos económicos de Sonora, volumen de la producción pesquera en peso desembarcado según principales especies, 2000. <http://www.inegi.gob.mx/entidades/espanol/fson.html>
- Sanz Y. and Toldrá F. 1997. Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus sake*. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1552-1558.

- Segel, I. H. 1968. Chapter 4: Enzymes. En: Biochemical calculations. 2nd edition. John Wiley & Sons. USA.
- Sekikawa M., Seno K., Shimada, K., Fukushima M., Mikami M. 1999. Transaminase effects accumulation of free amino acids in electrically stimulated beef. *J. Food Sci.* 64(3): 384.
- Semarnat. 2000. [http:// www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx).
- Sherekar, S. V., Gore, M. S. and Ninjoor, V. 1990. Aminopeptidase from skeletal muscle of fresh water fish *Tilapia mossambica*. *Indian J. Biochem. Biophys.* 27(5): 316-323.
- Sikorski, Z. and Kolakowski, E. 2000. Endogenous enzyme activity and seafood quality: influence of chilling, freezing, and other environmental factors. En: Seafood enzymes. Utilization and influence on postharvest seafood quality. (N. F. Haard and B. K. Simpson, eds.) pp. 451-487. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Simpson B. K. 2000. Digestive proteinases from marine animals. Chapter 8. p.p. 191-213. En: Seafood enzymes. Utilization and influence on postharvest seafood quality. Edited by Haard N. F. and Simpson B. K. Ed. Marcel Dekker Inc. 2000. USA.
- Simpson, B. K. and Haard, N. F. 1987. Cold-adapted enzymes from fish. *Food Biotech.* pp. 495-523.
- Stauffer, C. 1989. Enzyme assay for food scientists. Van Nostrad Reinhol/AVI. New York.

- Suda, A. 1973. Development of fisheries for non conventional species. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 30:2121-2158.
- Sugiyama M., Kousu S., Hanabe M., Okuda Y. 1989. Organs and other tissues. En: *Utilization of squid*, (A.A. Balkema, ed.) pp. 90-101.
- Taylor A. 1993. Aminopeptidases: towards a mechanism of action. *TIBS.* 18:167-172.
- Thanh Vo Van., Kusakabe, Isao., Murakami, Kazuo. 1984. The aminopeptidase activity in fish sauce. *Agric. and Biol. Chem.* 48(2): 525-7
- Toldrá F., Aristoy M-C., Cerveró C., Rico E., Motilva M-J., Flores J. 1992. Muscle and adipose tissue aminopeptidase activities in raw and dry-cured ham. *J Food Sci.* 57(4): 816-818.
- Toldrá F., Cerveró M-C., Part C. 1993. Porcine aminopeptidase activity as affected by curing agents. *J Food Sci.* 58(4): 724-726.
- Van Thanh, V., Kusakabe, I. and Murakami, K. 1983. Purification and some properties of two aminopeptidases from sardines. *Agric. Biol. Chem.* 47(11): 2453-2459.
- Vaseux G., Iturrioz X. Corvol P., Llorens-Corte C. 1998. A glutamate residue contributes to the exopeptidase specificity in aminopeptidasa A. *J. Biochem.* 334: 407-413.
- Virgili R., Schivasappa C., Parolari G., Bordini C. S., Degni M. 1998. Proteases in fresh pork muscle and their influence on bitter taste formation in dry-cured ham. *J. Food Biochem.* 22(1): 53.

Whitaker J. R. 1994. Principles of enzymology for the food sciences. Second Edition. Marcel Dekker Inc. USA. p.p. 245-251, 301-312.