

LD 14552



El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos

Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Especialidad en Conservación y Procesamiento de Productos Marinos

Tripsina III de Sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) -
Sobreexpresión en *Escherichia coli*

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Q.B. Liliana Denisse López Dyck

TD 14643

Hermosillo, Sonora

Noviembre de 2010

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

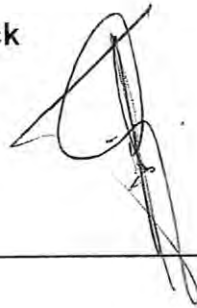


Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

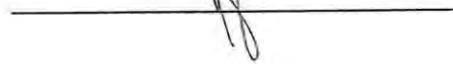
**Tripsina III de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) –
sobreexpresión en *Escherichia coli***

Liliana Denisse López Dyck



Francisco Javier Castillo Yáñez, Dr.

Director de la tesis



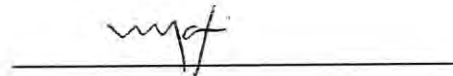
Ofelia Rouzaud Sáñez, Dra.

Miembro del Comité de tesis



María Auxiliadora Islas Osuna, Dra.

Miembro del Comité de tesis



Josafat Marina Ezquerro Brauer, Dra.

Miembro del Comité de tesis



Rosario Maribel Robles Sánchez, Dra.

Coordinador del Programa de Posgrado



Hermosillo Sonora, Noviembre de 2010

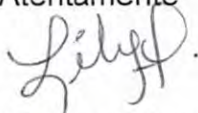
©Derechos de autor:

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de Maestro en Ciencias y Tecnología de Alimentos, especialidad en Conservación y procesamiento de productos marinos, de la Universidad de Sonora.

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

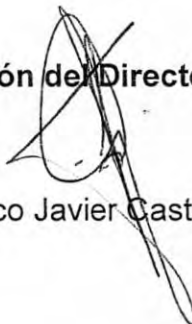
Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor

Atentamente



Liliana Denisse López Dyck

Aprobación del Director de Tesis



Francisco Javier Castillo Yáñez

Hermosillo Sonora, Noviembre de 2010

AGRADECIMIENTOS

Primero y antes que nada, doy gracias a Dios, por dirigirme en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente dándome la capacidad para llegar a esta etapa de mi vida, y por haber puesto los medios necesarios para la realización de mis estudios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado para este trabajo: en el Proyecto 60477 "EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TRIPSINA RECOMBINANTE DE SARDINA MONTEREY" al Dr. F. J. Castillo-Yáñez, para la parte experimental de esta tesis y por la Beca para mis estudios de Maestría en Ciencias.

Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) por proporcionar el espacio para realizar mis estudios.

A mi director de tesis, Dr. Francisco Javier Castillo Yáñez permítame expresarle mi admiración y respeto. Agradezco profundamente la oportunidad que me ha dado de trabajar en este proyecto, gracias por su paciencia, sus consejos, excelente asesoramiento y su apoyo en todo momento. Muchas gracias por su dirección en esta tesis. Dios le bendiga mucho.

A mi comité de tesis, la Dra. Mary Islas Osuna del CIAD, la Dra. Ofelia Rouzaud y Dra. Marina Ezquerria Brauer quienes me han compartido en este tiempo de sus experiencias y conocimientos, sin los cuales no se hubiera desarrollado este trabajo. Gracias también por su asesoramiento y sus consejos en estos dos años de estudio.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) por abrirme las puertas para realizar la parte experimental de este trabajo de tesis. Gracias al Dr. Rogerio Sotelo y la Dra. Mary Islas quienes fueron los vínculos con esta institución,

por medio del Dr. Javier Castillo. Gracias al excelente asesoramiento de la Dra. Carmen Contreras durante todo el año dedicado a la tesis (experimental, manuscrito, presentaciones, etc). Agradezco también a la M.C. Karina García y el Dr. Aldo Arvizu por su asesoramiento.

A mis maestros del posgrado Dr. Armando Burgos Hernández, Dr. Jesús Barrón Hoyos, Dra. Maribel Plascencia, Dra. Reyna Luz Vidal Quintanar, Dra. Lourdes Aldana, Dr. Francisco Cinco Moroyoqui, Dr. José Luis Cárdenas López, Dr. Enrique Márquez muchas gracias por compartir de su conocimiento y su valioso tiempo cuando así lo requería.

A Coty muchas gracias por su apoyo, por estar siempre con una gran sonrisa y dispuesta a asesorarme en lo que ocupara.

Al personal del laboratorio de Investigación en Alimentos: a la Dra. Abril Graciano, Dr. Víctor Ocaño y al M.C. César Otero por su apoyo e interés en mi trabajo de tesis, siempre dispuestos a proporcionarme lo necesario para que avanzara. Muchas gracias a la maestra Susy también por su apoyo en el laboratorio.

Agradezco a unas excelentes personas que han estado conmigo en estos dos años, y me han permitido conocerlas, a mis amigas Alondra, Edissa, Larissa y Anabel muchas gracias por su amistad y por su apoyo que son muy importantes para mí.

Agradecer hoy y siempre a mi familia porque a pesar de no estar presentes físicamente, sé que procuran mi bienestar. A mis padres, mi hermana, mis tíos y primos porque a pesar de la distancia, el ánimo, apoyo y alegría que me brindan me dan la fortaleza necesaria para seguir adelante. Gracias también a mi tata Isaac, por haberme permitido residir en su casa y hacerme sentir como una hija más. Gracias tíos Kathy, Luis y Karina por su amistad y apoyo. Los quiero mucho.

DEDICATORIA

A **ti mamá**, con mucho amor y cariño le dedico todo mi esfuerzo y trabajo puesto para la realización de esta tesis, quien a lo largo de mi vida ha velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad. Y siempre recordándome que Dios es quien es el que otorga sabiduría a quien así se lo demanda.

A **ti hermana**, a quien quiero con toda el alma. Agradezco a Dios por tenerte como hermana y mi mejor amiga. Dios te bendiga mucho en esta nueva etapa de estudios que inicias. Es muy satisfactorio poder realizar los sueños anhelados. Muchas gracias por tu apoyo en todo momento, por animarme a seguir adelante. Dios te bendiga mucho.

CONTENIDO

	Página
APROBACIÓN.....	ii
©DERECHOS DE AUTOR.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	vi
CONTENIDO.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABLAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Enzimas.....	3
Enzimas como catalizadores biológicos.....	3
Factores que influyen sobre la estabilidad de las enzimas.....	4
Tipos de enzimas.....	4
La Tripsina como Modelo de Estudio.....	5
Isoenzimas de tripsina.....	6
Tripsinas de los grupos I, II y III.....	7
Tripsinas adaptadas al frío.....	8
Aplicaciones de tripsinas adaptadas al frío.....	10
Aplicaciones en la industria de los alimentos.....	11
Industria de detergentes.....	12
Tripsinas de origen marino.....	13
Producción de Tripsinas en Sistemas Heterólogos.....	14
Sobreexpresión de proteínas en <i>E. coli</i>	16
Sistema de expresión pET.....	17
Regulación del operador <i>lac</i>	17
Sobreexpresión de proteasas en <i>E. coli</i>	19
JUSTIFICACIÓN.....	21
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVOS.....	22

MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
Reactivos y Materiales.....	23
Expresión Heteróloga de Tripsina III de Sardina Monterey.....	25
Elección de la cepa de sobreexpresión.....	25
Microorganismos y vectores de expresión.....	25
Medios de cultivo.....	25
Transformación en <i>E. coli</i>	26
Detección de los clones recombinantes.....	27
Sobreexpresión recombinante de tripsina III.....	27
Análisis de la sobreexpresión.....	28
Análisis por Electroforesis.....	28
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	29
Tinción con azul de Coomassie.....	29
Actividad en gel (SDS-PAGE).....	29
Ensayos Enzimáticos.....	30
Ensayo de actividad de tripsina.....	30
Inhibición de tripsina.....	30
Determinación de proteína.....	31
Análisis de datos.....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
Expresión Heteróloga de Tripsina III de Sardina Monterey.....	32
Transformación en <i>E. coli</i>	32
Sobreexpresión de tripsina III.....	33
Condiciones de cultivo de las cepas de sobreexpresión.....	33
Rosetta (DE3)pLysS.....	33
Rosetta blue (DE3)pLysS.....	33
C41 (DE3)pLysS.....	33
C43 (DE3)pLysS.....	33
Rosetta gami (DE3)pLysS.....	33
Condiciones de cultivo.....	35
Expresión en Rosetta gami (DE3)pLysS.....	36
Expresión de tripsina III en cuerpos de inclusión.....	38

Ensayos Enzimáticos.....	39
Ensayo de actividad con BAPNA.....	39
Actividad en gel (SDS-PAGE).....	41
Inhibición de tripsina con TLCK.....	42
CONCLUSIONES.....	43
RECOMENDACIONES.....	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelación por homología basada en estructura de tripsina de salmón (<i>S. salar</i> 2TBS).....	6
Figura 2. Superposición de estructuras cristalinas de tripsina III de sardina Monterey (azul), y tripsina bovina (PDB 3A7T-1), (verde).....	9
Figura 3. Sistema de expresión para proteínas recombinantes utilizando como hospedero <i>E.coli</i> Rosetta gami (DE3)pLysS y como vector de expresión el vector pET32a.....	18
Figura 4. Secuencia de aminoácidos que codifican para tripsinógeno III, utilizada para la construcción del vector de expresión de <i>E. coli</i>	24
Figura 5. Construcción del vector de expresión pET32a-Tripsinógeno III de <i>E.coli</i>	24
Figura 6. Detección de clones recombinantes.....	32
Figura 7. Inducción de la expresión de tripsinógeno III.....	34
Figura 8. Sobreexpresión de tripsinógeno III-tioredoxina (trx) en la cepa Rosetta-gami (DE3) pLysS.....	38
Figura 9. Zimograma de actividad de tripsina III recombinante de sardina Monterey utilizando caseína como sustrato.....	41
Figura 10. Diagrama general para la recuperación de tripsina III de los cuerpos de inclusión.....	44

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Aplicaciones prácticas de tripsinas adaptadas al frío.....	11
Tabla 2. Enzimas marinas adaptadas al frío.....	15
Tabla 3. Ensayo de actividad con BAPNA.....	40
Tabla 4. Ensayo de inhibición de la fracción soluble sobreexpresada.....	42

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos que aceleran reacciones químicas a muy altas velocidades. Específicamente las enzimas proteolíticas son el grupo más prometedor para el proceso de alimentos debido a la información que existe sobre su actividad enzimática a distintas temperaturas. Dentro de las proteasas, una de las enzimas que más se ha estudiado es la tripsina, la cual tiene especificidad por aminoácidos básicos. Uno de los aspectos más interesantes que ha surgido del estudio de tripsinas es su adaptación al frío. Estudios reportados muestran como diversas especies de peces han presentado cambios estructurales en sus proteasas lo cual les confiere características únicas que incrementan su eficiencia catalítica. Debido a estas características novedosas, y a la identidad de secuencias aminoacídicas se han clasificado a las tripsinas en el nuevo grupo III.

En estudios recientes, se clonó el cDNA de la tripsina III de sardina Monterey cuya estructura primaria deducida fue sujeto de análisis estructurales y se obtuvo evidencias de su adaptabilidad al frío (Félix-López, 2006). Esta enzima, denominada tripsina III no se ha podido purificar a partir de tejido digestivo de la sardina en cantidades detectables. Sin embargo, su ADNc fue obtenido a partir de ARN aislado de ese tipo de tejido. Lo anterior permite la utilización de herramientas de biotecnología y técnicas de recombinación del ADN para la obtención de esta tripsina. Otras enzimas de importancia industrial se han producido (Demain, 2000; Sorensen y Mortensen, 2005), mediante el uso de sistemas heterólogos de expresión de enzimas, partiendo del ADNc que codifica su región codificante.

Hasta el momento el sistema de expresión más utilizado para la expresión de enzimas de peces es el de la bacteria *E. coli* (Ahsan *et al.*, 2005; Hanning y Makrides, 1998; Jonsdottir *et al.*, 2004; Ooi *et al.*, 2008; Pálsdóttir y Gudmundsdóttir, 2007; Palsdottir y Gudmundsdottir, 2008; Salle *et al.*, 2006). En sardina Monterey aún no se han realizado estudios de este tipo, siendo ésta una de las especies de mayor captura en el estado de Sonora, y es de gran importancia el estudio de enzimas

adaptadas al frío desde el punto de vista básico y biotecnológico debido a que han presentado eficiencias catalíticas mayores que sus homólogas de organismos terrestres. Por lo tanto puede realizarse la sobreexpresión de la tripsina III de sardina utilizando *E. coli*.

La producción de tripsina III recombinante permitirá obtenerla para caracterizarla, y conocer los detalles estructurales que determinan sus funciones catalíticas, de estabilidad y susceptibilidad a inhibidores. Este conocimiento es necesario para lograr un aprovechamiento óptimo de la misma. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue sobreexpresar la tripsina III de sardina Monterey para producir cantidad suficiente para su caracterización bioquímica y posteriormente estructural.

ANTECEDENTES

Enzimas

Las enzimas son proteínas globulares simples o conjugadas. Como todas las proteínas, las enzimas son polímeros lineales y monodispersos constituidos por unidades de α -L-aminoácidos enlazados entre sí mediante uniones tipo amida, conocidos como enlaces peptídicos. El enlace peptídico constituye una unidad rígida y planar, y ésta rigidez posibilita que las proteínas adopten estructuras tridimensionales bien definidas en soluciones acuosas (Voet y Voet, 1999).

Las enzimas como catalizadores biológicos.

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores biológicos, es decir, que aceleran las reacciones multiplicando su velocidad en factores de 10^6 a 10^{12} veces, las cuales transcurren bajo ciertas condiciones de temperatura, presión atmosférica y a valores de pH casi neutros. Además estas proteínas son capaces de llevar a cabo las reacciones en medio acuoso. Pocos catalizadores muestran todas estas propiedades (Copeland, 2000; Voet y Voet, 1999).

Las enzimas poseen un alto grado de especificidad por sus sustratos, y se destacan tanto su quimio y estereoespecificidad, además constituyen herramientas indispensables en diversas áreas de la ciencia y la tecnología. Siendo en la actualidad utilizadas como catalizadores importantes en diversos procesos industriales (Hansen *et al.*, 2003; Khantaphant y Benjakul, 2008; Zhou, 2003), en el análisis químico y clínico (Hosseinkhani y Nemat-Gorgani, 2003), en el procesamiento de alimentos (Morato *et al.*, 2000), en la agricultura (Belghith *et al.*, 2001) y en la biotecnología (Yamabhai *et al.*, 2008).

La función catalítica que desempeñan las enzimas está estrechamente relacionada con su compleja estructura molecular, la cual define la conformación del sitio activo de estos biocatalizadores. En este sentido, la acción conjunta de diferentes factores fisicoquímicos contribuye a estabilizar la estructura tridimensional activa de estas proteínas.

Factores que influyen en la estabilidad de las enzimas.

La estructura tridimensional de una proteína se estabiliza por diferentes tipos de interacciones no covalentes y covalentes, entre las que se destacan: la formación de puentes de hidrógeno, las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, las fuerzas de Van der Waals, la formación de puentes disulfuro y la presencia de enlaces de coordinación en las metaloproteínas (Copeland, 2000).

Una enzima perfectamente conformada puede perder su actividad biológica *in vitro* por la variación de uno o varios de los diferentes factores fisicoquímicos del medio en que se encuentre tales como pH, temperatura y fuerza iónica. Lo anterior provoca el desplegamiento de su estructura terciaria hasta obtenerse diferentes poblaciones moleculares con estructuras parcialmente desordenadas. Estos cambios estructurales pueden conllevar a una pérdida irreversible de la actividad enzimática (inactivación), como consecuencia del desplegamiento total de la proteína y la ocurrencia de procesos fisicoquímicos secundarios en estas nuevas formas estructurales. Cabe mencionar que estos factores van a variar, dependiendo de la enzima que se trate.

Tipos de enzimas.

De acuerdo a la clasificación establecida por la comisión internacional, las enzimas se han clasificado en 6 grandes categorías, de acuerdo a su mecanismo de acción, Oxido-Reductasas, Transferasas, Hidrolasas, Isomerasas, Liasas y Ligasas. Dentro del gran grupo de las hidrolasas, se encuentran las enzimas proteasas las cuáles participan en la hidrólisis de las proteínas (Copeland, 2000). Actualmente se sabe que las enzimas proteasas se producen, ya sea en el páncreas o ciego pilórico en forma de zimógenos. Dentro del grupo de las proteasas se encuentran la tripsina, quimotripsina, elastasa, pepsina, gastricina de las cuales la tripsina es la más abundante y una de las más estudiadas.

La Tripsina como Modelo de Estudio

La enzima tripsina E.C. 3.4.21.4 es una endoproteasa digestiva que pertenece al grupo de las serina proteasas, que se caracterizan por cortar las cadenas de proteínas por el extremo carboxilo de aminoácidos básicos como arginina o lisina (Barret *et al.*, 1998). Esta enzima se ha extraído de los ciegos pilóricos o intestinos de diversas especies, entre las que se encuentra la carpa (*Ctenopharyngodon idella*) (Liu *et al.*, 2008), el abadejo (*Theragra chalcogramma*) (Kishimura *et al.*, 2008) y la sardina (*Sardinops sagax caerulea*) (Castillo-Yáñez *et al.*, 2005).

La tripsina es secretada como un precursor inactivo llamado tripsinógeno el cual se activa por acción de la enteropeptidasa, una proteasa que es secretada en el duodeno que elimina el péptido señal de la tripsina, el cual posee un longitud entre 13 a 15 aminoácidos. Adyacente a este péptido, se encuentra el de activación el cual contiene residuos con carga negativa. Los dos péptidos se localizan en el extremo N-terminal de las tripsinas (Barret *et al.*, 1998). La eliminación de estos péptidos permite el plegamiento y formación de tripsina activa, la cual activará de manera autocatalítica a otras moléculas de tripsinógeno, además de activar a otros zimógenos como el quimotripsinógeno (Haard y Simpson, 2000).

La forma activa de la tripsina, incluye un extremo N-terminal conservado, cuya secuencia de aminoácidos IVGG se encuentra completamente conservado en casi todas las tripsinas activas (Barret *et al.*, 1998). También están conservados, los aminoácidos que forman la triada catalítica (His57, Asp102 y Ser195) (Residuos correspondientes a la tripsina bovina), así como tres pares de residuos de cisteína que forman puentes disulfuro, y un residuo de Asp189, que es determinante para la especificidad de las tripsinas (Barret *et al.*, 1998) como se muestra en la **Figura 1**. El plegamiento de la tripsina biológicamente activa contiene seis puentes disulfuro y está formado por dos dominios conectados mediante dos lazos y una hélice α . Cada dominio se encuentra conformado por seis hojas β con una arquitectura de barril (Leiros *et al.*, 2000).

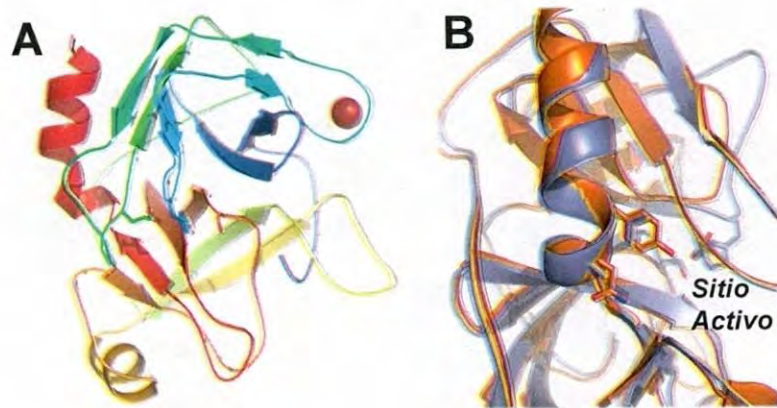


Figura 1. Modelación por homología basada en estructura de salmón (*S. salar* 2TBS). En el modelo A se muestran los residuos del sitio activo de tripsina III de sardina Monterey (His63, Asp109 y Ser201). En el modelo B se observan las cadenas α -hélice, C-terminal (residuos: tripsina de salmón, 212 y tripsina III, 236), y el sitio activo al fondo (Modelación realizada por el Dr. Aldo A. Arvizu Flores. QB, UNISON, 2010).

La tripsina es una enzima que ha sido ampliamente estudiada en vertebrados e invertebrados, de la que actualmente se conocen muchas estructuras cristalinas, secuencias de aminoácidos y/o ácidos nucleicos además de algunas de sus isoformas. Se ha sugerido que debido a la intensa presión selectiva del medio, el tripsinógeno de vertebrados ha divergido de otros tripsinógenos manteniendo su función mediante evolución dinámica en la que se ha duplicado una gran parte de su gen, dando lugar a dos grupos de genes de tripsinógeno, grupo I y II (Roach, 2002).

Isoenzimas de tripsina.

Las tripsinas de vertebrados se diferencian en base a su secuencia nucleotídica y, por su carga a pH fisiológico. Las tripsinas del grupo I son aniónicas a pH fisiológicos, mientras que las tripsinas del grupo II comúnmente son catiónicas a pH fisiológico y se ha visto que la mayoría de los vertebrados poseen al menos un gen de tripsinógeno o isoforma de cada grupo (Roach, 2002).

A principios de los años noventa se pensaba que los peces poseían únicamente tripsinas aniónicas (grupo I), las cuales presentaban peso molecular,

composición de aminoácidos, requerimientos de calcio y reacción con sustratos e inhibidores similares a los de mamíferos. Respecto de los requerimientos de calcio, se cree que en presencia de iones calcio, la tripsina experimenta cambios conformacionales que le otorgan mayor compacidad a la estructura, haciéndola más resistente a la autólisis (Kim *et al.*, 1994). Algunas publicaciones recientes demuestran estos cambios, una de ellas es la de Klomklao y colaboradores, realizado en atún skipjack (*Katsuwonus pelamis*) en donde determinaron el efecto de los iones calcio sobre la estabilidad térmica de dos isoformas de tripsina, a las que nombraron A y B encontrando similitud con la tripsina pancreática porcina (Klomklao *et al.*, 2004).

Otra de las características importantes de tripsina es la capacidad de realizar autólisis, y al respecto existe un estudio en el que observaron los efectos del calcio sobre la estructura y regulación de autólisis, para lo cual utilizaron secuencias de tripsinas de mamíferos y de pescados del Protein Data Bank (PDB) (Papaleo *et al.*, 2005). En este trabajo los autores concluyen que la eliminación de calcio (Ca^{2+}) no solo incrementa la flexibilidad de las regiones junto al sitio de unión, en el dominio N-terminal, sino que también permite la canalización de fluctuaciones a sitios remotos en el dominio C-terminal. Además, los dos sitios de autólisis primaria se vieron influenciados fuertemente por la unión con calcio en tripsina bovina, mientras que el efecto de éste en tripsina de salmón resultó menos fundamental (Papaleo *et al.*, 2005). Por lo tanto, se recomienda que la solución amortiguadora de reacción deba contener cantidades moderadas de CaCl_2 (20 mmol/L) para la máxima actividad y estabilidad de la proteasa (Briand *et al.*, 1997; Brinen *et al.*, 1996). Esta información resulta de importancia cuando se requiere del estudio de tripsinas con técnicas de biofísica estructural.

Tripsinas de los grupos I, II y III.

Fue en el año 1995 cuando se clonaron, secuenciaron y caracterizaron cuatro tripsinas aniónicas y una catiónica (grupo II) a partir de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Male *et al.*, 1995). En 1999, Spilliaert y Gudmundsdóttir, encontraron la secuencia de una tripsina del bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) que poseía

solamente un 45% de similitud con las tripsinas del grupo I y una similitud del 70% con las tripsinas de dos lenguados y de un pez del antártico. A esta proteína la llamaron "Tripsina Y" y crearon para ella y sus similares el denominado "grupo III".

Posteriormente, se elucidó la secuencia deducida de aminoácidos que codifica para la tripsina de la solla europea (*Pleuronectes platessa*) (Suzuki *et al.*, 2002), quedando clasificada también dentro del grupo III. Así, todas aquellas secuencias obtenidas de diversos peces como el pez trama negra (*Notothenia coriiceps*) además de los lenguados *Pleuronectes americanus* (Douglas y Gallant, 1998) y *Paralichthys olivaceus* (Suzuki *et al.*, 2002), confirmaron la existencia de una nueva clase de tripsinas, denominado del grupo III (Roach, 2002).

Hasta el año 2005 se conocían secuencias aminoacídicas deducidas de aminoácidos de siete tripsinas del grupo III, las cuales presentaban una identidad entre el 57 y 94%. Los estudios estructurales de la tripsina III del bacalao del Atlántico y la tripsina I del mismo organismo indican que las estructuras tridimensionales son muy similares a pesar de la relativa baja identidad de secuencias (Gudmundsdóttir y Páldsdóttir, 2005; Roach, 2002).

A pesar de la similitud de las estructuras de ambas isoformas, la modelación molecular indica que existen diferencias entre las tripsinas del grupo I y las del grupo III, en los residuos que contribuyen para una mayor especificidad hacia el sustrato. Por ejemplo en los lazos que juegan un papel crucial en la determinación de la afinidad de la enzima por el sustrato. Se ha observado que las tripsinas de este grupo III poseen una serie de mutaciones localizadas alrededor de los residuos estrictamente conservados de la triada catalítica. Además se han encontrado algunas alteraciones cerca del bolsillo catalítico del mismo grupo (Gudmundsdóttir y Páldsdóttir, 2005).

Analizando más a detalle, parece ser que el cambio más importante se presenta en el residuo de Ser-190, localizado en la base de la cavidad de unión del sustrato en la tripsina del grupo I, el cual es reemplazado por una Ala-190 en tripsinas del grupo III (Gudmundsdóttir y Páldsdóttir, 2005) (**Figura 2**). El residuo de Ser-190 de las tripsinas del grupo I establece un puente de hidrógeno con sustratos que contienen arginina o lisina (Perona y Craik, 1995), modulando así la

especificidad de la enzima. Por el contrario, la presencia de una Ala-190 reemplazando esta serina no permite la formación del puente de hidrógeno con el sustrato provocando una menor especificidad a sustratos específicos y permite la hidrólisis de otros sustratos con parecido estructural (Gudmundsdóttir y Páldsdóttir, 2005).

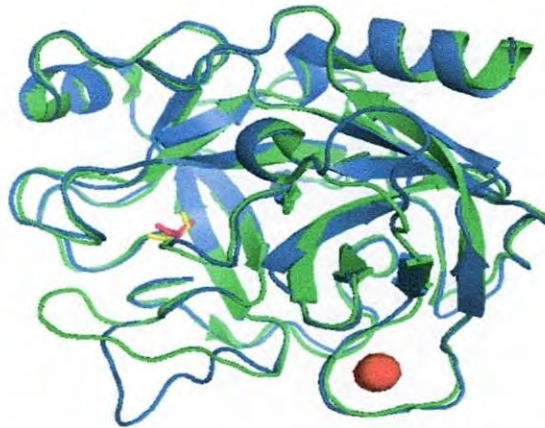


Figura 2. Superposición de estructuras cristalinas de tripsina III de sardina Monterey (azul), y tripsina bovina (PDB 3A7T-1), (verde) (Modelación realizada por el Dr. Aldo A. Arvizu Flores. QB, UNISON, 2010).

Tripsinas adaptadas al frío.

Uno de los aspectos más importantes que han surgido de los estudios de las tripsinas de peces es la adaptación de muchas tripsinas a bajas temperaturas. Las tripsinas adaptadas al frío de peces muestran eficiencias catalíticas aproximadamente 20 veces mayores que sus homólogos de animales terrestres (Jonsdottir *et al.*, 2004), y es un hecho que los organismos que viven en ambientes fríos constantes, han tenido que adaptar su metabolismo a las bajas temperaturas. Sin embargo, los mecanismos de la adaptación al frío se deben a una reducción en la energía de activación, que posiblemente es originada por un incremento en la flexibilidad de un área específica de la molécula o bien de la estructura completa.

Las tripsinas del grupo I son consideradas como adaptadas al frío y actúan a temperaturas de 4 a 37°C, mientras que las tripsinas del grupo III se consideran adaptadas al frío extremo y actúan a temperaturas muy cercanas a los 0°C (Feller *et al.*, 1997; Georlette *et al.*, 2004; Gorfe *et al.*, 2000). El estudio de las estructuras cristalinas de tripsinas de salmón y bovina, confirmó que el número de puentes de hidrógeno en la estructura de la tripsina de salmón es menor al de la bovina. Esa diferencia se encuentra principalmente en los lazos entre los dominios, lo cual sugiere que la flexibilidad de las enzimas adaptadas al frío les confiere habilidades para presentar cambios conformacionales durante su catálisis y aumentar así su eficiencia catalítica (Feller *et al.*, 1997; Leiros *et al.*, 2000).

En un estudio realizado en Lisozima de insecto (*Manduca sexta*), se comparó a ésta enzima que es adaptada al frío, con enzimas mesófilas provenientes de animales terrestres, y de acuerdo con los parámetros diferenciales de entalpía, reflejaron diferencias en la energía de activación (E_a). Las energías de activación bajas son características de enzimas adaptadas al frío y es el parámetro más utilizado para identificar su adaptación. El valor negativo de este parámetro reflejó que la lisozima tuvo una E_a más baja comparada con una lisozima mesofílica y consecuentemente mantuvo mayor actividad catalítica a temperaturas más bajas (Sotelo-Mundo *et al.*, 2007). Esto se puede traducir en eficiencias catalíticas mayores, además de costos energéticos bajos, factores deseables a nivel industrial.

Por lo tanto, es claro que la gran eficiencia catalítica a bajas temperaturas que muestran este tipo de enzimas les otorga ventajas definitivas, respecto de sus homólogas mesofílicas. Por lo anterior, y con base en estudios comparativos anteriores, la tripsina es una enzima con gran potencial para futuras aplicaciones biotecnológicas en procesos donde se requiera proteólisis a bajas temperaturas (Leiros *et al.*, 2000).

Aplicaciones de tripsinas adaptadas al frío.

Las tripsinas adaptadas al frío se han aplicado en algunos procesos donde se requiere proteólisis a bajas temperaturas. Estos procesos fueron reportados para algunas especies de peces como se muestra en la **Tabla 1**, cada enzima proveniente

de fuentes animales y microbianas. Estos estudios resumen la diversidad de aplicaciones que pueden tener las diferentes isoenzimas de tripsina.

Tabla 1. Aplicaciones prácticas de tripsinas adaptadas al frío.

Enzima	Especie	Fuentes de origen	Aplicación	Referencias
Tripsina	Pargo rojo (<i>Lutjanus vitta</i>) Pargo patudo (<i>Priacanthus cayenus</i>) Nemipteridae (<i>Nemipterus marginatus</i>)	Ciego pilórico	Producción de hidrolizados de gelatina con actividad antioxidante	Khantaphant y Benjakul, (2008)
Tripsina	<i>Streptomyces erythraeus</i>	Bacteriano	Aplicable en Proteómica	Miyagi <i>et al.</i> , (2009)
Tripsina I	Bacalao del atlántico (<i>Gadus morhua</i>)	Ciego pilórico	Procesamiento de alimentos a temperaturas bajas. Producción de saborizantes de mariscos	Bjarnason y Benediktsson, (2001)
Tripsina I	Bacalao del atlántico (<i>Gadus morhua</i>)	Ciego pilórico	Digestión de proteínas a baja temperatura	Bjarnason <i>et al.</i> , (1993)
Tripsina III	<i>Bacillus cereus</i>	Bacteriano	Tratamiento de aguas marinas	Sang-Lang <i>et al.</i> , (2009)

Aplicaciones en la industria de los alimentos.

El procesamiento de alimentos a temperaturas bajas minimiza las reacciones químicas indeseables así como la contaminación bacteriana, que incluso podrían elevarse a altas temperaturas. Una de las ventajas radica en que cuando la actividad enzimática necesita controlarse, las enzimas adaptadas al frío son fácilmente inactivadas por un calentamiento relativamente bajo (30-50°C). Aunado a esto, las enzimas proteolíticas adaptadas al frío, por las altas eficiencias catalíticas que presentan, son más económicas debido al requerimiento de pequeñas cantidades de

la enzima en comparación de sus análogas mesofílicas. La alta eficiencia catalítica de tripsina I de bacalao del Atlántico es especialmente útil en el procesamiento de alimentos frescos en que se requiera la digestión de proteínas a bajas temperaturas (Bjarnason *et al.*, 1993).

La aplicación industrial de tripsina de bacalao involucra la producción de saborizantes marinos naturales de langosta, camarón, cangrejo y otros productos marinos, productos que actualmente se comercializan a nivel internacional (Shahidi y Janak Kamil, 2001). Asimismo, se ha publicado la aplicación de una tripsina del grupo III que le llamaron Y, misma que se caracterizó como adaptada al frío y se utiliza actualmente como auxiliar de procesos para productos sensibles al calor como los productos marinos, por ejemplo, en la obtención de caviar (Pálsdóttir y Gudmundsdóttir, 2008). Otra aplicación importante se ha estudiado en la industria de cereales, donde se ha reportado que la adición de tripsina de sierra en las masas, modifica las propiedades fisicoquímicas de las proteínas de gluten, logrando disminuir la fuerza de este (Cabrera *et al.*, 2010).

Industria de detergentes.

Una de las aplicaciones biotecnológicas importante desde hace años, es en la industria de detergentes. El uso de enzimas como un ingrediente activo en los detergentes ha representado grandes aplicaciones en la industria enzimática, siendo las enzimas proteasas las que más se utilizan para este fin. Esto ha sido posible también por la habilidad de éstas enzimas para actuar a temperaturas bajas (Kirk *et al.*, 2002). Existe el estudio de tripsina de lubina rayada (*Lithognathus mormyrus*), en el cual la enzima mostró una excelente estabilidad frente a varios surfactantes y agentes blanqueadores, y compatibilidad con algunos detergentes comerciales líquidos y en polvo (Hadj *et al.*, 2009).

Desde una perspectiva aplicada, las enzimas bacterianas sutilisinas son el subgrupo de serina proteasas de mayor importancia en la industria de detergentes, en particular aquellas producidas por bacilos selectos (Haard y Simpson, 2000).

Tripsinas de origen marino.

Se puede enunciar que la tripsina es una enzima digestiva que tiene aplicaciones industriales y biomédicas principalmente debido a su alta especificidad que permite una proteólisis controlada. Esta enzima se ha aislado de una gran variedad de animales terrestres y últimamente ha cobrado mucho interés el estudio de tripsina de algunos animales marinos, principalmente peces como el bacalao del atlántico, la anchoveta, bacalao, lisa, capelin, bagre, sardina y salmón, entre otros (Castillo-Yáñez *et al.*, 2005; Jonsdottir *et al.*, 2004; Kishimura *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2008; Olivas-Burrola *et al.*, 2001). Esto debido a que a través de los años, los animales marinos se han adaptado a diferentes condiciones ambientales. Esas adaptaciones, junto con variaciones genéticas inter e intra especies, han resultado en proteasas digestivas con innegables propiedades únicas comparadas con sus enzimas homólogas de animales terrestres, plantas y microorganismos (Haard y Simpson, 2000; Neurath, 1984).

En el año 2005, Castillo-Yáñez y colaboradores, purificaron y caracterizaron la tripsina de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) que habita en aguas cuya temperatura promedio se encuentra alrededor de los 17°C. En su estudio observaron que la estabilidad de ésta tripsina es análoga a las de peces de aguas frías, por ser termolábil a temperaturas menores a 50°C y estable a menores de 30°C. La tripsina pura también mostró una eficiencia catalítica muy superior a la de tripsina bovina y gran actividad a 25°C (Castillo-Yáñez *et al.*, 2005).

Estudios más recientes se centraron en el análisis molecular y estructural de ésta tripsina (*Sardinops sagax caerulea*), empleando técnicas de biofísica estructural y biología molecular (Félix-López, 2006). Los resultados demostraron que se trata de una tripsina del grupo I de acuerdo a la similitud estructural que presenta con tripsinas de otras especies de peces pertenecientes a este grupo de enzimas adaptadas al frío. En comparación con el salmón, aún cuando el contenido de cargas negativas es menor, la tripsina de sardina mantiene una mayor proporción de cargas negativas en el dominio carboxilo terminal induciendo a una mejor unión al sustrato lo cual aumenta la eficiencia catalítica de las proteínas adaptadas al frío.

Al mismo tiempo en este trabajo, se detectó la presencia de al menos dos isoformas de tripsina en la sardina Monterey a nivel de ADNc, una de ellas correspondiente a la ya mencionada tripsina del grupo I, que posee estructura similar a la tripsina bovina; y la otra corresponde a una tripsina del grupo III según las características estructurales deducidas (Félix-López, 2006). Estas secuencias de ADNc corresponden a un 90% de la estructura total e incluyen la totalidad del sitio activo y el bolsillo característico de estas enzimas, y de ellas se tiene totalmente elucidada la secuencia codificante, correspondiente a tripsina III (Anaya, 2008).

Los resultados obtenidos sugirieron que la tripsina III de sardina Monterey puede ser muy útil para aplicaciones biotecnológicas a bajas temperaturas, ya sea aislada de su fuente nativa a partir del tejido digestivo del organismo o sobreexpresada en un sistema heterólogo y purificada cromatográficamente.

Producción de Tripsinas en Sistemas Heterólogos

La expresión de proteínas heterólogas tiene como fin la obtención de las mismas en cantidades suficientes para su purificación y cristalización, por ello se han implementado sistemas alternativos de expresión eucarióticos y procarióticos. Es importante elegir y/o diseñar un sistema de expresión adecuado y la cepa más apta, de modo que sean compatibles y cumplan con las características que se desean en la enzima de interés, además es necesario el uso de proteínas de fusión para favorecer la purificación y el correcto plegamiento de las proteínas recombinantes. Los avances en la tecnología del ADN recombinante han hecho posible la producción de proteínas en diversos sistemas de expresión heteróloga, tales como la bacteria *Escherichia coli* (Sorensen y Mortensen, 2005; Tsao *et al.*, 2006), la levadura *Pichia pastoris* (Cereghino y Cregg, 2000), o plantas (Yoshida y Shinmyo, 2000). En la **Tabla 2**, se observan algunos ejemplos detallados de diversos sistemas de expresión que se han utilizado recientemente, mismos que han resultado exitosos.

Tabla 2. Enzimas marinas adaptadas al frío. Sistemas de expresión heteróloga.

Enzima	Especie	Método de clonación	Sistema de expresión	Producto obtenido	Rendimiento	PM (KDa) proteína-fusión	PM (KDa) nativa	Referencia
Tripsina	Tautoga americana <i>Tautoglabrus adpersus</i>	<i>P. pastoris</i> Vector PPICZB	<i>Pichia pastoris</i>	Tripsinógeno	Bajo	–	–	Macouzet et al., (2005)
Tripsina I	Bacalao del atlántico <i>Gadus morhua</i>	<i>E. coli</i> pThioHis A	<i>E. coli</i>	Tripsinógeno (soluble)	10 g/L cultivo 79%	39	24	Jónsdóttir et al., (2004)
Proteasa alcalina	Levadura marina <i>Aureobasidium pullulans 10</i>	Vector pINA1317 Gen ACP1 PCR inversa/ RT-PCR	<i>Yarrowia lipolytica</i>	–	–	–	42.9	Ni et al., (2008)
Tripsinas del grupo III	Bacalao del atlántico <i>Gadus morhua</i>	Vector pET32a	<i>E. coli</i>	r-tripsina Y-tripsina (Zimógenos)	9 g/L cultivo 43%	40	23.5	Páldsdóttir y Gudmundsdóttir (2008)
Tripsinógeno	Anchoa <i>Engraulis japonicus</i>	Vector pETBlue-aTg II	<i>E. coli</i>	Tripsinógeno (Cuerpos de inclusión)	45 g/L cultivo 12 mg TAP	–	–	Ahsan et al., (2005)

Porcentaje de la última etapa de purificación.
TAP = Tripsina Activa Pura

Sobreexpresión de proteínas en *E. coli*.

Respecto del sistema de expresión en *E. coli*, éste ha sido ampliamente utilizado debido a que *E. coli* es la especie más empleada y estudiada tanto genética como fisiológicamente. Entre las ventajas que brinda este microorganismo como hospedero están: rápida generación de biomasa (elevada velocidad de crecimiento), fácil manipulación genética, no posee requerimientos costosos asociados a medios de cultivo o equipamiento, alta eficiencia en la incorporación de material genético foráneo, gran variedad de vectores de expresión y variantes mutantes (Jonasson *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2006).

Un proceso importante, previo a la sobreexpresión es el de transformación de la cepa, mediante el cual se introduce el vector que contiene al inserto dentro del sistema de expresión elegido. En el caso de utilizar la bacteria *E. coli* como sistema de expresión, la selección de clones transformados se hace mediante el cultivo de las células en presencia del antibiótico de selección, cuyo gen se encuentra incluido en el vector. Aquellas colonias que sean capaces de crecer en presencia del medio más el antibiótico son las que incorporaron exitosamente el vector durante el proceso de transformación.

Hasta el momento el sistema de expresión más utilizado para la expresión de enzimas es la bacteria *E. coli* (Ahsan *et al.*, 2005; Hanning y Makrides, 1998; Jonsdottir *et al.*, 2004; Ooi *et al.*, 2008; Páldsdóttir y Gudmundsdóttir, 2006; Palsdóttir y Gudmundsdóttir, 2008; Salle *et al.*, 2006; Sorensen y Mortensen, 2005). Los parámetros importantes para una exitosa producción de proteínas recombinantes en *E. coli* incluyen eficiencia transcripcional y traduccional, estabilidad del vector de expresión y de los mRNA transcritos, estabilidad proteolítica, localización y plegamiento de la proteína (Jonasson *et al.*, 2002). La elección del vector de expresión puede incrementar la solubilidad y/o plegamiento de 3 formas: fusión a un polipéptido soluble, fusión a una enzima que catalice la formación de puentes disulfuro y fusión a una secuencia señal para transporte al espacio periplasmático. La exportación de proteínas al periplasma permite que la proteína posea un buen plegamiento y además favorece la formación de puentes disulfuro debido a la

presencia de enzimas que catalizan su formación. En consecuencia se obtienen proteínas solubles y activas (Novagen, 2006; Larsen *et al.*, 2008).

Para la obtención de proteínas recombinantes es preciso multiplicar la biomasa del sistema de expresión y luego proceder a la inducción mediante el agregado de un agente inductor de la expresión de las proteínas. El proceso de inducción consiste en el análisis de las muestras inducidas a diferentes tiempos, donde mediante electroforesis se pueden observar las bandas de proteína en cada tiempo de inducción, y de esta manera determinar el tiempo óptimo.

Sistema de expresión pET.

El sistema pET (plásmido de expresión regulado por el promotor T7) es uno de los más utilizados, desarrollado para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Los genes de interés son clonados en los plásmidos pET bajo el control en las señales de transcripción y traducción del bacteriófago T7. La expresión es inducida por la T7 RNA polimerasa que está codificada y es expresada en la célula huésped. La T7 RNA polimerasa sintetiza el RNA mensajero de la proteína recombinante para posteriormente ser procesados por el ribosoma. Otra ventaja de este sistema es la capacidad de mantener a los genes de interés transcripcionalmente silenciados, previo a la inducción (Novagen, 2006).

Los genes a sobreexpresarse son inicialmente clonados usando cepas utilizadas para esos fines. Una vez obtenido el plásmido con la clona correcta (Sambrook y Rusell, 2001) se transforma dentro de una cepa de expresión que contiene una copia cromosomal del gen de la T7 RNA polimerasa, bajo el control del *operador lac*, donde la expresión es inducida por la adición de IPTG, como se observa en la **Figura 3**.

Regulación del *operador lac*.

La regulación de la expresión de genes se encuentra relacionada a la fuerza del promotor. Un sistema promotor regulable proporciona la habilidad de activar la expresión del gen foráneo variando un factor ambiental, como la concentración de un

componente particular en el medio de cultivo. El promotor *lac*, proveniente del operón lactosa de *E. coli*, es uno de los promotores más comúnmente utilizados para regular la expresión de genes recombinantes en bacterias y ha sido extensamente caracterizado a nivel molecular (Donovan *et al.*, 1998). El operador *lac* consiste de tres genes estructurales *lacZ*, *lacY*, y *lacA* que codifican las enzimas para la utilización de lactosa. En los experimentos *in vitro* se utiliza un inductor sintético como el isopropil-tiol-galactósido (IPTG) el cual induce al operador *lac*, presentando la ventaja de que este inductor no es degradado por la acción de la β -galactosidasa, contrario a lo que ocurre con lactosa.

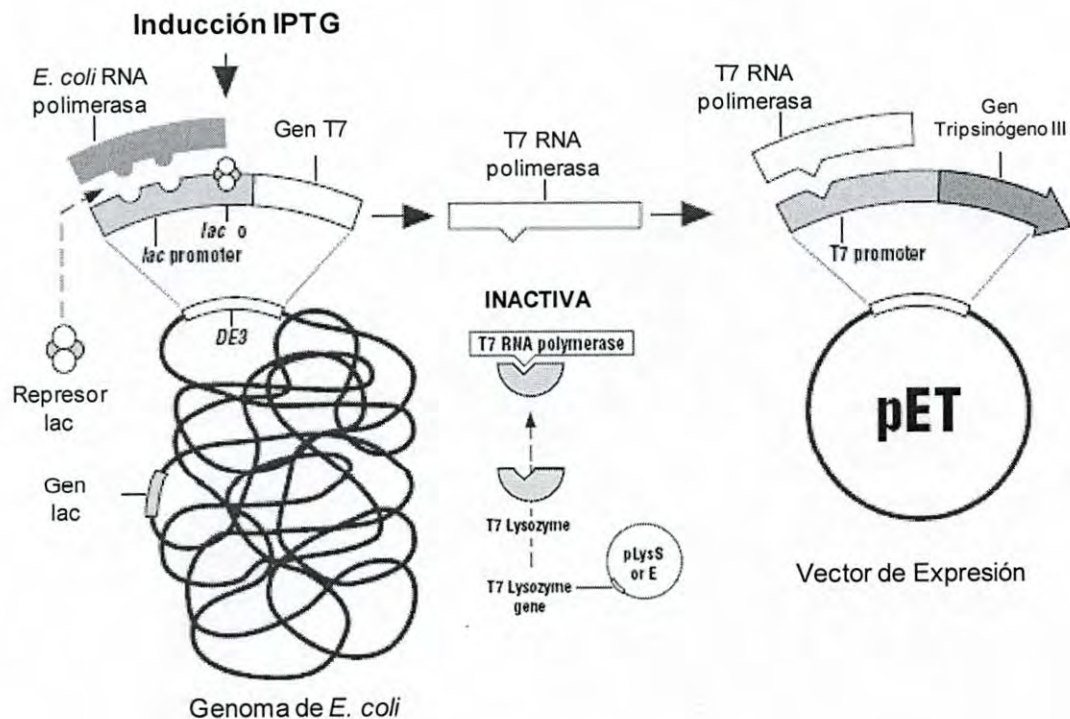


Figura 3. Sistema de expresión para proteínas recombinantes utilizando como hospedero *E.coli* Rosetta gami (DE3)*pLysS* y como vector de expresión el vector *pET32a*. A la izquierda de la imagen es posible apreciar la inducción por IPTG de la transcripción de T7 RNA polimerasa, la cual, una vez expresada transcribe el gen de la proteína recombinante de interés, bajo la inducción del mismo compuesto, IPTG (Novagen, 2006).

La **Figura 3**, muestra los elementos disponibles para el control de los niveles de T7 RNA polimerasa y la posterior transcripción del gen insertado en el vector pET. En lisógenos λ DE3, la RNA polimerasa del fago T7 se encuentra bajo el control del promotor *lacUV5*, el cual permite un grado de transcripción en el estado no inducido y en la ausencia de control adicional, es recomendado para la expresión de variados genes cuyos productos tienen efectos inocuos en el crecimiento de las células hospederas (Novagen, 2006).

Sobreexpresión de proteasas en *E. coli*.

Por otro lado, la sobreexpresión, activación y purificación de proteasas adaptadas al frío ha sido muy problemática debido a la tendencia de estas enzimas a la degradación autolítica, inactivación térmica y agregación molecular. Reducir la temperatura permite disminuir la sobreproducción de proteínas y así disminuir la sobrecarga en la maquinaria transcripcional (Gordon *et al.*, 2008). Se ha demostrado que la sobreproducción de proteínas recombinantes en *E. coli* a 37°C induce a la formación de cuerpos de inclusión, mientras que a bajas temperaturas se genera un incremento en el plegamiento correcto de las proteínas producidas y la ubicación en los compartimentos deseados (Chen *et al.*, 2003; Novagen, 2006). Sin embargo, un decremento pronunciado de la temperatura genera múltiples cambios celulares en respuesta, lo cual se conoce como “*cold-shock adaptation*” que provoca ineficiencias en el plegamiento de las proteínas (Gordon *et al.*, 2008).

Hay publicaciones de numerosos trabajos realizados sobre producción de proteasas en diversos sistemas de expresión, lo que indica que las proteasas pueden ser expresadas en la mayoría de los sistemas de expresión utilizados actualmente (Gasparian *et al.*, 2003; Hohenblum *et al.*, 2004; Kiser *et al.*, 2009), y no exclusivamente en *E. coli*. Así, se han expresado tripsinas adaptadas al frío específicas de diferentes especies, tales como la tripsina del pez *Tautogolabrus adspersus*, en *P. pastoris* (Macouzet *et al.*, 2005); tripsina I de bacalao del atlántico (*Gadus morhua*) en *E. coli* (Jonsdottir *et al.*, 2004); tripsina III de bacalao del atlántico (*Gadus morhua*) en *E. coli* (Palsdottir y Gudmundsdottir, 2007) y tripsina Y, del grupo

III de bacalao del atlántico (*Gadus morhua*) en *E. coli* (Palsdóttir y Gudmundsdóttir, 2008).

En el caso de la tripsina III de bacalao del atlántico, se utilizó la estrategia de fusión a la tioredoxina, para favorecer la producción de la enzima recombinante de forma soluble. Referente a la tioredoxina, es una proteína pequeña (109 aminoácidos), que facilita la expresión soluble de varios factores de crecimiento de mamíferos, ésta proteína de fusión evita que se formen cuerpos de inclusión.

Además de favorecer la solubilidad, al fusionar tioredoxina a la proteína de interés, la otra característica del vector pET32a es la adición de una secuencia de histidinas creando un dominio de unión a metales en la proteína sobreexpresada, logrando con esto facilitar la purificación de la enzima en una resina de afinidad por metales (Jonsdottir *et al.*, 2004; LaVallie *et al.*, 1993; Palsdottir y Gudmundsdottir, 2007). Sin embargo, existen algunos estudios donde la proteína sobreexpresada no se produce en forma soluble, sino en forma de aglomerados insolubles llamados cuerpos de inclusión, que son el resultado de que se produzcan altos niveles de proteína en el citoplasma. Bajo condiciones adecuadas, las proteínas recombinantes depositadas en cuerpos de inclusión pueden alcanzar el 50% o más de la proteína total celular (Wong *et al.*, 1998). En la sobreexpresión de tripsinógeno de anchoa en *E. coli*, se obtuvo en forma de cuerpos de inclusión, por lo que se procedió al replegamiento y activación de la enzima a partir de los cuerpos de inclusión bacterianos (Ahsan *et al.*, 2005).

Actualmente los estudios de sobreexpresión heteróloga en bacalao del atlántico son los únicos referentes a la tripsina III adaptada al frío. En sardina Monterey no se han realizado estudios de este tipo por lo que el presente trabajo aporta información concerniente a la sobreexpresión de la enzima tripsina III de sardina Monterey, siendo ésta una de las especies de mayor captura en el estado de Sonora, es de gran importancia el estudio de enzimas adaptadas al frío desde el punto de vista básico y biotecnológico debido a que han presentado eficiencias catalíticas mayores que sus homólogas de organismos terrestres. Por lo tanto puede realizarse la sobreexpresión de la tripsina III de sardina utilizando *E. coli*.

JUSTIFICACIÓN

En producción pesquera, México dispone de aproximadamente 11.500 km² de litoral. En los últimos diez años, el promedio anual de captura global ha sido de 12 millones de toneladas métricas. Las principales especies por volumen son la sardina, el atún y el camarón, siendo la región el pacífico norte la más importante del país (OEIDRUS-SAGARPA, 2006). El estado de Sonora dispone de 1,207 km² de litoral y ocupa el primer lugar a nivel nacional en producción pesquera, siendo la principal especie de captura, la sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*). La captura en peso vivo en el año 2005 fue de 356,200 toneladas, cifra que ascendió a 548,699 toneladas recientemente (OEIDRUS-SAGARPA, 2006; 2008). A partir de esta importante especie del estado de Sonora, se han realizado estudios muy interesantes sobre la tripsina I que ésta produce. El estudio de la tripsina III y su adaptabilidad al frío es más reciente, y se considera muy importante debido a que las tripsinas adaptadas al frío presentan mejores eficiencias catalíticas que sus homólogas de organismos terrestres a bajas temperaturas (Castillo-Yáñez *et al.*, 2005). La tripsina III se espera sea muy útil debido a la adaptabilidad al frío extremo demostrada en tripsinas de este tipo en otras especies de peces (Pálsdóttir y Gudmundsdóttir, 2006; Siddiqui y Cavicchioli, 2006). Sin embargo, su obtención a partir de sardinas no ha sido posible a la fecha, por lo cual se requiere utilizar sistemas de expresión heteróloga para obtenerla en cantidad suficiente para su caracterización.

Por otra parte existe evidencia de la presencia de los transcritos o ARNm de tripsina III en sardina Monterey y además se conoce su secuencia nucleotídica (Anaya, 2008; Félix-López, 2006). Por lo anterior es posible sobreexpresarla de forma heteróloga en la bacteria *E. coli* ya que este sistema se ha utilizado con éxito en la sobreexpresión de enzimas de otras especies de peces (Pálsdóttir y Gudmundsdóttir, 2007; Palsdottir y Gudmundsdottir, 2008). La sobreexpresión de tripsina III en *E. coli* permitirá producirla y determinar sus características bioquímicas y estructurales, y en el futuro poder utilizarla en procesos biotecnológicos.

HIPÓTESIS

La tripsina III de sardina se sobreexpresa en *E. coli* en la conformación correcta, presentando actividad con el sustrato BAPNA.

OBJETIVOS

Objetivo General

Sobreexpresar la enzima tripsina III de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) en *E. coli* a partir de su precursor tripsinógeno.

Objetivos Particulares

- Transformar cepas de sobreexpresión de *E. coli* con el plásmido pET32a-Tripsinógeno III
- Establecer las condiciones óptimas de temperatura y tiempo de inducción para la sobreexpresión de Tripsinógeno III
- Sobreexpresar al Tripsinógeno III de sardina en *E. coli*
- Evaluar la actividad de tripsina del extracto soluble de proteína sobreexpresada

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y Materiales

Todos los reactivos que se utilizaron fueron de grado analítico, biología molecular o bioquímico de acuerdo a las necesidades de los experimentos. De Sigma-Aldrich fueron obtenidos los siguientes reactivos: Benzoil-*D*-L-arginina- ρ -nitroanilida (BAPNA), tripsina bovina, Tosil-lisina-clorometil-cetona (TLCK), Isopropil-tiol galactosido (IPTG), agarosa y bromuro de etidio.

Los reactivos dodecilsulfato sódico (SDS), acrilamida, persulfato de amonio (APS), diamina de tetrametil etileno (TEMED) y azul de Coomassie G y R, fueron obtenidos de Bio-Rad. Se utilizó el medio de cultivo Luria-Bertani (LB), y los siguientes antibióticos: kanamicina, cloranfenicol, ampicilina y tetraciclina (SIGMA). Los geles para electroforesis de ácidos nucleicos fueron preparados con agarosa de Sigma Aldrich y teñidos con bromuro de etidio (SIGMA).

El gen que codifica para tripsina III se obtuvo del banco de genes de ADNc de ciegos pilóricos de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) (Anaya, 2008; Félix-López, 2006). En la **Figura 4** se observa la secuencia aminoacídica completa que codifica para tripsinógeno III, la forma precursora de la enzima tripsina III. Previo a este trabajo, en el Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos (LBMOA) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD, A. C), se preparó un plásmido recombinante conteniendo la región codificante de ADNc de la tripsina III de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*), en el vector de expresión pET32a (Novagen) (**Figura 5**).

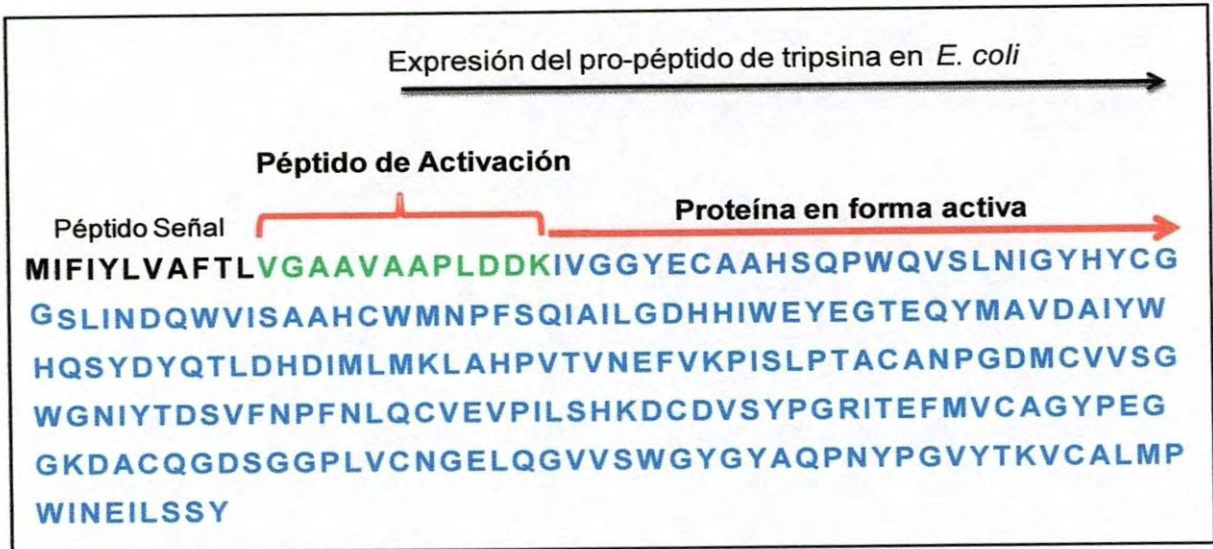


Figura 4. Secuencia de aminoácidos que codifican para tripsinógeno III, utilizada para la construcción del vector de expresión de *E. coli*. Secuencia de aminoácidos correspondientes al péptido señal (negro). Secuencia de aminoácidos correspondientes al pro-péptido (verde). Secuencia de aminoácidos correspondientes a la tripsina en su forma activa (azul).

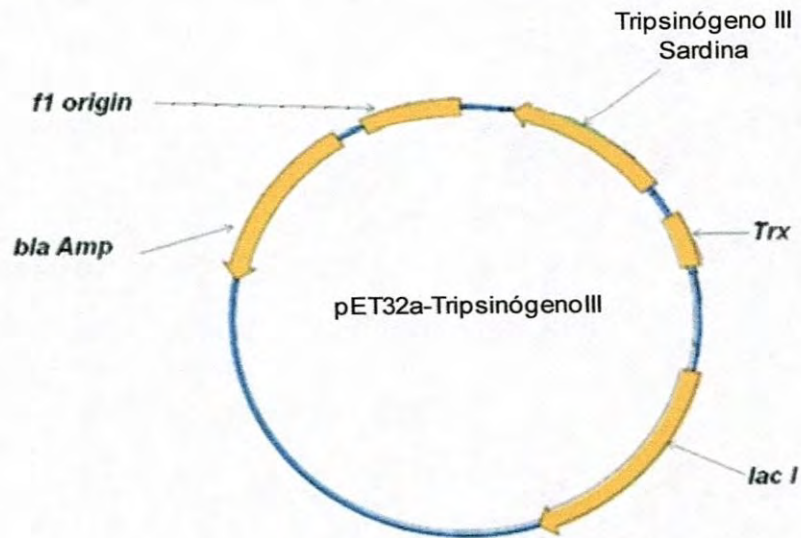


Figura 5. Construcción del vector de expresión pET32a-Tripsinógeno III de *E. coli*

Expresión Heteróloga de Tripsina III de Sardina Monterey

Elección de la cepa de sobreexpresión.

La elección de las células hospederas para la producción de proteínas recombinantes depende principalmente de las propiedades y el uso final de la proteína expresada. Buscando optimizar la sobreexpresión de la enzima, la elección de la cepa de *E. coli* se hizo en base a su genotipo, buscando afinidad con el vector de expresión, además de mantener las características deseadas en tripsina III. Las cepas probadas en esta investigación fueron: Rosetta (DE3)pLysS, Rosetta Blue (DE3)pLysS, Rosetta-gami (DE3)pLysS, C41 (DE3)pLysS, y C43 (DE3)pLysS.

Microorganismos y vectores de expresión.

El microorganismo utilizado para propagar los plásmidos de ADN fue *Escherichia coli*. La transformación de ADN en células químicamente competentes de *E. coli* se llevó a cabo utilizando procedimientos estándar (Sambrook *et al.*, 1989). Para la expresión de la proteína recombinante se utilizó el linaje de *E. coli*: Rosetta gami (DE3)pLysS, una cepa para expresión, lisógena del fago λ DE3, que incorpora el gen de la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV* y es inducible por Isopropil- β -D-tiogalacto-piranósido (IPTG).

Medios de cultivo.

Los cultivos líquidos para el crecimiento de bacterias se realizaron en el medio Luria-Bertani (LB): triptona 10 g, extracto de levadura 5 g y NaCl 10 g para un litro. Los cultivos líquidos se dejaron crecer a 37°C en un agitador a 250 rpm. Para crecer colonias en placa, se preparó un medio sólido de LB añadiendo 15 g de agar /L al medio de cultivo líquido. Para seleccionar las transformantes, se añadieron los antibióticos apropiados o requeridos por la cepa, en las concentraciones requeridas como lo indica el manual del sistema pET (Novagen). Estos dependiendo de la selección fueron: cloranfenicol (34 μ g/ml), kanamicina (50 μ g/ml), tetraciclina (12.5 μ g/ml) y ampicilina (100 μ g/ml).

Transformación en *Escherichia coli*.

En el presente trabajo, el plásmido recombinante HP-tioredoxina-tripsinógeno III, fue introducido a células competentes de *E. coli* usando protocolos estándar (Sambrook et al., 1989). Las células electrocompetentes se prepararon justo antes del proceso de transformación de la bacteria. Este método se basa en la obtención de células libres de iones, y para lograrlo, se inocularon células en caldo LB y se crecieron hasta alcanzar la fase logarítmica (densidad óptica entre 0.5 y 0.7), finalmente se lavaron varias veces con H₂O estéril (tipo MiliQ), (4-5 veces).

Continuando con el proceso de transformación, se agregó el ADN del plásmido pET32a-Tripsinógeno III (50 ng) a 50 µl de células competentes, y se mantuvo ésta mezcla en hielo durante 10 minutos. La mezcla se transfirió a una celda preenfriada, secando la celda por fuera y fue colocada dentro de la cámara para realizar el choque eléctrico (electroporador). La eficiencia de la transformación decrece con el incremento del volumen de ADN y la concentración de sal, la cual debe ser menor de 1 mM. Las condiciones para el choque eléctrico fueron de 1.8kV, 3 µF y control de pulsos a 200 ó 400 Ohms. Siguiendo con el proceso, se aplicó el pulso y se removió la celda para inmediatamente pasar la mezcla a microtubos, agregando 250 µl de medio SOC a temperatura ambiente y se incubó durante 1 hora, con agitación constante a 37°C.

Las células transformadas se sembraron en placas con agar Luria-Bertani (LB) conteniendo: 34 µg/mL de cloranfenicol y 50 µg/mL de kanamicina, estos antibióticos son los que requiere la cepa para su crecimiento, y además 100 µg/mL de ampicilina (LB_{amp}), que es el antibiótico requerido por el vector de expresión y sirve para seleccionar las colonias positivas. Las cantidades de inóculo fueron 50, 100 y 150 µL, y se incubaron a 37°C durante 12 horas. Aquellas colonias que crecieron en el medio con el antibiótico de selección, se consideraron posibles clonas positivas y se analizaron posteriormente para confirmar la presencia del vector que contiene al inserto en ellas (pET32a-Tripsinógeno III).

Detección de los clones recombinantes.

Las colonias que han sido transformadas pueden analizarse a partir de una reacción de PCR para verificar la presencia del inserto dentro del vector. En esta reacción se utilizó el ADN plasmídico como templado, de manera que una vez que las bacterias han sido transformadas con el plásmido de interés, se debe corroborar la presencia del mismo antes de continuar con el experimento, por lo que se extrajo el ADN plasmídico. El aislamiento del ADN plasmídico se logró de las transformantes positivas, mediante el método de lisis alcalina o minipreparación (Sambrook y Russell, 2001).

El análisis de las posibles positivas se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el ADN plasmídico como templado y los iniciadores universales T7 y T7 terminador. El volumen final de las reacciones fue de 20 μ l, cada una conteniendo 2 μ l de buffer 10X para PCR (Tris-HCl 100 mM, pH 8.3, KCl 500 mM), 1.2 μ l de $MgCl_2$ 50 mM, 1.6 μ l de mezcla de dNTPs 2.5 mM, 1 μ l de cada iniciador, 2 μ l de ADN (20 ng/ μ l) y 1.2 unidades de Taq ADN polimerasa (Invitrogen). El programa de amplificación fue: 94°C durante 1 minuto, seguido de 35 ciclos de amplificación [desnaturalización: 94°C durante 1 minuto, alineación: 50°C durante 1 minuto y extensión: 72°C durante 1 minuto] terminando con un tiempo extra de extensión de 5 minutos. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando un termociclador DNAEngine System Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad). Las reacciones de PCR se analizaron en gel de agarosa al 1%, utilizando 20 μ l de cada reacción y 1.5 μ l del marcador de peso molecular 1kb plus DNA (Invitrogen). La presencia de las bandas se observó por medio de tinción con bromuro de etidio, utilizando un transiluminador de luz UV, y se fotodocumentaron (Kodak dS Digital Imagen System – GEL LOGIC 100).

Sobreexpresión recombinante de tripsina III.

Las bacterias (*E. coli* Rosetta gami) transformadas con la construcción se crecieron en matraces Fernbach a 37°C con agitación constante (250 rpm) en medio de cultivo Luria-Bertani, adicionado con 0.5 % de glucosa, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 U a una longitud de onda de 600 nm. En este punto se realizó

la inducción con IPTG 0.4mM a 25°C, y se monitoreó el proceso cada hora, para su posterior análisis. Las células bacterianas se recuperaron por centrifugación a 5,000 x g por 5 minutos a 4°C y se lavaron con NaCl al 0.9%. Las células fueron resuspendidas en buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; NaCl 150 mM y PMSF 1 mM) a una proporción de 4 ml/g de biomasa celular.

Análisis de la sobreexpresión.

El método de lisis celular empleado fue congelación-descongelación, para romper las células completamente y obtener la mayor cantidad posible de proteína. El extracto obtenido se centrifugó a 10,000 x g por 1 hora a 4°C para obtener primeramente un sobrenadante (fracción soluble), con el precipitado se repitió el proceso de lisis agregando buffer de lisis y SDS al 1% obteniendo la fracción insoluble. El SDS es un detergente aniónico tensoactivo, que se utiliza para romper totalmente la membrana celular, y separar los complejos de proteínas en el precipitado. Esto aumenta notablemente la viscosidad de la solución. Ambas fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE para verificar la sobreexpresión.

Para verificar la sobreexpresión de la enzima, el extracto obtenido se analizó mediante electroforesis tanto de la fracción soluble como de la fracción insoluble, para determinar si se expresó de forma soluble o si se expresaron cuerpos de inclusión, que son unos agregados proteicos que se forman cuando las bacterias se enfrentan a un estrés celular, tal como el que se da cuando se ven forzadas a producir la proteína de interés en concentraciones elevadas.

Análisis por Electroforesis

La electroforesis es una técnica utilizada para la separación de moléculas (proteínas o ácidos nucleicos) en base a su tamaño molecular y carga eléctrica. Para la separación se usan diferentes soportes: un gel de agarosa cuando se requiere separar ADN, o uno de poliacrilamida cuando se trata de proteínas.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Para la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida, en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), se utilizó el sistema Mini-Protean III system (Bio-Rad), siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970). La composición del gel separador fue del 12% (p/v) de poliacrilamida en Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8; 0.1% SDS (p/v) y para el gel espaciador 4% (p/v) de poliacrilamida en Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8; 0.1% SDS (p/v). Las muestras se diluyeron en solución buffer de carga (Tris-HCl 60 mM, pH 6.8; 2% SDS (p/v); 2-mercaptoetanol 0.07% (v/v); glicerol 34.8% (p/v); azul de bromofenol 0.01%), y se hirvieron a 100°C durante 5 minutos. Como solución buffer de electroforesis se utilizó Tris 0.025 M; glicina 0.192 M; 0.1% SDS (p/v); pH 8.3, y se sometieron a voltaje constante de 15 mA por gel, durante 95 minutos. Se utilizó un marcador de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad). Los geles fueron teñidos con el colorante azul de Coomassie para revelar las bandas de proteína.

Tinción con azul de Coomassie.

El procedimiento de tinción consistió en sumergir el gel en una solución de azul de Coomassie G-250 al 0.5% durante 2 horas. Para preparar el colorante era conveniente filtrarlo una vez disuelto. Al cumplirse el tiempo se retiraba el tinte y se procedía a desteñir el gel, sumergiéndole en una solución de metanol al 50% y ácido acético al 10%. El gel una vez desteñado se colocó en una solución conservadora de metanol al 30% y glicerol al 5%. Los geles fueron fotografiados para registro de los resultados.

Actividad en gel (SDS-PAGE).

Para la elaboración de zimogramas, se utilizó caseína al 3% diluida en Tris – HCl 25 mM, pH 8.8 como sustrato (Garcia-Carreño *et al.*, 1993). Las muestras se diluyeron en buffer carga no reductor (Tris-HCl 125 mM, pH 6.8, 20% glicerol, 0.02% azul de bromofenol), y se analizaron por electroforesis (acrilamida al 12%, 15mA por 2 h a 4°C). Después de la electroforesis, los geles se incubaron en una solución de caseína al 3%, por 30 minutos a 4°C; posteriormente se incubaron en la solución de caseína, durante 90 minutos a temperatura ambiente. Al término de la incubación, se

lavaron con agua destilada y se tiñeron con azul de Coomassie R-250 durante 12 horas, y finalmente se destiñeron con solución desteñidora. Las bandas claras sobre el fondo azul indicaron actividad proteolítica.

Ensayos Enzimáticos

Los ensayos enzimáticos estuvieron dirigidos a determinar la actividad de extractos solubles de lisados celulares, frente a un sustrato específico de tripsina. Los ensayos se realizaron por triplicado, utilizando siempre blancos, que consistieron en añadir solamente el sustrato al buffer de la reacción (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 7.5). El volumen final de reacción fue de 1 ml.

Ensayo de actividad de tripsina.

La actividad de tripsina fue evaluada con el sustrato BAPNA 1mM, que posee un enlace amida en su cadena que es hidrolizado por la actividad amidasa de la tripsina. El producto de esta reacción es p-nitroanilina. Este método consistió en agregar 960 µl de BAPNA 1 mM a 40 µl de muestra en una celda de plástico, e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al término de los 30 minutos, se midió absorbancia a una longitud de onda de 410 nm, en el espectrofotómetro Cary 50. La actividad de tripsina del lisado celular, se expresó como el $\Delta\text{Abs}/\text{tiempo}$ (Erlanger *et al.*, 1961).

Inhibición de tripsina.

Se evaluó la susceptibilidad de la enzima al inhibidor específico TLCK con el fin de corroborar que la enzima presente en el extracto proveniente del lisado celular, era tripsina. Para esta determinación se utilizó el protocolo de García-Carreño (García-Carreño, 1996), modificada por Castillo-Yáñez (Castillo-Yáñez *et al.*, 2005). Se utilizó el inhibidor específico de tripsina TLCK, 10 mM. Se mezclaron el inhibidor (4.5µL) y el extracto enzimático (40µL), y fueron incubados a 25°C durante 60

minutos, después se midió actividad residual con el sustrato BAPNA, mediante el método descrito anteriormente.

Determinación de proteína.

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando como proteína estándar, albúmina de suero bovino (1 mg/mL).

Análisis de datos.

El diseño del presente trabajo tuvo como finalidad reducir la variación de las réplicas. Los valores de actividad e inhibición reportados están en base a 3 determinaciones. La variación entre las réplicas fue menor al 5%. Se aplicó un análisis descriptivo para analizar los datos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Expresión Heteróloga de Tripsina III de Sardina Monterey

Transformación en *E. coli*.

La construcción pET32a-Tripsinógeno III fue insertada en diferentes cepas de *E. coli*, disponibles en el laboratorio, para la expresión de la proteína de interés. Los clones recombinantes de cada cepa transformada se observan en la **Figura 6**, los cuales resultaron del tamaño esperado de 1400 pb. Este tamaño corresponde al producto de amplificación de toda la región insertada en el sitio de clonación del vector de expresión, que contiene al tripsinógeno III de sardina y una secuencia nucleotídica que codifica tioredoxina, incluida para favorecer la solubilidad de la proteína a sobreexpresar.

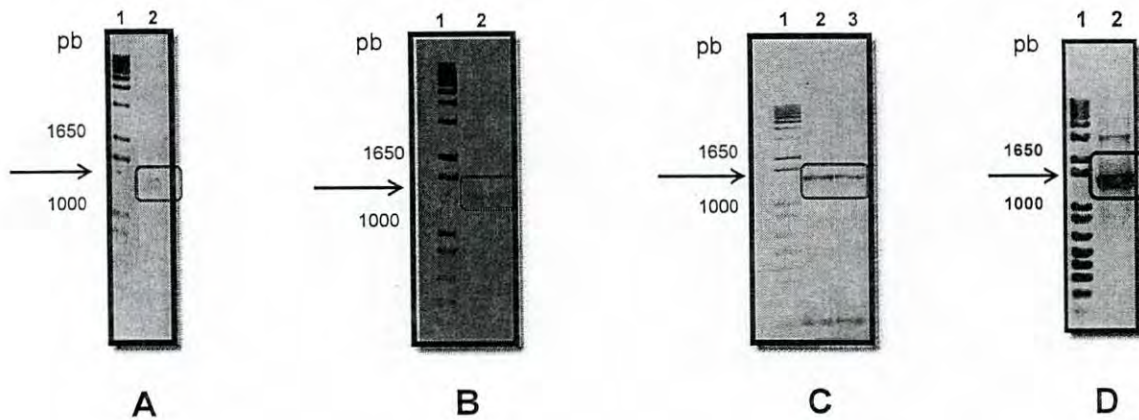


Figura 6. Detección de clones recombinantes. Análisis realizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. En los 4 geles, la línea 1 presenta al marcador de peso molecular (1kb plus DNA Ladder). Panel A y B: clones recombinantes de las cepas Rosetta y Rosetta blue, respectivamente. Panel C: clones de la cepa C41 y C43, respectivamente. Panel D: clon recombinante de la cepa Rosetta gami.

Sobreexpresión de tripsina III.

La sobreexpresión del tripsinógeno III, precursor de la tripsina que fue fusionada con tioredoxina se probó a temperaturas bajas, optando por inducir a 16°C, con IPTG (no se muestran resultados). El resultado fue un retraso en el crecimiento celular, y con ello una disminución en la síntesis de la proteína.

Condiciones de cultivo de las cepas de sobreexpresión.

Las cepas transformadas [Rosetta (DE3)pLysS, Rosetta Blue (DE3)pLysS, C41 (DE3)pLysS, y C43 (DE3)pLysS] se cultivaron a diferentes temperaturas (16, 25 y 37°C) para elegir la más adecuada en base a la generación de biomasa, y la expresión de la proteína después de la inducción con IPTG. La temperatura de crecimiento celular para todas las cepas fue de 37°C hasta antes de la inducción.

Las condiciones que difieren entre las cepas elegidas fueron las siguientes:

Rosetta (DE3)pLysS. Cultivada en medio LB, las temperaturas de inducción fueron 37°C, 25°C y 16°C (con buffer de fosfato de potasio). La densidad celular para inducir fue de 0.6 Unidades a 600 nm.

Rosetta-blue (DE3)pLysS. Cultivada en medio LB, las temperaturas de inducción fueron 37°C y 25°C.

C41 (DE3)pLysS. Cultivada en medio YT. Las transformantes perdieron el plásmido al cabo de un mes, por lo que no creció el preinóculo para sobreexpresión.

C43 (DE3)pLysS. Cultivada en medio YT, las temperaturas de inducción fueron: temperatura ambiente y 16°C. La densidad celular fue de 0.9 y 0.8 Unidades respectivamente al momento de inducir.

Rosetta-gami (DE3)pLysS. Cultivada en medio LB y las temperaturas de inducción fueron: 37°C y 25°C. Se probó inducir la sobreexpresión de la proteína a una densidad celular mayor (1.6 U) para aumentar la biomasa y conseguir una mayor cantidad de proteína sobreexpresada.

Para lograr una buena sobreexpresión es importante determinar parámetros de cultivo como la temperatura, y el tiempo de inducción para generar la mayor cantidad de biomasa celular, y al mismo tiempo la mayor síntesis de proteína. En cuanto a las condiciones de cultivo, los factores que han sido optimizados con mayor

frecuencia son la temperatura de crecimiento y temperatura de inducción; y la concentración de inductor (Gordon *et al.*, 2008; Lee y Keasling, 2008; Martínez-Luaces *et al.*, 2006; Pinsach *et al.*, 2008; Salazar *et al.*, 2001). La composición del medio de cultivo también es un factor de gran interés, ya que los componentes del medio pueden afectar la producción basal de proteína recombinante, generar alta producción bajo condiciones no-inducidas o provocar liberación de la proteína al medio extracelular (Grossman *et al.*, 1998; Jevšėvar *et al.*, 2007; Salazar *et al.*, 2001).

Al analizar las fracciones sobreexpresadas en cada una de las cuatro cepas elegidas, los patrones electroforéticos mostrados fueron muy similares al presentado en la **Figura 7**. Sin embargo, estos experimentos revelaron bandas poco abundantes, lo que indica una expresión baja con éstos hospederos, incluso después de experimentar con diferentes condiciones de crecimiento e inducción (temperaturas y tiempos).

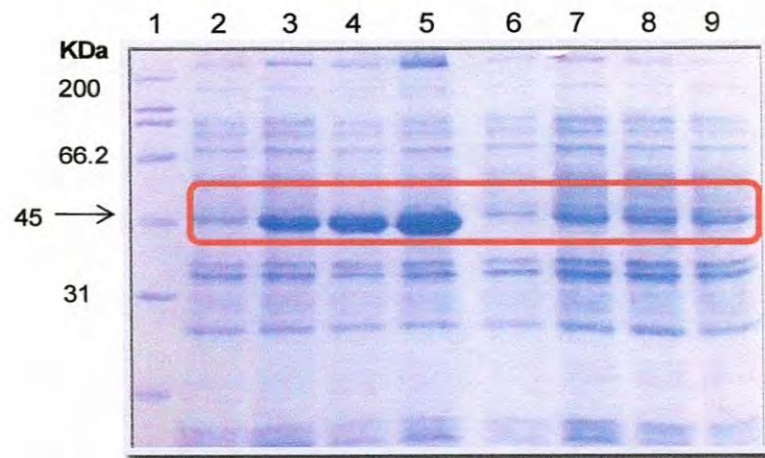


Figura 7. Inducción de la expresión de tripsinógeno III. Gel SDS-PAGE al 12 %, teñido con azul de Coomassie. Carril 1: marcador de peso molecular de amplio rango Bio-Rad. Carriles 2-5: muestras inducidas 0, 1, 2 y 3 h, respectivamente. Carriles 6-9: muestras sin inducir a las 0, 1, 2 y 3 h. Las bandas de la proteína de interés están enmarcadas en rojo.

Condiciones de cultivo.

Las condiciones de cultivo tienen fuerte incidencia en el sistema de expresión, mismas que optimizan la expresión de la proteína recombinante, puesto que distintos hospederos y vectores de expresión presentan distintos niveles de producción de una misma proteína recombinante bajo condiciones de cultivo idénticas (Martínez-Luaces *et al.*, 2006). En numerosos estudios, la temperatura de crecimiento del cultivo y la de inducción de la proteína de interés son los factores de mayor significancia estadística en la producción de proteínas recombinantes. Esto se debe a que la temperatura es un factor importante en los procesos metabólicos, afectando la velocidad de transcripción y de traducción de proteínas (Martínez-Luaces *et al.*, 2006; Salazar *et al.*, 2001).

La temperatura óptima de crecimiento de *E. coli* es 37°C, la cual coincide con la temperatura de máxima actividad de la T7 RNA polimerasa, pero no es necesariamente la temperatura óptima de producción de proteínas heterólogas (Donovan *et al.*, 1996). El uso de temperaturas inferiores a la del crecimiento óptimo, en algunos casos puede reducir respuestas metabólicas indeseables para la síntesis de otras proteínas y como consecuencia, mejorar el rendimiento y/o la solubilidad de la proteína de interés (Donovan *et al.*, 1996). Una manera de lograr lo descrito anteriormente es reducir la tasa de traducción de la proteína, induciendo las células a temperaturas bajas (Schein y Noteborn, 1988). Un ejemplo de lo anterior es la sobreexpresión de lipasa de la levadura *Candida antarctica* en *E. coli* Rosetta gami 2(DE3), donde obtuvieron mejores resultados al crecer la cepa a 37°C e inducir a 16°C (Larsen *et al.*, 2008).

Respecto al crecimiento celular se recomienda alcanzar altas densidades celulares para inducir una alta velocidad de ese crecimiento, pero sin llegar a la etapa estacionaria, puesto que en esta etapa existen condiciones desfavorables, tales como: agotamiento de nutrientes, reducción drástica de la actividad metabólica y utilización de proteínas celulares no esenciales como fuente de carbono, actividad proteasa aumentada. En cambio, la inducción a una alta velocidad específica de crecimiento ofrece condiciones metabólicas más favorables como el alto contenido

de ribosomas, mayor disponibilidad de nutrientes y menor concentración de subproductos tóxicos. Además, al no encontrarse en una etapa de limitación de nutrientes se puede reducir la respuesta de estrés antes y después de la inducción (Babaiepour *et al.*, 2007).

Se han desarrollado estudios que revelan una estrecha relación entre la densidad celular en el punto de inducción y la concentración de inductor en el medio de cultivo, por lo cual el análisis de este factor no debe ser aislado de otros factores que intervienen en la producción de proteínas recombinantes (Lee y Keasling, 2008). La razón por la que la densidad celular en el punto de inducción y la concentración de inductor poseen una interacción, está relacionada a la concentración de IPTG por célula en el punto de inducción, es decir, si la densidad celular en el punto de inducción es alta, pocas células serán inducidas generando un cultivo heterogéneo de células productoras y no productoras. En cambio si la densidad celular en el punto de inducción es baja, las células serán efectivamente inducidas, pero a su vez se generará un gran estrés metabólico, menguando la densidad celular final alcanzada por el cultivo (Shitu y Woodley, 2009).

Expresión en Rosetta gami (DE3)pLysS.

Al comparar los resultados de sobreexpresión entre cepas, cuando se utilizó la cepa de *E. coli* Rosetta-gami (DE3)pLysS, se observó que aparentemente se podían obtener bandas más abundantes, indicadoras de una alta expresión. Por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida, se observó una banda intensa correspondiente al producto de sobreexpresión (His-Tripsina III-Trx) de 45 KDa, después de inducir a Rosetta-gami (DE3)pLysS con IPTG 0.4 mM.

El sistema de expresión heteróloga en *E. coli* probado en este trabajo, dio como resultado la expresión de la proteína esperada tras la inducción con IPTG. La temperatura más adecuada para la inducción de la expresión de tripsina III fusionada con tioredoxina fue de 25°C, en un tiempo de 3 horas. En otros estudios, se ha visto que 25°C es la temperatura óptima para expresión de proteínas de fusión, así lo reportan para la expresión de tripsina I y III de bacalao del atlántico (Jonsdottir *et al.*, 2004; Pálsdóttir y Gudmundsdóttir, 2007). El rendimiento final fue de 10 g de biomasa

por litro de cultivo en peso húmedo, valor comparable con los obtenidos en la sobreexpresión de tripsinas de bacalao adaptadas al frío, que fueron de 10 y 9 g/L respectivamente (Palsdóttir y Gudmundsdóttir, 2004; Palsdóttir y Gudmundsdóttir, 2006). Una característica importante que posee la cepa *Rosetta gami* es la capacidad de formar enlaces disulfuro, que es muy importante en el caso de la conformación estructural de tripsina III en cuanto a estabilidad se refiere.

La separación de las distintas fracciones de la célula, permitió detectar la presencia de tripsina III recombinante mediante SDS-PAGE mostrado en la **Figura 8**, y se corroboró que efectivamente se trataba de ésta tripsina mediante ensayos de actividad con el sustrato específico BAPNA, y actividad en gel usando caseína como sustrato.

El perfil electroforético presentado en la **Figura 8**, demostró que la cantidad de His-tripsina III-trx recombinante, fue incrementando durante el período de inducción de 3 horas, en la fracción insoluble (carriles 3, 5, 7 y 9), y en la fracción soluble no se observó la sobreexpresión hasta las 3 horas de inducción (carril 8). El mecanismo de inducción es clave en los trabajos de sobreexpresión, esto es debido a que las diferencias en la eficiencia de la secreción de enzimas dependen del tiempo de inducción, del tipo de péptido señal y de la masa molecular de las enzimas (Simpsons y Yansura, 1996).

Debido a las características de la construcción en el vector de expresión se esperaba que se favoreciera la sobreexpresión de la proteína en forma soluble, sin embargo no fue así. Si bien se expresó enzima de forma soluble, sin embargo fue muy escasa como puede observarse en la **Figura 8**, carril 8. Por otro lado, se pudo observar que la enzima se sobreexpresó de manera más abundante de forma insoluble desde la primera hora de inducción formando agregados llamados cuerpos de inclusión. Estos agregados insolubles son partículas densas formadas por una alta producción de proteína en el citoplasma, y su formación puede ser determinada por la interacción entre los sistemas moleculares de las células y el manejo de la termodinámica que causa la asociación parcial de los polipéptidos (Middelberg, 2002).

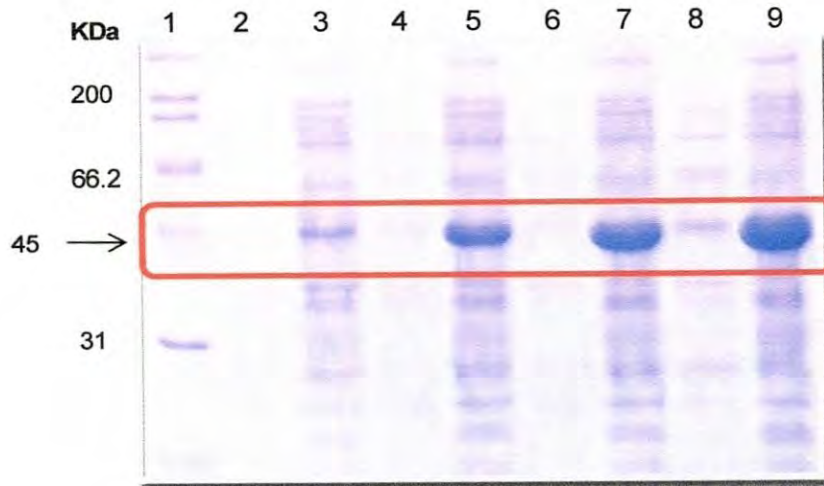


Figura 8. Sobreexpresión de tripsinógeno III-tioredoxina (trx) en la cepa Rosetta-gami (DE3) pLysS. Gel SDS-PAGE al 12% de las fracciones soluble e insoluble de células inducidas con IPTG. Carril 1: marcador de peso molecular de amplio rango Bio-Rad. Carriles 2, 4, 6 y 8: fracción soluble correspondientes a 0, 1, 2 y 3 h post-inducción, respectivamente. Carriles 3, 5, 7 y 9: fracción insoluble a 0, 1, 2 y 3 h post-inducción, respectivamente.

Expresión de tripsina III en cuerpos de inclusión.

Para la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli*, es importante saber que las enzimas adaptadas al frío son propensas a la agregación durante su expresión (Feller *et al.*, 2000), sumado a esto se ha demostrado que la formación de cuerpos de inclusión puede adjudicarse a la tasa de traducción de proteínas, la cual excede la capacidad de la célula para plegar la proteína sintetizada nuevamente (Kiefhaber *et al.*, 1991). Como consecuencia, las proteínas que se van produciendo se van acumulando en el citoplasma bacteriano. En este último caso, se debe proceder al replegamiento químico *in vitro* para restablecer la enzima a su conformación nativa, basados en métodos ya utilizados en la expresión de lisozimas de invertebrados (García-Orozco *et al.*, 2005).

Se sugiere que algo similar a lo descrito anteriormente es lo que pudo haber experimentado la tripsina III durante la sobreexpresión, donde la velocidad de

síntesis de la proteína rebasó la capacidad de plegamiento de la misma. En la **Figura 8**, carril 9 se observa que la mayoría del producto de sobreexpresión se presentó principalmente de manera insoluble, lo que indicó la expresión de la proteína en cuerpos de inclusión. Sin embargo, éste resultado sugiere que comparando ambas fracciones (soluble e insoluble), la expresión fue eficiente y se obtuvo gran cantidad de tripsina III recombinante, ya que se tiene el conocimiento de que la formación de cuerpos de inclusión supone uno de los problemas más comunes que se pueden presentar (Sorensen y Mortensen, 2005), pero a su vez, indica que la proteína heteróloga se produce en gran cantidad.

La formación de cuerpos de inclusión, también se ha presentado en la sobreexpresión de tripsinógeno de anchoa en *E. coli*, y después de una optimización del sistema de expresión y del proceso de replegamiento, Ahsan y colaboradores (2005) obtuvieron un rendimiento final de 12 mg de tripsina pura/litro de cultivo bacteriano, que es una cantidad suficiente para el análisis de la enzima (Ahsan *et al.*, 2005).

Otro caso similar es el que se ha reportado en la sobreexpresión de pepsinógeno en *E. coli*, que fue fusionado con tioredoxina donde también presumían se expresara en su forma soluble, sin embargo lo hizo en cuerpos de inclusión. A pesar de esto, la tioredoxina cumplió su función al momento de purificar el pepsinógeno, facilitando su obtención de forma soluble y biológicamente activa, por lo tanto concluyeron que la fusión con tioredoxina sirvió para facilitar la solubilidad de la enzima después del replegamiento (Sachdev y Chirgwin, 1998). Con esta premisa, se puede anticipar que puede pasar lo mismo con la tripsina III cuando se proceda con el proceso de purificación.

Ensayos Enzimáticos

Ensayo de actividad con BAPNA.

La fracción soluble proveniente de un lisado celular, presentó actividad de tripsina utilizando el sustrato BAPNA. El curso de la reacción se observó registrando la aparición de p-nitroanilina, producto de la hidrólisis del sustrato BAPNA, y los resultados se reportan en $\Delta\text{Abs}_{(410\text{nm})}/\text{tiempo de reacción}$. Los valores de la **Tabla 3** indican que solo una fracción del total de la enzima producida se localizó en la fracción soluble lo que se consideró como tripsina III plegada correctamente, es decir es biológicamente activa. La activación de la proteína de fusión es uno de los procesos más problemáticos, pero más importantes también, así que para mejorar los rendimientos de la enzima activa, éste paso se requieren más estudios con respecto a la estabilidad de la enzima recombinante activa generada, además de otros factores que puedan afectarle.

Tabla 3. Ensayo de actividad con BAPNA.

Muestra	$\Delta\text{Abs}_{(410\text{nm})}/\text{Tiempo de reacción}$
*Control	0.0002
Tripsina III (30 min)	0.1067
Tripsina III (60 min)	0.3973
Tripsina III (O/N)	1.1499

*Corresponde al sustrato sin enzima. Los datos son promedio de tres repeticiones. El coeficiente de variación fue menor al 5%.

La única tripsina tipo III sobreexpresada a la fecha es la de bacalao (Pálsdóttir y Gudmundsdóttir, 2007). El dato de actividad específica de la tripsina III de sardina de la presente investigación, no es comparable con la del bacalao porque la de la sardina no se ha purificado.

Actividad en gel (SDS-PAGE).

El ensayo de actividad en gel utilizando caseína como sustrato fue de gran utilidad como una evidencia adicional de actividad de tripsina III en la fracción soluble. En la **Figura 9**, los carriles 3-9, mostraron una banda con actividad proteolítica con un peso molecular de aproximadamente 31 KDa (correspondientes al peso molecular esperado) en SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, sugiriendo que la fracción soluble de tripsina III sobreexpresada es biológicamente activa. Las formas recombinantes de enzimas proteolíticas de peces adaptados al frío, presentan dificultades para producirse en su forma activa en sistemas de expresión mesofílicos.

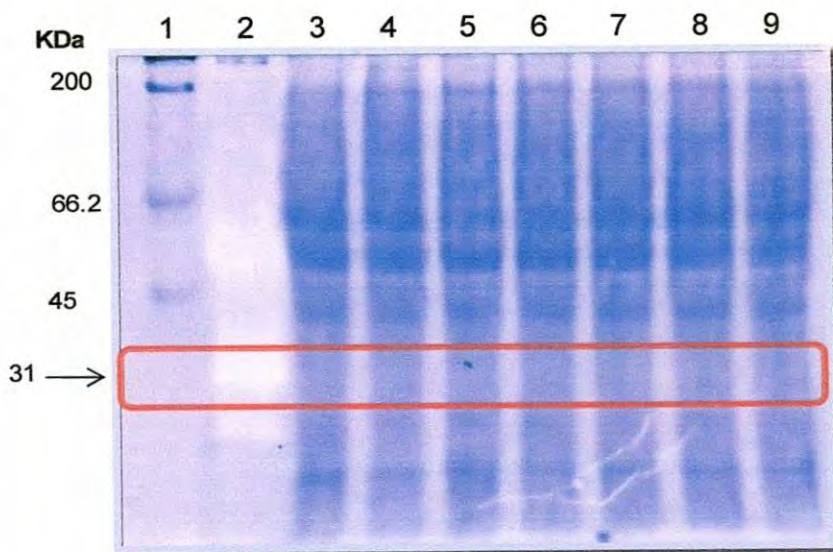


Figura 9. Zimograma de actividad de tripsina III recombinante de sardina Monterey utilizando caseína como sustrato. Gel SDS-PAGE al 12%. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: tripsina I de sardina. Carriles 3-9: fracción soluble del lisado celular inducido con IPTG e incubada a diferentes tiempos (0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos).

Por otro lado, debido a que el análisis fue realizado a temperatura ambiente, se puede decir que hipotéticamente la enzima se auto-activa a ésta temperatura. Se ha visto que la principal razón de que ocurra esto puede ser la alta sensibilidad

térmica y susceptibilidad a la autólisis de las enzimas adaptadas al frío (Helgadóttir, 2002), lo cual apoya la autoactivación del tripsinógeno III de sardina. Sin embargo, la banda activa presentada es apenas notoria, por la escasez de tripsina III en el lisado celular correspondiente a la fracción soluble, por tal motivo se recomienda en futuros estudios una mayor purificación de la enzima para evitar interferencias por otras proteínas.

Inhibición de tripsina con TLCK.

En la fracción soluble del lisado celular se observó inhibición de la actividad de tripsina por TLCK inhibiéndole en un 40.6% (**Tabla 4**). Esta inhibición corrobora los resultados de actividad porque los mecanismos de acción de los inhibidores de proteasas peptídicas están exclusivamente relacionados a la especificidad del sustrato. El inhibidor TLCK actúa mediante la alquilación del residuo de histidina del centro activo de la tripsina, ésta alquilación es provocada por la cetona del propio inhibidor (Shaw *et al.*, 1965). El TLCK inhibe de forma similar a las isoformas de tripsina, ya que actúa sobre uno de los aminoácidos que componen la triada catalítica, que están conservados en todos los tipos de tripsinas. Por lo tanto, era de esperarse que este inhibidor interfiriera con la actividad del extracto obtenido, inhibiendo parcialmente la actividad proteolítica y al mismo tiempo, esto comprueba que la proteína sobreexpresada es una isoforma de tripsina.

Tabla 4. Ensayo de inhibición de la fracción soluble sobreexpresada a los 30 minutos de incubación con el inhibidor.

Agente Inhibidor	Actividad residual (%)	Inhibición (%)
Control	100.0	0
TLCK (10mM)	59.4	40.6

CONCLUSIÓN

Los resultados confirman que la sobreexpresión de tripsina III en la cepa de *E. coli* Rosetta gami (DE3) pLysS es un método viable para obtener ésta enzima en la cantidad necesaria para estudiarla. Sin embargo, debido a que la proteína se encontró principalmente en forma de cuerpos de inclusión, los estudios sobre plegamiento de la misma serán de gran importancia para aumentar el rendimiento final que se obtiene de enzima activa. Una vez que se logre tener una mayor cantidad de enzima activa será sumamente interesante llevar a cabo estudios de caracterización completa de la Tripsina III de sardina Monterey.

Los ensayos realizados hasta el presente proveen una base sólida y prometedora para la continuación del replegamiento de la tripsina III luego de ser obtenida a partir del tripsinógeno III.

RECOMENDACIONES

Se recomienda recuperar la proteína de los cuerpos de inclusión formados, procediendo con el proceso de plegamiento, devolviendo la conformación estructural activa de la enzima, como sugerencia del proceso en la **Figura 10** se muestra un diagrama general de recuperación de proteínas. Una vez obtenida la proteína, será importante continuar con los ensayos de caracterización pertinentes para descubrir las cualidades únicas de la tripsina III que, en base a características estructurales deducidas en trabajos anteriores (Anaya, 2008; Félix-López, 2006) se presume sea adaptada al frío. Por lo tanto, será importante también comprobar esta adaptabilidad al frío mediante un análisis de Arrhenius.

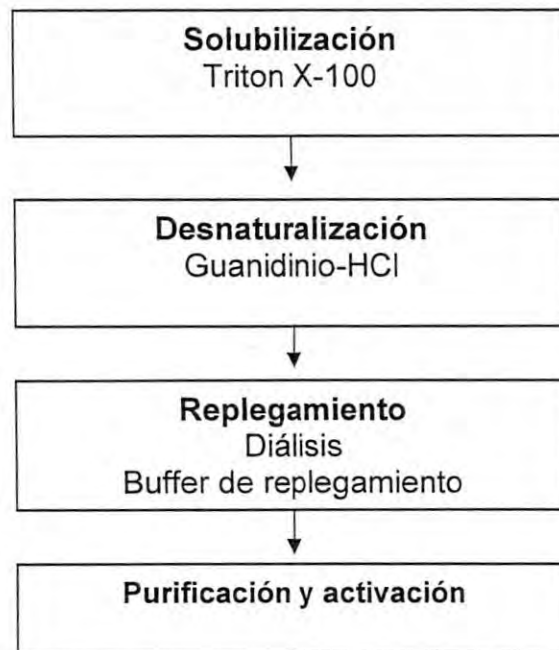


Figura 10. Diagrama general para la recuperación de tripsina III de los cuerpos de inclusión.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahsan, N., Aoki, H. y Watabe, S.** (2005). Overexpression in *Escherichia coli* and functional reconstitution of anchovy trypsinogen from the bacterial inclusion body. *Molecular Biotechnology*. 30:193-205 p.
- Anaya, B. C.** 2008. *Obtención del ADNc del tripsinógeno tipo III de vísceras de sardina monterey (Sardinops sagax caerulea)*. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora.
- Babaiepour, V., Shojaosadati, S. A., Robatjazi, S. M., Khalilzadeh, R. y Maghsoudi, N.** (2007). Over-production of human interferon γ by HCDC of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*. 42:112-117 p.
- Barret, A. J., Rawlings, N. D. y Woessner, J. F.** (1998). *Handbook of proteolytic enzymes*. Academic Press.
- Belghith, H., Chaabouni, S. E. y Gargouri, A.** (2001). Stabilization of penicillium occitanis cellulases by spray drying in presence of maltodextrin. *Enzyme and Microbial Technology*. 28:253- 258 p.
- Bjarnason, J. B., Asgeirsson, B. y Fox, J. W.** (1993). Psychrophilic proteinases from atlantic cod. *Acs Symposium Series*. 516: 69-82 p.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing he principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254 p.
- Briand, L., Chobert, J. M., Tauzin, J., Declerck, N., Leonil, J., Mollé, D., Tran, V. y Haertle, T.** (1997). Regulation of trypsin activity by Cu^{2+} chelation of the substrate binding site. *Protein Engng*. 10:551- 560 p.
- Brinen, L. S., Willet, W. S., Craik, C. S. y Fletterick, R. J.** (1996). X-ray structures of a designed binding site in trypsin show metal- dependent geometry. *Biochemistry*. 35:5999- 6009 p.
- Cabrera, C. F., Ezquerra, B. J. M., Herrera, U. R., Rosell, C. M. y Rouzaud, S. O.** (2010). Physicochemical properties of wheat gluten proteins modified by protease from sierra (*Scomberomorus sierra*) fish. *International Journal of Food Properties*. 13:1187-1198 p.
- Castillo-Yáñez, F. J., Pacheco-Aguilar, R., García-Carreño, F. L. y Navarrete-Del-Toro, M. A.** (2005). Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 140:91-98 p.

Cereghino, J. L. y Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Fems Microbiology Reviews*. 24:45-66 p.

Copeland, R. A. (2000). *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism and data analysis*. Wiley-VCH, Inc. 397 p.

Demain, A. L. (2000). Microbial technology. *Trends Biotechnol.* 18:26- 31 p.

Donovan, R. S., Robinson C. W. y Glick, B. R. (1996). Optimizing inducer and cultura conditions for expression of foreing proteins under control of *lac* promoter. *Journal of Industrial Microbiology*. 16:145-154 p.

Douglas, S. E. y Gallant, J. W. (1998). Isolation of cDNAs for trypsinogen from the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *J. Mar Biotechnol.* 6:214-219 p.

Erlanger, B. F., Kokowski, N. y Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys* 95:271-278 p.

Félix-López, M. (2006). *Caracterización biofísica y molecular de tripsina de sardina monterey (Sardinops sagax caerulea)*. Experimental. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Hermosillo, Sonora.

Feller, G., Arpigny, J. L., Narinx, E. y Gerday, C. (1997). Molecular adaptations of enzymes from psychrophilic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology*. 118:495-499 p.

Feller, G., Le Bussy, O. y Gerday, C. (2000). Expression of psychrophilic genes in mesophilic hosts: Assesment of the folding state of a recombinant alpha-amylase. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:1163-1165 p.

García-Carreño, F. L. (1996). Proteinase inhibitors. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 197-203 p.

Garcia-Carreño, F. L., Dimes, N. y Haard, N. (1993). Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214:65-69 p.

Garcia-Orozco, K. D., Lopez-Zavala, A. A., Puentes-Camacho, D., Calderon-De-La-Barca, A. M. y Sotelo-Mundo, R. R. (2005). Recombinant bacterial expression of the lysozyme from the tobacco-hornworm *Manduca sexta* with activity at low temperatures. *Biotechnology Letters*. 27:1075-1080 p.

Gasparian, M. E., Ostapchenko, V. G., Schulga, A. A., Dolgikh, D. A. y Kirpichnikov, M. P. (2003). Expression, purification, and characterization of human enteropeptidase catalytic subunit in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 31:133-139 p.

Georlette, D., Blaise, V., Collins, T., D'amico, S., Gratia, E., Hoyoux, A., Marx, J. C., Sonan, G., Feller, G. y Gerday, C. (2004). Some like it cold: Biocatalysis at low temperatures. *Fems Microbiology Reviews*. 28:25-42 p.

Gordon, E., Horsefield, R., Swars, H., De Pont, J., Neutze, R. y Snijder, A. (2008). Effective high-throughput overproduction of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 62:1-8 p.

Gorfe, A. A., Brandsdal, B. O., Leiros, H. K., Helland, S. R. y Smalas, A. O. (2000). Electrostatics of mesophilic and psychophilic trypsin isoenzymes: Qualitative evaluation of electrostatic differences at the substrate binding site. *Proteins-Structure Function and Genetics*. 40:207-217 p.

Grossman, T., Kawasaki, E. S., Punreddy, S. R. y Osburne, M. S. (1998). Spontaneous camp-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene*. 209:95-103 p.

Gudmundsdóttir, A. y Páldsdóttir, H. M. (2005). Atlantic cod trypsins: from basic research to practical applications. *Marine Biotechnology*. 7:77-88 p.

Haard, N. F. y Simpson, B. K. (2000). *Seafood enzymes*. Marcel Dekker A. G.

Hadj, A. N. E., Hmidet, N., Bougatef, A., Nasri, R. y Nasri, M. (2009). Laundry detergent-stable alkaline trypsin from striped seabream (*Lithognathus mormyrus*) viscera: purification and characterization. *J. Agric. Food Chem.* 57 (22):10943-10950 p.

Hanning, G. y Makrides, S. C. (1998). Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Tibtech*. 16:54-60 p.

Hansen, E. H., Albertsen, L., Johansen, C., Schaefer, T., Frisvad, J. C., Molin, S. y Gram, L. (2003). *Curvularia* haloperoxidase: Antimicrobial activity and potential application as a surface disinfectant. *Applied and Environmental Microbiology* 69:4611-4617 p.

Helgadóttir, L. (2002). *Trypsin I from atlantic cod: Purification, specificity, stability and autolysis*. Experimental. Reykjavík, Iceland.

Hohenblum, H., Vorauer-Uhl, K., Katinger, H. y Mattanovich, D. (2004). Bacterial expression and refolding of human trypsinogen. *Journal of Biotechnology*. 109:3-11 p.

Hosseinkhani, S. y Nemat-Gorgani, M. (2003). Partial unfolding of carbonic anhydrase provides a method for its immobilization on hydrophobic adsorbents and protects it against irreversible thermoinactivation. *Enzyme and Microbial Technology*. 33:179- 184 p.

Jevšvar, S., Palcic, J., Jalen, S. y Pavko, A. (2007). Influence of the media composition on behavior of pet expression system. *Acta Chimica Slovenica*. 54:360-365 p.

Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P. A., Stahl, S. (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 35:91-105 p.

Jonsdottir, G., Bjarnason, J. B. y Gudmundsdóttir, A. (2004). Recombinant cold-adapted trypsin I from atlantic cod-expression, purification, and identification. *Protein Expression and Purification*. 33:110-122 p.

Khantaphant, S. y Benjakul, S. (2008). Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology*. Part B 151:410-419 p.

Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H. H. y Buchner, J. (1991). Protein aggregation *in vitro* and *in vivo* - a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Bio-Technology*. 9:825-829 p.

Kim, H. R., Meyers, S. P. y Pyeun, J. H. (1994). Enzymatic-properties of anionic trypsins from the hepatopancreas of crayfish, *Procambarus-clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*. 107:197-203 p.

Kirk, O., Borchert, T. y Fuglsang, C. (2002). Industrial enzymes applications. *Current Opinion in Biotech.* 13:345-351 p.

Kiser, J. Z., Post, M., Wang, B. L. y Miyagi, M. (2009). *Streptomyces erythraeus* trypsin for proteomics applications. *Journal of Proteome Research*. 8:1810-1817 p.

Kishimura, H., Klomklao, S., Benjakul, S. y Chun, B. S. (2008). Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). *Food Chemistry*. 106:194-199 p.

Klomklao, S., Benjakul, S. y Visessanguan, W. (2004). Comparative studies on proteolytic activity of spleen extracts from three tuna species commonly used in thailand. *Food Biochemistry*. 28:355-372 p.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685 p.

Larsen, M.W., Bornscheuer, U.T., Hult, K. (2008). Expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* and various *Escherichia coli* systems. *Protein Expression Purification*. 62:90-97 p.

- Lavallie, E. R., Diblasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F. y McCoy, J. M.** (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Bio/Technology*. 11:187-193 p.
- Lee, S. K. y Keasling, J. D.** (2008). Heterologous protein production in *Escherichia coli* using the propionate inducible pro system by conventional and auto-induction methods. *Protein Expression and Purification*. 61:197-203 p.
- Leiros, H. K. S., Willassen, N. P. y Smalas, A. O.** (2000). Structural comparison of psychrophilic and mesophilic trypsins - elucidating the molecular basis of cold-adaptation. *European Journal of Biochemistry*. 267:1039-1049 p.
- Liu, Z. Y., Wang, Z., Xu, S. Y. y Xu, L. N.** (2008). Partial characterization and activity distribution of proteases along the intestine of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (val.). *Aquaculture Nutrition*. 14:31-39 p.
- Lu, B.-J., Zhou, L.-G., Cai, Q.-F., Hara, K., Maeda, A., Su, W.-J. y Cao, M.-J.** (2008). Purification and characterisation of trypsins from the pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Food Chemistry*. 110:352-360 p.
- Macouzet, M., Simpson, B. K. y Lee, B. H.** (2005). Expression of a cold-adapted fish trypsin in *Pichia pastoris*. *Fems Yeast Research*. 5:851-857 p.
- Male, R., Lorens, J. B., Smalas, A. O. y Torrissen, K. R.** (1995). Molecular cloning and characterization of anionic and cationic variants of trypsin from atlantic salmon. *European Journal of Biochemistry*. 232:677-685 p.
- Martínez-Luaces, V., Guíneo-Cobs, G. y Velásquez, B.** (2006). Bifactorial design applied to recombinat protein expression. *Journal of Data Science*. 4:247-255 p.
- Middelberg, A.** (2002). Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol*. 20:437-443 p.
- Morato, A. F., Carreira, R. L., Junqueira, R. G. y Silvestre, M. P. C.** (2000). Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: Use of subtilisin and trypsin. *Journal of Food Composition and Analysis*. 13:843-857 p.
- Neurath, H.** (1984). Evolution of proteolytic enzymes. *Science*. 224:350-356 p.
- Novagen.** (2006). *pET system manual*. 11 th Ed. Novagen, Inc. 601 Science Drive Madison, WI. 80 p.
- OEIDRUS-SAGARPA.** (2006). *Oficina estatal de información para el desarrollo rural sustentable del estado de sonora-secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación*.

OEIDRUS-SAGARPA. (2008). *Oficina estatal de información para el desarrollo rural sustentable del estado de sonora-secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación.*

Olivas-Burrola, H., Ezquerra-Brauer, J. M., Rouzaud-Sández, O. y Pacheco-Aguilar, R. (2001). Protease activity and partial characterization of the trypsin-like enzyme in the digestive tract of the tropical sierra *Scomberomorus concolor*. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 10 (4):51-64 p.

Ooi, E. L., Verjan, N., Hirono, I., Nochi, T., Kondo, H., Aoki, T., Kiyono, H. y Yuki, Y. (2008). Biological characterisation of a recombinant atlantic salmon type I interferon synthesized in *Escherichia coli*. *Fish and Shellfish Immunology*. 24:506-513 p.

Pálsdóttir, H. M. y Gudmundsdóttir, A. (2007). Expression and purification of a cold-adapted group III trypsin in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 51:243-252 p.

Pálsdóttir, H. M. y Gudmundsdóttir, A. (2008). The novel trypsin Y from atlantic cod (*Gadus morhua*) - isolation, purification and characterisation. *Food Chemistry*. 111: 408-414 p.

Papaleo, E., Fantucci, P. y De Gioia, L. (2005). Effects of calcium binding on structure and autolysis regulation in trypsins. A molecular dynamics investigation. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 1:1286-1297 p.

Perona, J. J. y Craik, C. S. (1995). Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci*. 4:337-360 p.

Pinsach, J., De Mas, C., López-Santín, J., Streidner, G. y Bayer, K. (2008). Influence of process temperature on recombinant enzyme activity in *Escherichia coli* fed-batch cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 43:507-512 p.

Roach, J. C. (2002). A clade of trypsins found in cold-adapted fish. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 47:31-44 p.

Sachdev, D. y Chirgwin, J. M. (1998). Solubility of proteins isolated from inclusion bodies is enhanced by fusion to maltose-binding protein or thioredoxin. *Protein Expression and Purification*. 12:122-132 p.

Salazar, O., Molitor, J., Lienqueo, M. E. y Asenjo, J. A. (2001). Overproduction, purification, and characterization of β -1,3-glucanase type II in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 23:219-225 p.

Salle, A. D., Errico, G. D., Cara, F. L., Cannio, R. y Rossi, M. (2006). A novel thermostable sulfite oxidase from *thermus thermophilus*: Characterization of the

enzyme, gene cloning and expression in *Escherichia coli*. *Extremophiles*. 10:587-598 p.

Sambrook, J., Maniatis, T. y Fritsch, E. F. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sambrook, J. y Rusell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Chapter 15. Third edition.

Schein, C. H. y Noteborn, M. H. M. (1988). Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Bio-Technology*. 6:291-294 p.

Shahidi, F. y Janak Kamil, Y. (2001). Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends Food Sci Technol*. 12 (12):435-464 p.

Shaw, E., Mares-Guia, M. y Cohen, W. (1965). Evidence for an active-center histidine in trypsin through use of a specific reagent, 1-chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanona, the chloromethyl ketone derived from n-tosyl-L-lysine. *Biochemistry*. 4: 2219-2224 p.

Shitu, J. O. y Woodley, J. M. (2009). Induction studies with *Escherichia coli* expressing recombinant interleukin-13 using multi-parameter flow cytometry. *Biotechnology Letters*. 31(4):577-584 p.

Siddiqui, K. S. y Cavicchioli, R. (2006). Cold-adapted enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 75:403-33 p.

Sorensen, H. P. y Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 115:113-128 p.

Sotelo-Mundo, R. R., Lopez-Zavala, A. A., García-Orozco, K. D., Arvizu-Flores, A. A., Velazquez-Contreras, E. F., Valenzuela-Soto, E. M., Rojo-Dominguez, A. y Kanost, M. R. (2007). The lysozyme from insect (*Manduca sexta*) is a cold-adapted enzyme. *Protein and Peptide Letters*. 14:774-778 p.

Suzuki, T., Srivastava, A. S. y Kurokawa, T. (2002). cDNA cloning and phylogenetic analysis of pancreatic serine proteases from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*. 131:63-70 p.

Tsao, M. L., Summerer, D., Ryu, Y. H. y Schultz, P. G. (2006). The genetic incorporation of a distance probe into proteins in *Escherichia coli*. *Journal of the American Chemical Society*. 128:4572-4573 p.

Voet, D. y Voet, J. (1999). *Biochemistry*. North Publisher, Inc. New York.

Wong, H. H., Kim, Y. C., Lee, S. Y. y Chang, H. N. (1998). Effect of postinduction nutrient feeding strategies on the production of bioadhesive protein in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 60:271-276 p.

Yamabhai, M., Emrat, S., Sukasem, S., Pesatcha, P., Jaruseranee, N. y Buranabanyat, B. (2008). Secretion of recombinant bacillus hydrolytic enzymes using *Escherichia coli* expression systems. *Journal of Biotechnology.* 133:50-57 p.

Yoshida, K. y Shinmyo, A. (2000). Transgene expression systems in plant, a natural bioreactor. *Bioscience and Bioengineering* 90:353-62 p.

Zhou, P. (2003). Application of pectinex smash XXL and pectinex ultra SPL in carrot juice processing. . *Science and Technology of Food Industrie.* 9:62-63 p.