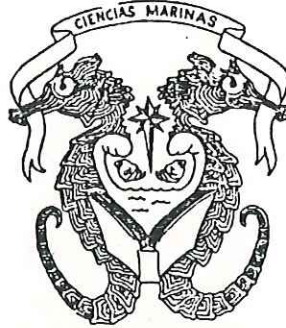




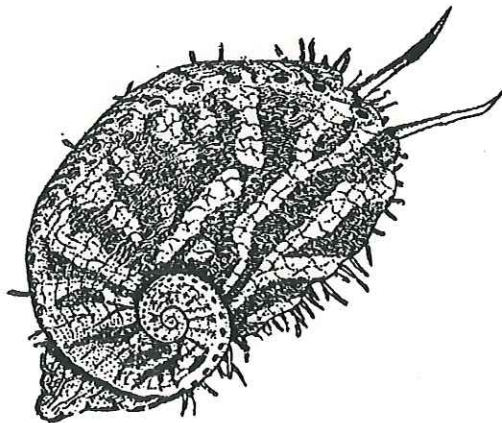
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

MAESTRIA EN OCEANOGRAFIA COSTERA



PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE PROTEASAS DIGESTIVAS DEL ABULON

AZUL, *Haliotis fulgens* (Philippi, 1845)



TESIS

QUE PRESENTA:

ALEJANDRA HERNANDEZ SANTOYO

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

ENSENADA, B.C. JUNIO DE 1995

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE PROTEASAS DIGESTIVAS DEL ABULON
AZUL, *Haliotis fulgens* (Philippi, 1845)

TESIS

QUE PRESENTA:

ALEJANDRA HERNANDEZ SANTOYO

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

APROBADA POR:



DRA. ADELA RODRIGUEZ ROMERO
PRESIDENTE DEL JURADO



DR. FRANCISCO CORREA SANDOVAL.
SINODAL



M. en C. GRACIELA GUERRA RIVAS.
SINODAL



DR. ROBERTO ARREGUIN ESPINOSA.
SINODAL

ENSENADA, B.C. ABRIL DE 1995.

RESUMEN

Se purificaron 6 proteasas del abulón azul, Haliotis fulgens, las cuales se denominaron A, B, F,G,H y J. Estas mostraron pesos moleculares de 24000, 24000, 29000, 32000, 25000 y 17000 daltones respectivamente, puntos isoelectricos de 7.81, 7.10, 3.72, 3.8, 4.02 y 6.61 y coeficientes de extinción de 3.77, 3.12, 2.78, 0.93, 1.3 y 2.78.

Los resultados indicaron que las proteasas B, J, F y G tienen características de proteasas de la familia de las serínicas, la A es del tipo de la quimotripsina y la H es del tipo de la carboxipeptidasa A.

Por otro lado, a partir de sus espectros de dicroísmo circular en la zona del ultravioleta lejano (183-260 nm) se pudo determinar que las proteasas A y J tienen mayor porcentaje de hojas b antiparalelas, mientras que en las fracciones F, G y H predomina la α hélice.

Estas proteasas presentan baja especificidad ya que actúan sobre diferentes sustratos y son inhibidas por diferentes compuestos. Además, precipitan cuando se encuentran a altas concentraciones.

DEDICATORIA

A DIOS

Por darme la fuerza para llegar hasta este momento

A MIS PADRES

DOLORES SANTOYO MEDEL

Y

MIGUEL HERNANDEZ CRUZ

Con todo mi amor y respeto, por compartir conmigo mis alegrías y tristezas. Por estar siempre cerca cuando los he necesitado y darme el mejor regalo que puedo esperar: un hogar y una familia maravillosa. Por su ejemplo y enseñanzas y en fin por ser como son. LOS QUIERO MUCHO.

A MIS HERMANOS

Fernando, Hector, Víctor y Lolita por todo el apoyo que siempre me han brindado, por mostrarme cada uno muy a su manera que siempre están conmigo y que puedo contar con ellos,
GRACIAS

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Adela Rodríguez Romero por su dirección y apoyo durante la elaboración de esta tesis, por su entusiasmo, interés y confianza, porque en todo momento pude contar con ella y por todos los conocimientos que compartió conmigo, GRACIAS.

A mis sinodales: M en C. Graciela Guerra, Dr. Francisco Correa y Dr. Roberto Arreguín, por sus consejos y correcciones a la presente tesis.

Al Dr. Francisco Correa por el apoyo y confianza que siempre me ofreció, porque con su gran profesionalismo y ética me mostró lo puro y maravillosa que es la búsqueda del conocimiento, y lo que es poner todo el entusiasmo en lo que se hace GRACIAS.

Al Dr. Roberto Arreguín por toda la ayuda que me brindó durante el desarrollo del trabajo experimental, por su paciencia y amistad.

Al Dr. Andrés Hernández, por toda su ayuda en la obtención e interpretación de los espectros de dicroísmo circular.

Al Dr. Barbarín Arreguín por sus valiosas observaciones durante el desarrollo de la presente tesis.

A la Ing. Ma. de la Luz Díaz Lopez, Directora de los laboratorios del Instituto Nacional de la Pesca, por toda su ayuda para la obtención de los abulones con que se trabajó en esta tesis.

A las autoridades del Instituto de Química de la UNAM, por permitirme desarrollar este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de Bioestructura del Instituto de Química de la UNAM: Tere, Román, Silvia, Astrid, Ma. Eugenia, Gaby y Enrique por hacer de las largas horas de trabajo de laboratorio algo muy agradable.

"LA AMISTAD ES EL MAS GRANDE TESORO CON EL QUE SE PUEDE SOÑAR"

A Magi por estar siempre cerca en mis momentos difíciles con una sonrisa y los brazos abiertos, por enseñarme a ver siempre el lado bueno de las cosas y de la gente, por sus consejos y por mostrarme lo que es una verdadera amistad. GRACIAS MAGI por tan linda amistad.

A Ixchel y Liliana por toda su ayuda y por la hermosa amistad que siempre me brindaron, por aguantarme tanto y en pocas palabras por ser mis amigas.

A Lili y Sonia por enseñarme a ver la vida desde diferentes puntos de vista y ayudarme a crecer.

A Martín Hdz., Nacho, Primi, Jesús, Moramay, Angélica, Alexandra Gutierrez, Cyntia, Efraín, Sergio Flores y Canett, por todo su apoyo y amistad.

A Ricardo Rodríguez, Alejandra Castillo, Saúl Gonzalez, Felipe Correa y Adan Castillo por todo su apoyo y amistad.

A Tere Hernández, por su apoyo y amistad y por todos los conocimientos que compartió conmigo.

Gracias a todas estas personas que me enseñaron el más puro significado de lo que es la AMISTAD. Espero no fallarles nunca.

CONTENIDO

	PAGINA
INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE TABLAS	vi
ABREVIATURAS UTILIZADAS	1
1.0 INTRODUCCION	
1.1 Proteasas	2
1.2 Proteasas serínicas	5
1.3 Proteasas cisteínicas	7
1.4 Proteasas aspárticas	7
1.5 Metaloproteasas	9
1.6 Antecedentes	11
1.7 Descripción del género <i>Haliotis</i>	12
1.7.1. Descripción del abulón azul, <i>Haliotis fulgens</i> .	15
2.0 OBJETIVO	19
3.0 METODOLOGIA	
3.1 Descripción de la zona de colecta	20
3.2 Colecta y almacenamiento	21
3.3 Extracción de proteínas	21

3.4 Pruebas preliminares	
3.4.1. Determinación de actividad proteolítica	22
3.4.2. Cuantificación de proteínas	23
3.4.3. Actividad con diferentes valores de pH, temperatura y concentración de NaCl	24
3.5 Purificación de enzimas	
3.5.1. Cromatografía de intercambio aniónico	24
3.5.2. Cromatografía de alta resolución (HPLC)	25
3.5.3. Concentración de las muestras	25
3.6 Caracterización de las enzimas	
3.6.1. Determinación de actividad proteolítica	25
3.6.2. Determinación del punto isoelectrico	26
3.6.3. Peso molecular	26
3.6.4. Determinación de actividad sobre diferentes sustratos	27
3.6.5. Efecto de inhibidores	28
3.6.6. Coeficiente de extinción	29
3.6.7. Dicroísmo circular	29
3.6.8. Determinación de la composición de aminoácidos	30
4.0 RESULTADOS Y DISCUSION	
4.1 Pruebas preliminares de estabilidad	
4.1.1. Actividad a diferentes valores de pH, temperatura y concentración de NaCl.	32
4.1.2. Actividad sobre diferentes sustratos.	35
4.1.3. Actividad con diferentes inhibidores	36
4.2 Purificación	38

4.3 Caracterización	
4.3.1. Determinación del peso molecular	50
4.3.2. Determinación del punto isoelectrico	50
4.3.3. Coeficiente de extinción	52
4.3.4. Actividad proteolítica de cada fracción con diferentes sustratos	53
4.3.5. Actividad proteolítica en presencia de diferentes inhibidores	54
4.3.6. Contenido de aminoácidos	55
4.3.7. Determinación de la estructura secundaria	56
5.0 CONCLUSIONES	61
6.0 BIBLIOGRAFIA	62

INDICE DE FIGURAS

	PAGINA
FIGURA 1. Representación esquemática de los pasos involucrados en la catálisis por enzimas de la familia de las peptidasas serínicas.	6
FIGURA 2. Representación esquemática de la hidrólisis catalizada por las peptidasas de tipo cisteínico.	8
FIGURA 3. Representación esquemática del mecanismo catalítico ácido-base de las peptidasas aspárticas.	9
FIGURA 4. Representación esquemática de la catálisis del rompimiento del enlace peptídico por un miembro de la familia de enzimas metalopeptidasas.	10
FIGURA 5. Anatomía interna del abulón azul, <i>Haliotis fulgens</i> . Vista dorsal con la concha removida.	13
FIGURA 6. Vista ventral de la anatomía interna del abulón azul, <i>Haliotis fulgens</i> .	14
FIGURA 7. Clasificación sistemática del abulón azul, <i>Haliotis fulgens</i> .	16
FIGURA 8. Zona de colecta.	20
FIGURA 9. Actividad proteolítica del extracto obtenido de la precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación, a diferentes valores de pH.	33
FIGURA 10. Actividad proteolítica del extracto obtenido de la precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación, a diferentes temperaturas.	33
FIGURA 11. Actividad proteolítica del extracto obtenido de la precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación, con diferentes concentraciones de NaCl.	34
FIGURA 12. Cromatografía de intercambio iónico DEAE-Sepharose.	40
FIGURA 13. Cromatografía de intercambio iónico de alta resolución. Muestra A.	42
FIGURA 14. Cromatografía de intercambio iónico de alta resolución. Muestra B.	43

FIGURA 15. Cromatografía de intercambio iónico de alta resolución. Muestra F.	44
FIGURA 16. Cromatografía de intercambio iónico de alta resolución. Muestra G.	45
FIGURA 17. Cromatografía de intercambio iónico de alta resolución. Muestra H.	46
FIGURA 18. Cromatografía de intercambio iónico de alta resolución. Muestra J.	47
FIGURA 19. Enfoque isoelectrico en microgeles de poliacrilamida, con gradiente de pH 3-9.	48
FIGURA 20. Electroforésis en microgeles homogéneos de SDS-poliacrilamida al 20%.	51
FIGURA 21. Espectro de Dicroísmo circular en la región del UV lejano (183-260 nm), de proteasas del abulón azul, <i>Haliotis fulgens</i> . A) Proteasa A, B) Proteasa F	58
FIGURA 22. Espectro de Dicroísmo circular en la región del UV lejano (183-260 nm), de proteasas del abulón azul, <i>Haliotis fulgens</i> . A) Proteasa A, B) Proteasa F	59
FIGURA 23. Espectro de Dicroísmo circular en la región del UV lejano (183-260 nm), de proteasas del abulón azul, <i>Haliotis fulgens</i> . A) Proteasa A, B) Proteasa F	60

INDICE DE TABLAS

	PAGINA
TABLA I. Familia de enzimas proteolíticas.	3
TABLA II. Intervalo de pH de diferentes amortiguadores.	24
TABLA III. Actividad hidrolítica del extracto obtenido de la precipitación con sulfato de amonio al 60%, sobre diferentes sustratos.	36
TABLA IV. Efecto de diversos inhibidores en la actividad proteolítica sobre caseína, del extracto de la precipitación con sulfato de amonio al 60%.	38
TABLA V. Purificación de proteasas digestivas del abulón azul (<i>H. fulgens</i>).	49
TABLA VI. Punto isoelectrico, peso molecular y coeficiente de extinción de las enzimas purificadas.	52
TABLA VII. Actividad hidrolítica de las fracciones puras sobre diferentes sustratos sintéticos.	53
TABLA VIII. Efecto de diversos inhibidores sobre la actividad proteolítica de las enzimas purificadas.	54
TABLA IX. Composición de aminoácidos de las muestras purificadas.	56
TABLA X. Contribución relativa de estructuras secundarias a los espectros de CD de cada enzima purificada.	57

ABREVIATURAS UTILIZADAS

A₂₈₀: Absorbencia a 280 nm.

ATEE: N-acetil-L-tirosina etil éster

ATC: Acidotricloroacético

BAEE: N- α -benzoil-L-arginina etil éster.

BAPNA: N- α -benzoil-D,L-arginina-p-nitroanilida.

BCA: Acido bicinconínico.

BSA: Albúmina de suero de bovino.

BTEE: N-benzoil-L-tirosina etil éster.

CD: Dicroísmo circular.

DMF: N,N-Dimetilformamida.

DEAE: Dietilaminoetil

EDTA: Acido etilendiamino tetracético.

g: Fuerza centrífuga relativa.

HPLA: Hipuril-L-fenilalanina.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

IEF: Enfoque isoelectrico.

λ : longitud de onda.

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida.

PEG: Polietilenglicol.

SDS: Dodecil sulfato de sodio.

TAME: N- α -p-tosil-L-arginina metil ester.

TPCK: N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona.

Tris: Tris (hidroximetil) amino-metano.

UV: Ultravioleta.

1.0 INTRODUCCION

1.1 Proteasas

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos que forman la estructura primaria de las proteínas (Dixon y Webb, 1979). Se encuentran en microorganismos, plantas y animales. En animales superiores, las proteasas están involucradas en varios procesos fisiológicos incluyendo la digestión, activación de proenzimas o prohormonas y mecanismos de defensa, como la coagulación de la sangre y la activación o inactivación de proteínas por simples eventos proteolíticos. En todos los casos, las proteasas son responsables de la "modificación de proteínas" (García-Carreño, 1992; Beynon y Bond, 1989). Las proteasas, también llamadas hidrolasas peptídicas, incluyen a todas las enzimas que rompen enlaces peptídicos. Posteriormente estas fueron subdivididas en exopeptidasas (o peptidasas), enzimas que rompen los enlaces peptídicos en los extremos amino o carboxilo, y endopeptidasas (o proteinasas), que son aquéllas que rompen enlaces peptídicos internos. No obstante, las proteinasas o endopeptidasas, que son el principal grupo a nivel industrial son llamadas proteasas por simplicidad (Beynon y Bond, 1989).

La clasificación de las proteasas difiere notablemente de la usada en la nomenclatura de enzimas, debido a su baja especificidad por el sustrato (García-Carreño, 1992). Primeramente se clasificaron de acuerdo a su peso molecular, carga o especificidad por el sustrato. Un sistema más racional de clasificación se basa en una comparación del sitio activo, mecanismo de acción y estructura tridimensional. A la fecha se han reconocido cuatro clases mecánicas por la Unión Internacional de Bioquímica y dentro de estas clases, seis familias (Tabla I). Cada familia tiene un grupo característico de aminoácidos funcionales ordenados en una configuración particular para formar el sitio activo (Beynon y Bond, 1989). Los miembros de

cada familia se cree que descienden de un ancestro común por evolución divergente (Neurath, 1989; Polgár, 1987; Walsh y Wilcox, 1970).

TABLA I. Familias de enzimas proteolíticas (Tomado de Neurath, 1989)

FAMILIA	Proteasas representativas	Residuos característicos del sitio activo ¹
Proteasas serínicas I	Quimotripsina Tripsina Elastasa	Asp ¹⁰² , Ser ¹⁹⁵ , His ⁵⁷
Proteasas serínicas II	Subtilisina	Asp ³² , Ser ²²¹ , His ⁶⁴
Proteasas cisteínicas	Papaína Actinidina Catepsina B y H del hígado de rata	Cys ²⁵ , His ¹⁵⁹ , Asp ¹⁵⁸
Proteasas aspárticas	Penicilopepsina Proteasas ácidas Renina	Asp ³³ , Asp ²¹³
Metaloproteasas I	Carboxipeptidasa A de bovino	Zn, Glu ²⁷⁰ , Tyr ²⁴⁸
Metaloproteasas II	Termolisina	Zn, Glu ¹⁴³ , His ²³¹

¹ El número de los residuos corresponden a la secuencia de aminoácidos de la enzima remarcada con negro.

Las proteasas serínicas tienen un residuo de serina en el sitio activo, así como histidina y ácido aspártico, las cisteínicas se caracterizan por tener un residuo de cisteína en el centro catalítico. Por otra parte, las proteasas aspárticas presentan un residuo de ácido aspártico en el sitio activo y presentan una máxima actividad a pH ácido. Las metaloproteasas poseen un residuo de ácido glutámico en el sitio activo y requieren un catión divalente como el zinc (Zn^{+2}), calcio (Ca^{+2}) o magnesio (Mg^{+2}) para catalizar la hidrólisis del enlace peptídico (García-Carreño, 1992).

Según su mecanismo químico de catálisis, las proteasas se pueden agrupar en: aquellas que forman complejos covalentes entre la enzima y el sitio de hidrólisis del sustrato (proteasas serínicas y cisteínicas); y las que no forman complejos covalentes enzima-sustrato (proteasas aspárticas y metaloproteasas). Esta distinción es de particular importancia debido a que tiene una marcada consecuencia en el mecanismo de inhibición. Las primeras tienen aminoácidos

fuertemente nucleofílicos en su sitio catalítico, por consiguiente, sus inhibidores deben poseer grupos altamente electrofílicos. Las proteasas que forman complejos no covalentes presentan una catálisis general ácido/base por el ataque de una molécula de agua, por lo tanto, los residuos catalíticos carecen de una fuerte nucleofilicidad. Los inhibidores que requiere este segundo grupo deben formar complejos que incluyan más interacciones de enlaces secundarios a lo largo de la hendidura del sitio activo y en los estados de transición análogos (Dunn, 1989). Los inhibidores a su vez pueden ser de dos tipos según su naturaleza: (i) inhibidores de bajo peso molecular, los cuales bloquean irreversiblemente un aminoácido catalítico en el sitio activo o quelan el catión requerido; y (ii) inhibidores naturales (proteínas de alto peso molecular) los cuales generalmente se comportan como pseudosustratos y trabajan en forma reversible (García-Carreño, 1992).

Las enzimas proteolíticas son utilizadas en diversas industrias, debido a que presentan ventajas sobre otros catalizadores químicos, como ser biodegradables, no contaminar y porque operan en un amplio intervalo de pH y temperatura. Además, pueden ser producidas en grandes cantidades con costos relativamente bajos. Según Towalski y Rothman (1986), las enzimas proteolíticas tienen actualmente cuatro áreas de aplicación:

- Como herramientas en la investigación científica (algunas enzimas son producidas en pequeñas cantidades y son distribuidas por especialistas para ser utilizadas como estándares en la investigación).
- Para la elaboración de cosméticos como cremas limpiadoras de la piel.
- Para propósitos terapéuticos, en la elaboración de medicamentos que ayuden a la digestión, para la limpieza de heridas, líquidos limpiadores de lentes de contacto, etc.
- Para usos industriales en la elaboración de hidrolizados proteicos, vinos, productos lácteos, saborizantes, en el tratamiento de pieles y del algodón, así como en la síntesis de aminoácidos, etc.

1.2 Proteasas serínicas

La familia de proteasas mejor caracterizada y fisiológicamente más versátil es la de las proteasas serínicas, producto de secreciones pancreáticas (Dunn, 1989; Polgár, 1987) . La mayoría de estas enzimas pueden ser agrupadas en tres categorías muy generales en base a su especificidad:

- Semejantes a la quimotripsina
- Semejantes a la tripsina
- Semejantes a la elastasa

La quimotripsina hidroliza enlaces peptídicos adyacentes al grupo carboxilo de los aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina o fenilalanina. También ocurre la proteólisis en aminoácidos no polares como la metionina y la leucina. La tripsina tiene especificidad por los extremos básicos de las cadenas laterales, mientras que la elastasa presenta una preferencia por residuos de aminoácidos pequeños (Polgár, 1987). Estas enzimas presentan en sus sitios activos la triada catalítica Asp¹⁰², His⁵⁷, Ser¹⁹⁵ (numeración de la quimotripsina). El mecanismo de catálisis procede vía un estado de transición intermedio tetrahédrico durante los pasos de acilación y desacilación (Fig. 1). El mismo mecanismo de acción ocurre para las otras proteasas serínicas. La característica importante de este esquema de reacción es la formación de un éster entre el oxígeno de la serina 195 y la porción acil del sustrato, con la liberación de la porción "amino" del sustrato como el primer producto (P1). El éster así formado será el mismo para una serie de sustratos, los cuales difieren en sus grupos restantes. El otro elemento de importancia en la hidrólisis del enlace peptídico por las proteasas serínicas es la presencia de 2 grupos -NH- que están disponibles para formar puentes de hidrógeno con el oxígeno aniónico del grupo carbonilo que experimenta el ataque. Este efecto es difícil de evaluar sobre una base cuantitativa debido a que los grupos -NH- son esenciales para la integridad estructural de la

proteína. La conformación global de las proteasas serínicas es prácticamente la misma: dos dominios compactos, similarmente plegados y simétricamente dispuestos alrededor de un eje doble de simetría. Las diferencias en la especificidad por el sustrato pueden estar relacionadas a sustituciones de aminoácidos en el sitio de enlace primario comúnmente denotado como P₁, mientras que las diferencias menores están relacionadas con los sitios de enlace secundario. Los genes que codifican para la tripsina, quimotripsina y elastasa difieren en número y distribución de intrones (Neurath, 1989).

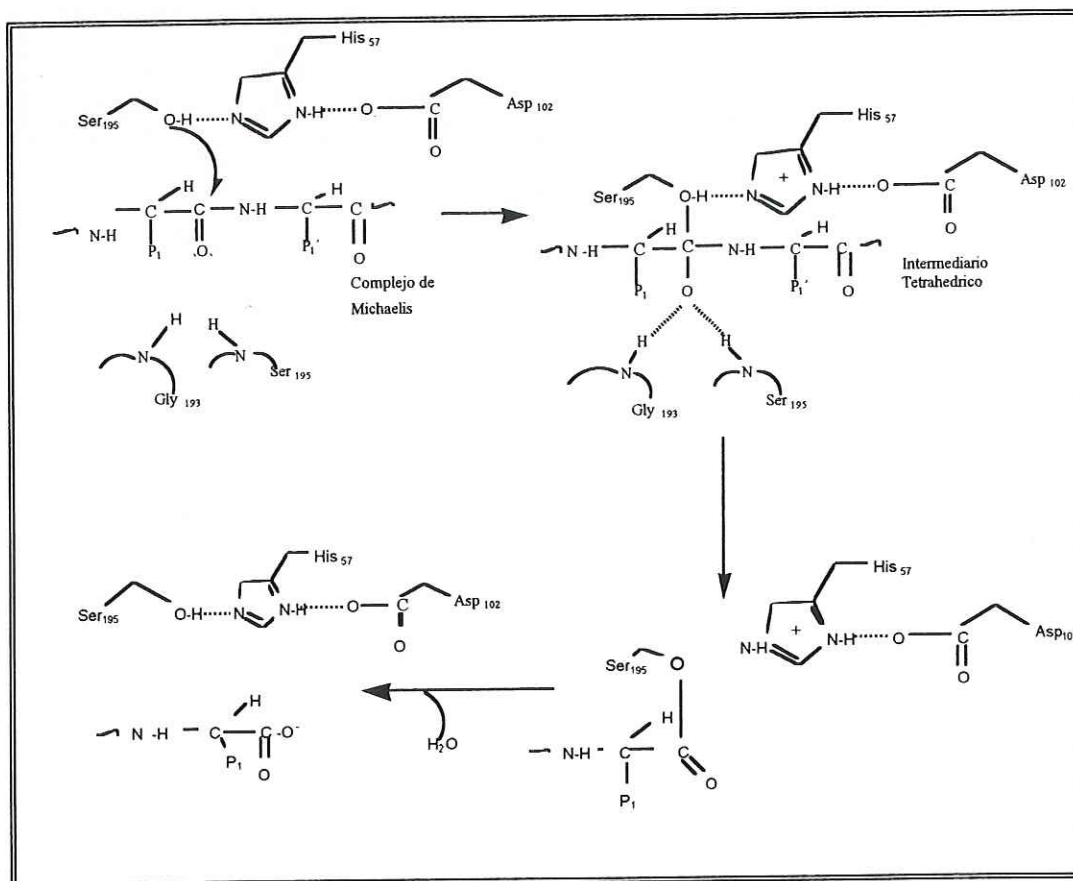


Figura 1. Representación esquemática de los pasos involucrados en la catálisis por enzimas de la familia de las peptidasas serínicas. La reacción procede a través de la formación de un intermediario tetrahédrico, seguida por la pérdida de la mitad derecha del sustrato para dar un intermediario acilo. El rompimiento de este intermediario ocurre por el ataque de agua para dar lugar al producto ácido (Tomado de Dunn, 1989).

1.3 Proteasas cisteínicas

Esta familia de proteasas incluye varias catepsinas lisosomales de mamíferos, proteasas citosólicas activadas por calcio (calpaínas) y las proteasas de plantas, tales como papaína y actinidina. La papaína es la más estudiada de esta familia de proteasas. El principal aminoácido catalítico es la cisteína 25 que actúa en forma similar a la serina 195 en la quimotripsina, en general, presentan gran similitud con las proteasas serínicas ya que también se forma un intermediario covalente. En este caso el nucleófilo atacante es el átomo de azufre de la Cys²⁵ (según el sistema de numeración de la papaína). También una histidina está involucrada en un puente de hidrógeno (His¹⁵⁹). El mecanismo de catálisis es a través de un tiol éster intermediario y es facilitada por la cadena lateral adyacente de histidina 159 y ácido aspártico 158. Un esquema para representar el mecanismo de acción de esta familia de enzimas se muestra en la Figura 2. Este incluye dos grupos -NH- esta vez desde los residuos Gln¹⁹ y Cys²⁵ de la enzima actuando como el "hueco oxianión" en perfecta analogía con la familia de las proteasas serínicas.

1.4 Proteasas aspárticas

Las proteasas aspárticas incluyen a la penicilopepsina bacteriana, la cual se utiliza como modelo estructural, la pepsina de mamíferos, la renina, la quimosina y algunas proteasas de hongos. Los aminoácidos característicos del sitio activo son el ácido aspártico 33 y 213 (según la numeración de la penicilopepsina), los cuales están en una proximidad geométrica. En el intervalo de pH en el que son enzimáticamente activas (2-3), un ácido aspártico está ionizado y el otro no. Un inhibidor de las proteasas aspárticas es el pepstaintin, un hexapéptido que en el estado de transición se parece al sustrato normal.

Este grupo de enzimas catalizan el rompimiento de enlaces peptídicos sin el uso de atacantes nucleofílicos por un grupo funcional de la enzima, por lo tanto, el intermediario que se forma no es por unión covalente entre la enzima y un fragmento del sustrato (Fig. 3). El

sistema catalítico de las proteasas aspárticas consiste de dos cadenas con extremos de ácido aspártico (residuos 32 y 215 del sistema de numeración de la pepsina de porcino).

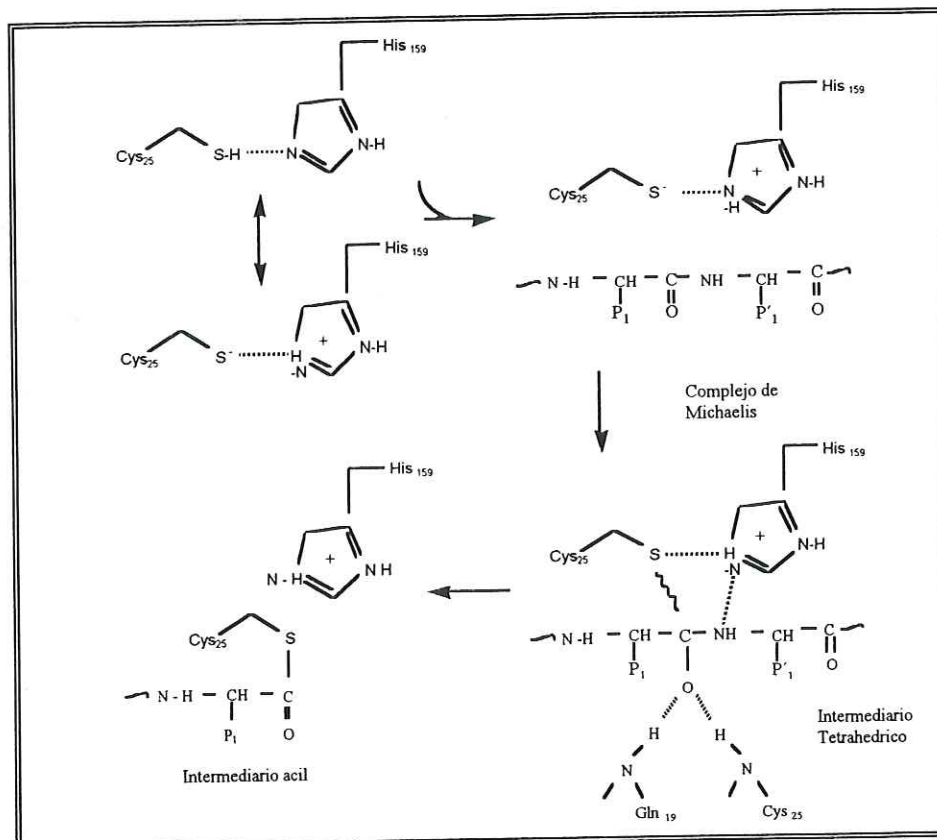


Figura 2. Representación esquemática de la hidrólisis catalizada por las peptidasas de tipo cisteínico. La Cys catalítica está involucrada en un equilibrio tautomérico entre las formas neutra y zwitteriónica. Se cree que el azufre aniónico está involucrado en el ataque nucleofílico directo sobre el sustrato carbonilo (Tomado de Dunn, 1989).

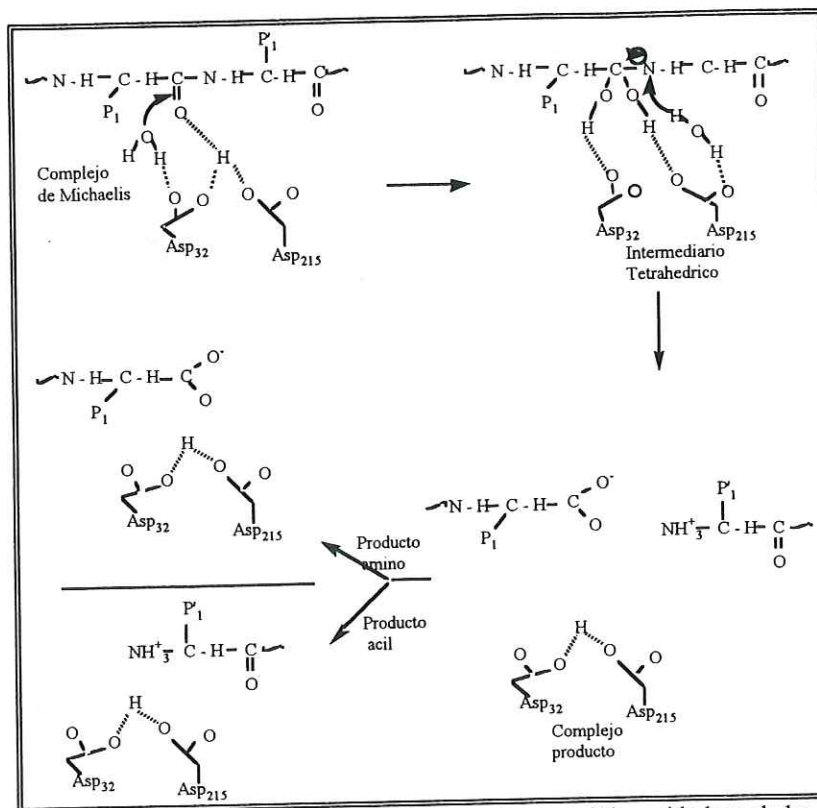


Figura 3. Representación esquemática del mecanismo catalítico ácido-base de las peptidasas aspárticas. El rompimiento del intermediario tetrahédrico da origen a un complejo que contiene ambas mitades del producto. Este esquema indica que la disociación de ambos puede dar un producto acilo o un amino (tomado de Dunn, 1989).

1.5 Metaloproteasas.

Este grupo de enzimas, al igual que las aspárticas, no forman estados intermediarios covalentes. Para lograr el efecto catalítico sobre el grupo carbonilo del enlace a romper, las metaloproteasas utilizan la coordinación con un ión metálico, este metal es generalmente el zinc, aunque en algunos casos, otros metales pueden sustituirlo. El ión metálico provee una fuerte atracción electrofílica para ayudar en el ataque por una molécula de agua. La enzima nativa tiene una molécula de agua coordinada al cuarto sitio tetrahédrico (los ligandos al metal son 2 histidinas y un ácido glutámico en la carboxipeptidasa A y en la termolisina). Esta molécula de agua puede ser desplazada del sustrato en la posición carbonilo al átomo de metal, pero se cree que permanece en el sitio activo (Fig. 4).

Las metaloproteasas carboxipeptidasas A y B son exopeptidasas homólogas de estructura y sitios activos similares. La carboxipeptidasa A como la quimotripsina prefiere los extremos C- terminal aromáticos y alifáticos de naturaleza hidrofóbica, mientras que la acción de la carboxipeptidasa B es dirigida hacia los residuos básicos arginina y lisina. La carboxipeptidasa A es una de las proteasas más estudiadas, sin embargo, su mecanismo de acción todavía no está perfectamente esclarecido. La termolisina bacteriana es la única representante de las metalo-endopeptidasas cuya estructura y mecanismo de acción son conocidos.

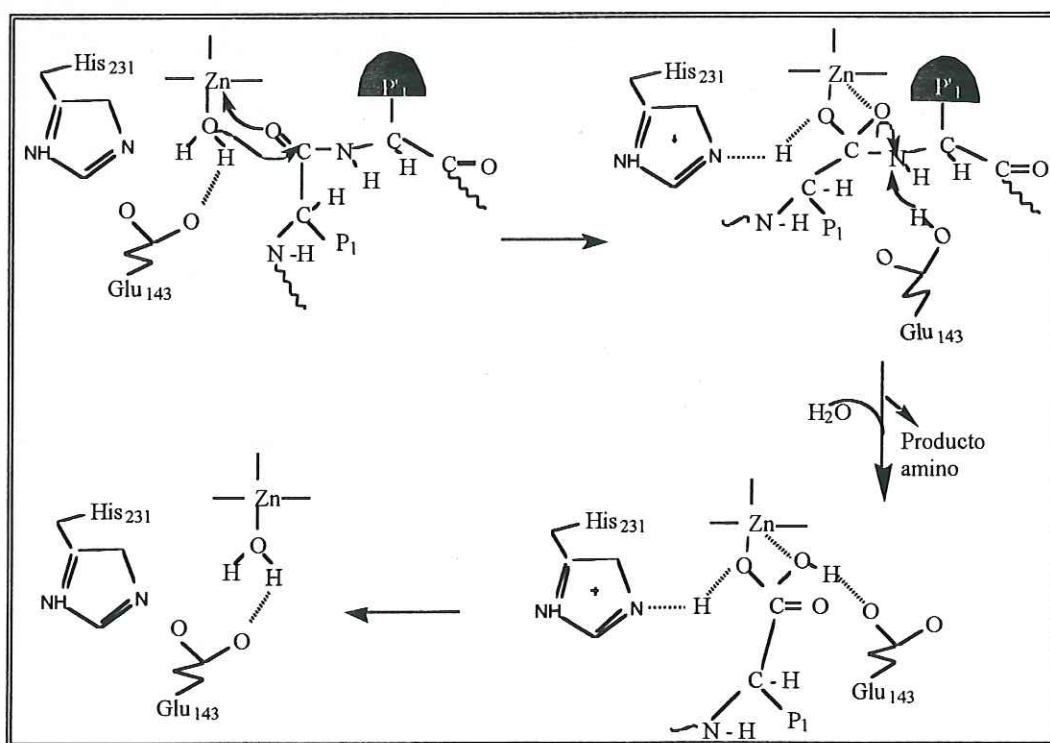


Figura 4. Representación esquemática de la catálisis del rompimiento del enlace peptídico por un miembro de la familia de enzimas metalo-peptidasas. (Tomado de Dunn, 1989)

1.6 Antecedentes

La mayor parte de los estudios sobre enzimas proteolíticas están enfocados a las proteasas serínicas. Estas últimas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, sus propiedades características fueron reconocidas primero entre las enzimas digestivas originadas en el páncreas de mamíferos. Más recientemente, tales enzimas han sido encontradas en todas las especies de vertebrados investigadas. Posteriormente se encontró que ellas no estaban restringidas a funciones digestivas en la región intestinal, tal es el caso de la trombina y la plasmina que están involucradas en la formación y disolución de coágulos de sangre.

En vertebrados con un páncreas definido, las proteasas están presentes en la glándula y en jugos exócrinos como precursores inactivos o zimógenos, los cuales deben ser activados. Todos los zimógenos conocidos de las proteasas serínicas son convertidos en enzimas activas por la acción de la tripsina. Generalmente el rompimiento de un enlace peptídico específico es suficiente para esta activación. La tripsina surge por la activación del tripsinógeno pancreático mediante un mecanismo autolítico *in vivo*, este proceso es iniciado por la enzima intestinal enteroquinasa.

En los peces teleósteos los cuales no tienen un páncreas definido, las proteasas serínicas se han encontrado en el cecal pilórico pero sólo en la forma activa.

En invertebrados se han encontrado en phyla tales como el Coelenterata, Echinodermata, Arthropoda, Crustacea y Mollusca así como en bacterias (Zwilling y Neurath, 1981; Walsh y Wilcox, 1970).

Los fluidos digestivos en moluscos son una fuente rica de una variedad de enzimas hidrolíticas, incluyendo las de tipo proteolítico (Barnett et al., 1967; Clark y Jowett, 1988; Cho et al., 1983). En los moluscos gasterópodos pertenecientes al género *Haliotis*, casi todos los estudios están enfocados hacia su biología, dinámica poblacional, estudios sobre cultivos,

siembra y engorda, fecundidad y madurez gonádica (Guzmán del Prío, 1992), sin embargo poco se ha estudiado sobre diferentes aspectos bioquímicos aún cuyo se han encontrado una amplia variedad de hidrolasas digestivas, en el abulón *Haliotis iris*, y en el extracto crudo del hepatopáncreas del abulón *H. coccinea* canariensis las cuales pueden tener una gran aplicación bioquímica (Clark y Jowett, 1978; Gómez-Pinchetti y García Reina, 1993). En el abulón *H. discus hannai* se ha reportado actividad proteolítica en el extracto crudo del tracto digestivo (Cho et al., 1983).

1.7 Descripción del género *Haliotis*

Los abulones son gasterópodos marinos hervíboros, con todas las especies en un género, *Haliotis*. Constituyen uno de los más primitivos gasterópodos en forma y estructura. Hay cerca de 100 especies en el mundo distribuidas en ambos hemisferios, con el mayor número de especies en regiones templadas. (Hahn, 1989a; Fallu, 1991). Vive adherido a las rocas de los fondos marinos y estrechamente ligado a la presencia de mantos de algas pardas compuestos principalmente de los géneros *Macrocystis*, *Egregia*, y *Eisenia* (Cox, 1962; Guzmán del Prío y Ortiz Quintanilla, 1972; Ortiz y León, 1994).

El género *Haliotis* está dividido en más de 15 subgéneros. Los caracteres sobre los cuales están basados estos taxa incluyen la proporción entre la concha y el tamaño del cuerpo, esculturaciones de la concha, estructuras apipodiales y la morfología del tremata. Los miembros de este grupo tienen una concha dextrógira con aberturas marginales. El interior de la concha es típicamente nacarado y el animal posee un par de ctenidios bipectinados, tentáculos epipodiales bien desarrollados y una rádula ripidoglosada (Lindberg, 1992).

La anatomía del género *Haliotis* (Figs. 5 y 6) fue descrita con detalle por Crofts (1929) e Ino (1952) (citados por Cox, 1962). El tracto alimentario está sobre el lado izquierdo del cuerpo, entre el músculo de la concha y el borde del epipodio. Excepto por la porción del esófago que pasa a través del músculo del pie en la región de la cabeza, el tracto entero y las

vísceras están fuera de la gran masa de músculo y se mantienen en su sitio por los músculos ventrales y dorsales. Dicho sistema consiste sucesivamente de boca, esófago, estómago (dividido en tres o cuatro partes) y el intestino, este último, pasa por la cabeza antes de terminar en el ano. Las especies de *Haliotis* son dioicas y la fecundación externa. En casi todos los casos, los sexos son fácilmente distinguibles conforme se acercan a una madurez sexual; en las hembras la gónada es verde grisáceo y en los

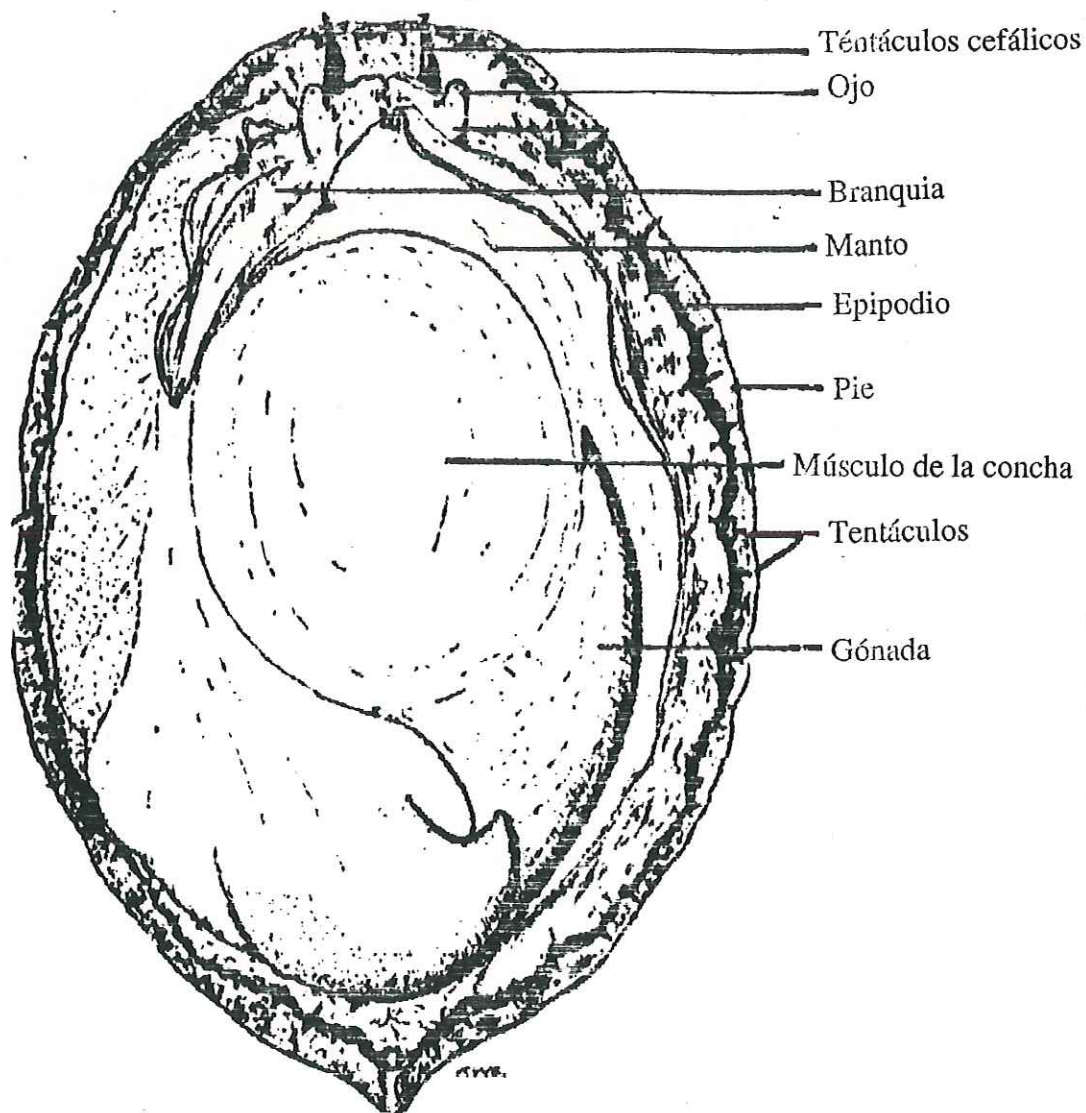


Fig. 5. Anatomía interna del abulón azul, *Haliotis fulgens*. Vista dorsal con la concha removida (Tomado de Cox, 1962)

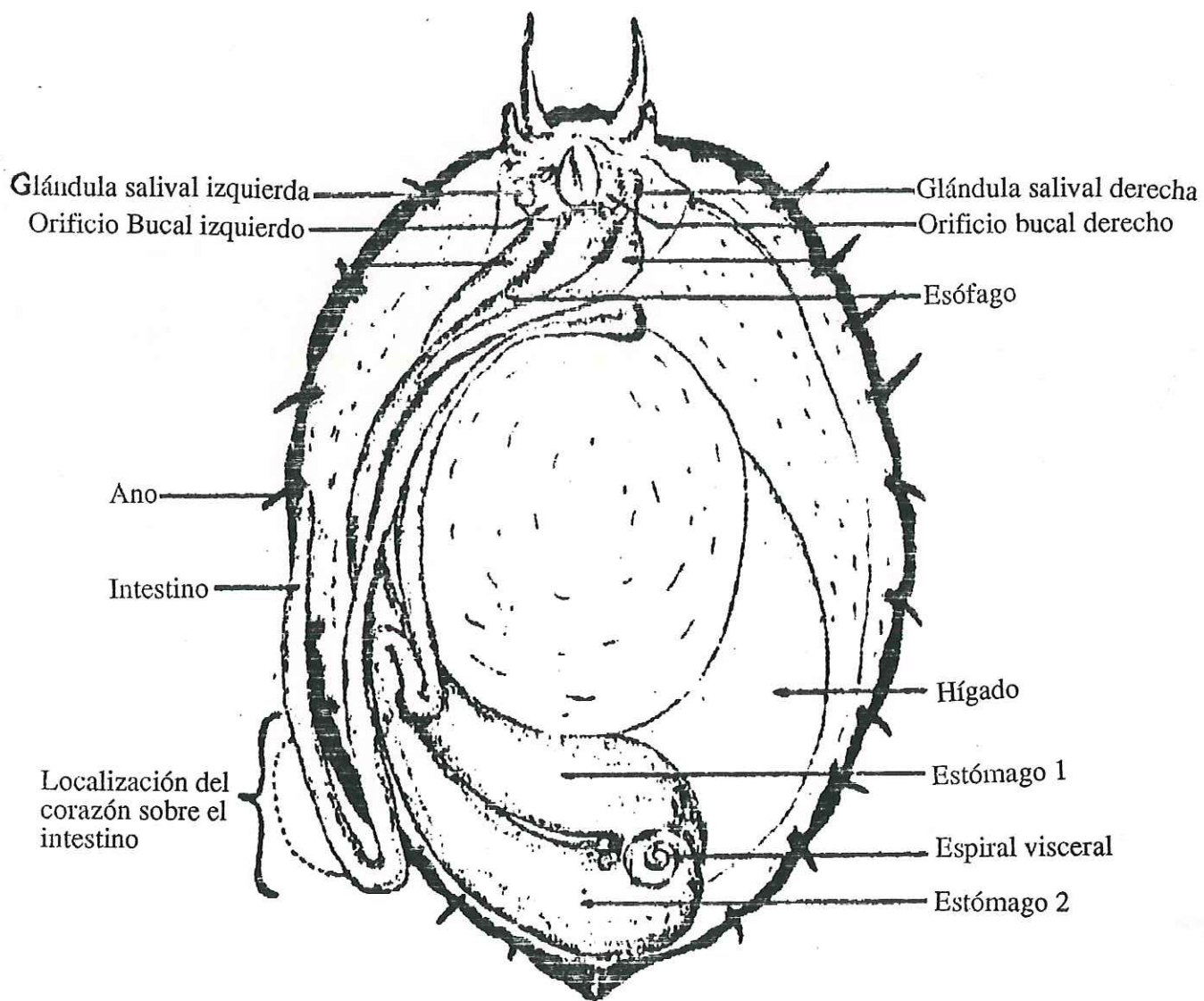


Figura 6. Vista ventral de la anatomía interna del abulón azul *Haliotis fulgens* (Tomado de Cox, 1962)

machos es crema o beige. La razón de sexos observada en muestras de capturas comerciales varía con la zona y el año, siendo para *H. fulgens* de 1:2.8 (machos:hembras) (Yrade, 1980, citado por Guzman del Prío, 1992).

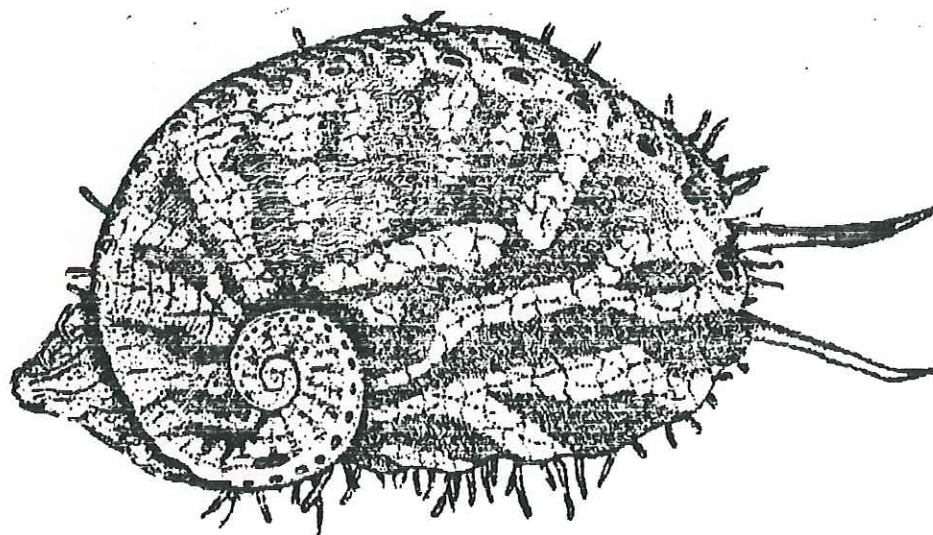
1.7.1. Descripción del abulón azul, *Haliotis fulgens*

En México, el género *Haliotis* se distribuye a lo largo de la costa oeste e islas adyacentes de la Península de Baja California, desde la frontera con EUA, hasta Punta Tosca, ubicada en la parte sur de Isla Margarita, BCS. Según Ortiz y León (1988) existen 5 especies comerciales cada una con características propias, aunque presentan semejanzas considerables. Estas especies varían en su preferencia por un determinado intervalo de temperatura, profundidad, hábitat físico y alimento, siendo el abulón azul el que ocupa el primer sitio en capturas, con porcentajes por arriba del 80%. (Ortiz y León, 1994)

Nombre científico	Nombre común
<i>Haliotis fulgens</i> (Philippi, 1845)	Abulón azul
<i>Haliotis corrugata</i> (Gray, 1845)	Abulón amarillo
<i>Haliotis cracherodii</i> (Leach, 1817)	Abulón negro
<i>Haliotis rufescens</i> (Swainson, 1822)	Abulón rojo
<i>Haliotis sorenseni</i> (Bartsch, 1940)	Abulón chino

El abulón azul, *Haliotis fulgens* (Fig. 7), es un gasterópodo que habita en aguas poco profundas (de 3 a 7 m), aunque pueden localizarse entre los 17 y 20 m de profundidad. Llega a medir hasta 25 cm de longitud pero la mayoría de los individuos oscilan entre 12.5 y 20 cm. La concha es oval, gruesa y la superficie tiene numerosos bordes. El borde de la concha es muy delgado tiene generalmente un color verde oliva o café con 5-7 orificios abiertos, con una banda roja a lo largo de los poros respiratorios (Haaker et al., 1986; Hahn, 1989a), se

distribuye desde Point Conception, California, EEUU, hasta Bahía Magdalena, Baja California Sur, México.



Reino: Animalia
Phylum: Mollusca
Clase: Gastropoda
Subclase: Prosobranchia
Orden: Archeogastropoda
Suborden: Zygobranchia
Superfamilia: Pleurotomariacea
Familia: Haliotidae
Género: Haliotis
Especie: H. fulgens

Haliotis fulgens (Philippi, 1845)

Fig. 7 Clasificación sistemática del abulón azul, *Haliotis fulgens* (Tomada de Hahn, 1989a)

Generalmente el epipodium es de color crema o café, moteado, los tentáculos son verde oliva. Los individuos de esta especie desovan una vez por año, con un grado intermedio de sincronía con el natural (Hahn, 1989b). La capacidad reproductiva de esta especie es grande, un adulto hembra puede producir 6.5 millones de huevos por año. La madurez sexual ocurre en tallas relativamente pequeñas (Tegner y Butler, 1989).

En el medio natural su dieta consiste de algas siendo la que más consume el alga café *Macrocystis* sp. (Leighton, 1966), su tasa de crecimiento es muy lenta, siendo las típicas de aproximadamente 2-3 cm/año, por tanto se requieren de 2-5 años para para producir un abulón de talla comercial (7.5 a 10 cm) (Hahn, 1989c).

Actualmente existe un total de 22 cooperativas que integran una flota de aproximadamente 180 equipos abuloneros. Casi el 100% de la producción de abulón se destina al proceso de enlatado y el 97% de éste se destina a exportación. El costo de la caja de 48 latas (254g de peso drenado por cada lata) de abulón de primera es vendido por el sector productor a un costo de aproximadamente 1200 dls y el abulón en trozo a 650 dls. Las conchas de los abulones también son requeridas por ambos mercados (nacional e internacional) para su procesamiento artesanal y trabajos de joyería. La concha de abulón azul de primera se cotiza aproximadamente en 7,600 dls la tonelada (Ortiz y León, 1994).

La tasa de crecimiento lenta y su poca movilidad comparada con los organismos neotónicos, aunada a su alto costo en el mercado lo hacen susceptible a la sobrepesca y todos los países productores han tenido este problema (Mottet, 1978; Hahn, 1989a; Tegner y Butler, 1989; Ebert y Houk, 1989; Davis et al., 1992; Parker et al., 1992; Salas-Garza y Searcy-Bernal, 1992; Guzmán del Proo, 1992). Todo esto aunado a los depredadores naturales como la nutria, pulpos, langostas, rayas y algunos cangrejos (Tegner y Butler, 1992) han provocado que la pesquería del abulón se vea colapsada. En las costas de México, la pesquería de abulón ha mostrado un decremento continuo desde el inicio de su comercialización (Rocha, 1985; Guzmán del Próo, 1992; Salas-Garza y Searcy-Bernal, 1992). Las capturas que excedían las

2000 ton en la década de los 60's e inicio de los 70's disminuyeron a menos de 300 ton a principios de los 80's. Una alternativa ante la disminución en la pesquería del abulón consiste en el desarrollo de métodos de cultivo (Hahn, 1989a; Ramírez-Granados,1992), lo que implica dentro de muchos otros aspectos la elaboración de dietas artificiales para garantizar la disponibilidad de alimento e incrementar las tasas de crecimiento. De allí la importancia de conocer las proteasas digestivas presentes en el abulón, a fin de entender a fondo su digestión y elegir las dietas adecuadas que logren el máximo aprovechamiento del alimento por parte del organismo, lo cual se refleje en un incremento en las tasas de crecimiento de los mismos.

2.0 OBJETIVO GENERAL:

Purificar y caracterizar las proteasas digestivas del abulón azul (*Haliotis fulgens*).

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Diseñar las técnicas apropiadas para la extracción, purificación y caracterización de las proteasas de las vísceras del abulón azul.
- Estimar la concentración de cada proteasa en las vísceras del abulón.
- Evaluar la sensibilidad de las proteasas encontradas con diferentes inhibidores.
- Evaluar la especificidad de las proteasas con diferentes sustratos.
- Determinar la estructura secundaria y la composición de aminoácidos de las proteasas encontradas.
- Conocer las enzimas digestivas presentes en el abulón para entender a fondo su digestión y elegir las dietas adecuadas.

3.0 METODOLOGIA

3.1 Descripción de la zona de colecta

Los abulones (*Haliotis fulgens*) fueron colectados por la Cooperativa de Bahía Magdalena Baja California Sur, (Fig. 8) Dicha colecta se realizó en la Isla Magdalena.

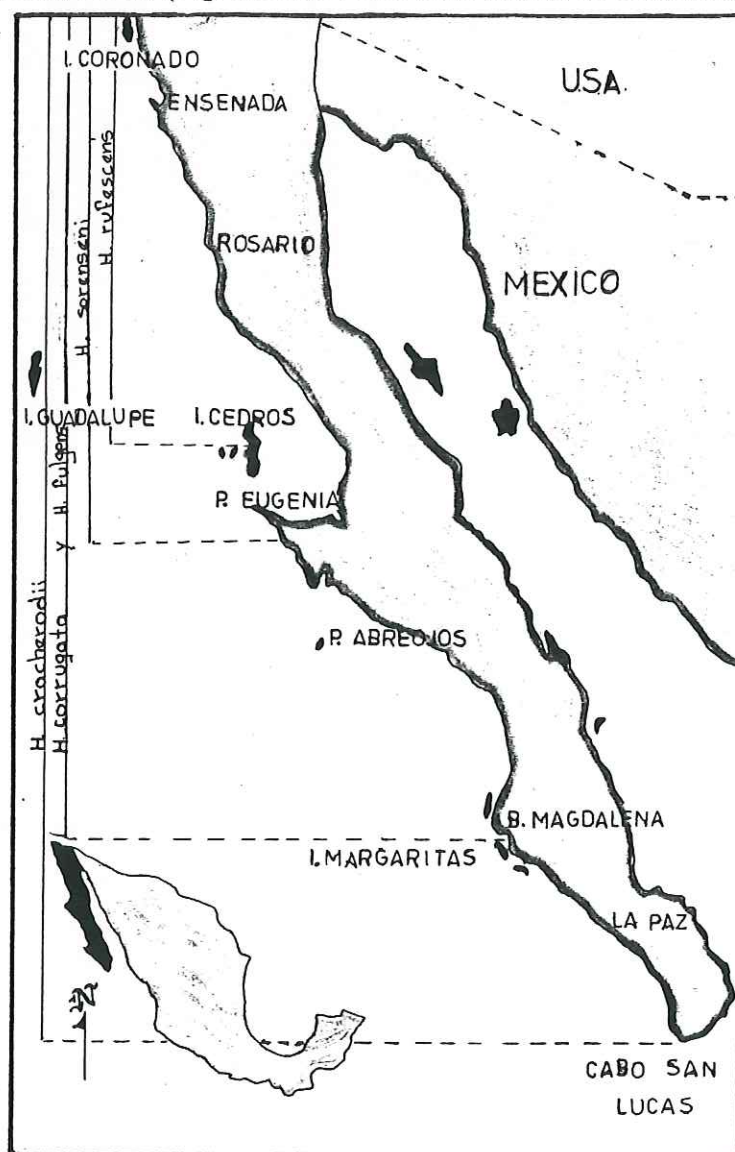


Figura 8. Zona de Colecta. Se puede observar la distribución de las diferentes especies de abulón en México.

3.2 Colecta y almacenamiento

Se colectaron las vísceras de 30 abulones de la especie *Haliotis fulgens* en la Cooperativa de Bahía Magdalena, Baja California Sur (Fig. 8). Estas se congelaron a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su traslado al Instituto de Química de la UNAM, donde se mantuvieron a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un congelador Forma Scientific Modelo 8419, para su posterior análisis.

3.3 Extracción de proteínas

Todos los pasos descritos a partir de esta sección fueron realizados a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evitar desnaturalización y autohidrólisis. Los estómagos de los abulones se molieron en un homogenizador de tejidos Bauknecht VDE 0530/66 durante 7 minutos con intervalos de 1 min por cada 30 segundos de molienda (para evitar el calentamiento que pudiera desnaturalizar las proteínas) en un amortiguador Tris-HCl 0.05M, 0.05M de NaCl y pH 8. El homogenado se centrifugó a $30,100\text{ x g}$ durante 30 min. en una centrífuga Beckman Modelo J2-21, esto con el fin de eliminar los residuos sólidos. Posteriormente el sobrenadante se filtró para eliminar los lípidos que se encontraban en la superficie.

Con el sobrenadante filtrado se realizó una precipitación fraccionada con sulfato de amonio sólido. Primero se llevó a 30% de saturación (164 g/l), se dejó reposar por 4 hrs. y se separó el precipitado por centrifugación a $31,100\text{ x g}$ durante 30 min. el cual se eliminó. Posteriormente, el sobrenadante se llevó de 30-60% de saturación (181 g/l), se dejó reposar por 12 hrs. y se separó el precipitado por centrifugación bajo las condiciones ya descritas. Este último precipitado se resuspendió en el volumen mínimo de amortiguador. Finalmente se dializó por 8 hrs contra agua destilada con el fin de eliminar el sulfato de amonio. Las membranas utilizadas fueron Spectrapor con una retención de pesos moleculares de 6000-8000 daltones, las cuales se colocaron en un aparato de diálisis continua (Arreguín, 1968).

3.4 Pruebas preliminares

3.4.1 Determinación de actividad proteolítica.

La actividad fue determinada por dos métodos debido a que la caseína precipita a valores de pH ácidos, por lo que para poder construir la curva de pH contra actividad se empleó el método de Rinderknecht et al., (1968), mientras que para el seguimiento de la purificación se utilizó el método de Kunitz (1947).

Métodos de Rinderknecht et al., (1968).

Es un método colorimétrico para la determinación de actividad proteolítica y está basado en el uso de un sustrato insoluble que consiste de polvo de cuero (Hide Powder Azure-SIGMA), al cual se le ha unido covalentemente el azul brillante de Remazol. La actividad es proporcional a la liberación del colorante, el cual se mide a una longitud de onda de 600 nm. En este método a 1 mg de cuero-azure en 1.9 ml de amortiguador Tris-HCl 0.05M, pH 8 se le adicionan 100 μ l de la solución conteniendo la proteasa. La mezcla se incuba a 37 °C durante 4 horas, se centrifuga y mide absorbencia a 600 nm. Como testigo se utiliza la misma solución de cuero-azure a la cual se le agregan 100 μ l de agua destilada en lugar de muestra.

Método de Kunitz (1947).

En este método, a 1.9 ml de una solución de caseína al 1% en amortiguador de fosfatos 0.05M a pH 7.0 se adicionan 100 μ l de la muestra y se incuba a 37 °C durante 6 horas. Inmediatamente se agregan 3ml de ácido tricloroacético (ATC) al 5% para parar la reacción, se centrifuga y determina absorbencia a 280 nm. Como testigo se utiliza la misma solución de caseína a la cual se le agrega la muestra después del ATC. La absorbencia a 280 nm es proporcional a los aminoácidos aromáticos liberados y representa una medida de la actividad

enzimática. Una unidad de actividad se define como el incremento de una unidad de absorción, en un minuto a 37 °C y pH de 7.

3.4.2. Cuantificación de proteínas

Se utilizó el método de Smith et al., (1985), el cual emplea el reactivo BCA* Protein Assay Reagent, que es muy sensible en la determinación espectrofotométrica de la concentración de proteína en soluciones acuosas. Este sistema de reactivos combina la bien conocida reacción de proteínas con Cu^{+2} en un medio alcalino (produciendo Cu^{+1}), con un reactivo altamente selectivo y sensible de detección para Cu^{+1} llamado ácido bicinconínico. Este reactivo es estable y compatible con detergentes iónicos y no iónicos. Elimina problemas del método Lowry como son la mezcla de los reactivos (el reactivo de Folin se debe mezclar inmediatamente) y el tiempo de adición de los mismos. El color púrpura del producto de la reacción es formado por la interacción de dos moléculas de BCA con un ion cuproso (Cu^{+1}), este es soluble en agua y exhibe una fuerte absorbencia a 562 nm.

El reactivo comercial (Pierce) consta del reactivo A (carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, el reactivo de detección BCA y tartrato de sodio en 0.2N de NaOH) y el reactivo B (solución de sulfato de cobre al 4%). El método consiste en adicionar a 2ml del reactivo C (50 partes del reactivo A con 1 parte del B) 0.1 ml de de la solución conteniendo 20 - 1200 μg de proteína, después se incuba a 37 °C durante 30 minutos. Finalmente se lee la absorbencia a 562 nm contra un blanco de reactivos.

La cantidad de proteína contenida en la muestra se determina interpolando el dato de absorbencia en una curva tipo elaborada con estándares de albúmina de bovino a diferentes concentraciones.

3.4.3. Actividad con diferentes valores de pH, temperatura y concentración de NaCl.

Se realizaron pruebas preliminares con el extracto obtenido en la precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación, con el fin de establecer el pH, temperatura y concentración de NaCl óptimos para trabajar en base a las condiciones óptimas de actividad citadas en 3.4.1. Los amortiguadores empleados para las pruebas con diferentes valores de pH se muestran en la Tabla II, los pH probados fueron de 2-10, con intervalos de 0.5 unidades.

TABLA II. Intervalo de pH de diferentes amortiguadores (Tomado de Harris, 1989)

AMORTIGUADOR	INTERVALO DE pH AL QUE TRABAJA
Na ₂ HPO ₄ -Acido cítrico	2.6 - 7.6
Glicina-HCl	2.2 - 3.6
Tris-HCl	7.0 - 9.0
Glicina-NaOH	8.6 - 10.6
Na ₂ HPO ₄ -NaOH	11.0 - 11.9

Las temperaturas probadas fueron de -30 a 75°C, mientras que las concentraciones de NaCl en el amortiguador variaron de 0 a 2M.

3.5 Purificación de las enzimas

3.5.1. Cromatografía de intercambio aniónico

El extracto dializado y que contenía la actividad proteolítica, correspondiente al precipitado de 30-60% de sulfato de amonio, se aplicó sobre una columna de intercambio

aniónico de DEAE-Sepharosa con dimensiones de 57 X 1.6 cm. La cromatografía se llevó a cabo a 4°C en un sistema LKB que consiste de: Un colector Ultrorac II, una bomba peristáltica Varioperpex, un monitor de absorbencia con filtro para 280 nm modelo Uvicord S y un registrador Pharmacia REC 2. La columna se equilibró con un amortiguador Tris-HCl 0.05M, 0.05M de NaCl y pH 8. La muestra se eluyó con un gradiente de NaCl de 0 a 1M en el mismo amortiguador a una velocidad de flujo de 9.5 ml/hr, colectándose fracciones de 3 ml.

3.5.2. Cromatografía de alta resolución (HPLC)

Para la última etapa de purificación se empleó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC-LKB). Las fracciones A, B, F, G, H y J separadas por la columna de DEAE-sepharosa se aplicaron a una columna TSK-DEAE-5PW (7.5 x 0.75 cm) equilibrada con amortiguador Tris-HCl 0.05M, 0.05M de NaCl, pH 8. Para la elución se usó un gradiente de NaCl de 0 a 1M. La velocidad de flujo se ajustó a 0.5 ml/min. La fracciones fueron detectadas en un detector espectral 190-370 nm.

3.5.3. Concentración de las muestras

Para concentrar las muestras se utilizó polietilenglicol 8,000 como agente desecante. Las muestras se colocaron en membranas de diálisis Spectrapor con una retención de pesos moleculares de 3500 daltones.

3.6 Caracterización de las enzimas

3.6.1. Determinación de actividad proteolítica

Para la determinación de la actividad proteolítica de las fracciones purificadas (A, B, F,

G, H y J) se empleó el método de Kunitz (1947) según se describió en 3.41. La actividad específica sobre caseína se calculó mediante la siguiente relación:

$$\text{Actividad específica} = \frac{A_{280}}{t_{\text{min}} (\text{mg de proteína})}$$

Una unidad de actividad corresponde a un cambio de 1 unidad de absorbencia por minuto por mg de proteína en las condiciones descritas para la actividad con caseína.

3.6.2. Determinación del punto isoelectrico

Se utilizaron microplacas (0.35 x 0.43 x 50mm) con gradiente de pH de 3-9 en un Phast System de Pharmacia. Para obtener la curva patrón se emplearon patrones con puntos isoelectricos conocidos de 3-9 (Pharmacia electrophoresis calibration kit). La absorción y posición de las bandas se leyó en un densitómetro laser LKB 2202 Ultro Scan.

3.6.3. Peso molecular

El peso molecular de las proteasas purificadas se determinó por electroforesis en microgeles homogéneos de SDS-poliacrilamida al 20% (0.45 X 43 X 50mm) a 250 V, 10mA y 15°C. Para obtener la curva de calibración se emplearon patrones con pesos moleculares conocidos desde 14,400 hasta 94,000 daltones (Pharmacia electrophoresis calibration kit). El procedimiento para fijar, teñir y desteñir fué el reportado por Neuhoff et al. (1985). La absorción y posición de las bandas se leyó en un densitómetro laser LKB 2202 Ultro Scan.

3.6.4. Determinación de actividad sobre diferentes sustratos

Se probó la actividad de las proteasas purificadas del tracto digestivo de *Haliotis fulgens* sobre diferentes sustratos sintéticos: N- α -benzoil-L-arginina etil éster (BAEE), Hipuril-L-fenilalanina (HPLA), N-CBZ-L-tirosina p-nitrofenil éster, alfa- N- α -benzoil-DL-arginina p-nitroanilida (BAPNA), N- α -p-tosil-L-arginina metil éster (TAME) y N-acetil-L-tirosina etil éster (ATEE). Todas las determinaciones se realizaron en un espectrofotómetro Varian modelo CARY 1/3 de doble canal, equipado con chaquetas térmicas para las celdas.

La actividad sobre BAEE se determinó por el método descrito por Whitaker y Bender (1965) y Bender et al., (1964). Las dos celdas contenían 0.9 ml de de BAEE 10 mM en amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7.5, se incubaron por 10 minutos a 37 °C y se les adicionó al blanco 0.1 ml de amortiguador y 0.1 ml de la solución de enzimas a la otra celda. Se mezcló y el decremento en absorbencia a 285 nm fué monitoreado por 10 min.

Con HPLA se utilizó el método descrito por Folk y Schirmer (1963). Se colocaron en ambas celdas 980 μ l de sustrato (1 mM de HPLA en 0.5M de NaCl en un amortiguador Tris-HCl 0.05 M pH 7.0). Se incubaron por 10 minutos a 37 °C. Para iniciar la reacción se adicionaron 20 μ l de agua destilada al testigo y 20 μ l de enzima a la otra celda. Se mezclaron y se midió el aumento en la absorbencia a 254 nm durante 10 min.

Con BAPNA el método empleado fue el de Fink, Schiessler, Arnhold y Fritz (1972). En este caso las celdas contenían 645 μ l de amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 7 y 350 μ l de sustrato 6.0 mM de BAPNA en agua destilada. Después de incubar a 37 °C por 10 minutos, se añadió 50 μ l de agua destilada a la celda testigo y 50 μ l de enzima a la otra celda y se midió el cambio en absorbencia a 405 nm.

Con N- α - CBZ-tirosina-p-Nitrofenil éster, el método que se utilizó fué el de Silverstein (1974). Las celdas contenían 975 μ l de amortiguador de acetatos 10.0 mM, pH 4.6 y 25 μ l de sustrato 15 mM el cual estaba disuelto en una mezcla de acetonitrilo-agua (8:2). Después de

incubar 10 minutos a 37 °C, se le adicionó al testigo 25 µl de de la mezcla acetonitrilo-agua y en la otra celda 25 µl de enzima. En este caso se midió el aumento en la absorbencia a 340 nm durante 10 minutos.

Para los experimentos de actividad con ATEE, se utilizó el método reportado por Chen et al., (1988). Se adicionaron 2.8 ml de ATEE (1mM en un amortiguador de fosfatos 50 mM y pH 7.0) a las dos celdas y se incubaron por 10 minutos a 37 °C. Posteriormente se adicionó a la celda testigo 0.2 ml de agua y a la otra celda 0.2 ml de la solución de enzimas. El decremento en absorbencia se midió a una longitud de onda de 237 nm durante 10 minutos.

La actividad sobre TAME se determinó por el método descrito por Walsh (1970). A 2.6 ml de Tris-HCL 46 mM, pH 8 y 11.5 mM de CaCl₂, se le adicionaron 0.3 ml de TAME 10 mM y se incubó por 10 minutos a 37 °C. Posteriormente se agregaron 100 µl de agua destilada a la celda testigo y 100 µl de la solución de enzima a la otra celda. La absorbencia se midió por 10 minutos a 247 nm.

3.6.5. Efecto de inhibidores

Se probaron 7 inhibidores: N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK) 1.0 mM, inhibidor de tripsina tipo II-S (1mg/ml), inhibidor de tripsina tipo I-S (1mg/ml), acetato fenil mercúrico 0.1mM, EDTA 1, 5 y 10 mM; 1,10 fenantrolina 0.1mM, fluoruro de fenil metil sulfonilo 10mM, aprotinina (1mg/ml) y urea 6M. Todas las determinaciones se realizaron utilizando caseína como sustrato. En este método, a 1.9 ml de una solución de caseína al 1% en amortiguador de fosfatos 0.05M a pH 7.0 se adicionan 100 µl de la muestra conteniendo el inhibidor a la concentración señalada en cada caso y se incuba a 37°C durante 6 horas. Inmediatamente después se agregan 3ml de ácido tricloroacético (ATC) al 5% para parar la reacción, se centrifuga y determina absorbencia a 280 nm. Como testigo se utiliza la misma solución de caseína a la cual se le agrega la muestra sin el inhibidor.

3.6.6. Coeficiente de extinción

Una muestra de cada proteasa se dializó perfectamente contra agua destilada y se le determinó el contenido de proteína por el método señalado en 3.4.2. Paralelamente se le midió A_{280} nm. Para calcular el coeficiente de extinción se ocupó la relación:

$$E^{1\%}_{280} = A_{280} / [C] [l]$$

Donde:

$E^{1\%}_{280}$ = Coeficiente de extinción a 280 nm

C = Concentración de proteína en mg/ml

l = longitud del paso de luz en cm.

3.6.7. Dicroísmo circular.

La estructura secundaria de una proteína se puede determinar por sus espectros de dicroísmo circular (CD). Existen diversos métodos para el análisis de dichos espectros. En este caso, el método empleado utiliza una matriz simple y se basa en la construcción del inverso de los valores individuales de la descomposición de un grupo de espectros de CD correspondientes a proteínas cuya estructura secundaria se conoce por cristalografía de rayos X. El espectro correspondiente a la estructura secundaria individual análoga al espectro de CD de polipéptidos sintéticos es generado a partir de 5 eigenvectores de CD (Compton y Curtis, 1986).

Los espectros de dicroísmo circular (CD) se realizaron a 25 °C en un espectropolarímetro JASCO J-500A, el cual se calibró con ácido (+)-10-camforsulfónico (Cassim y Young, 1969). Los experimentos se realizaron con soluciones de 0.12 a 0.14 mg/ml en una celda de 1mm para la región del ultravioleta (UV) lejano (183-260nm). Las muestras usadas para los espectros de CD fueron la A, F, G, H, y J, las cuales se dializaron contra un amortiguador de fosfatos 0.01 M y pH 7.8.

La concentración de las muestras se determinaron por absorción de luz utilizando el coeficiente de extinción ($1\%A_{1cm, 280}$). La elipticidad por residuo medio $[\theta]$, se calculó utilizando una masa molecular de 110 g mol^{-1} por residuo, de acuerdo con la relación:

$$[\theta] = 100 \cdot \theta / C \cdot l \text{ (grados cm}^2\text{/decimol)}$$

Donde:

$[\theta]$ = elipticidad molar por residuo.

θ = elipticidad

C = concentración molar de residuos.

l = longitud de recorrido óptico en cm.

3.6.8. Determinación de la composición de aminoácidos

Se determinó por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un equipo "System Gold" de BECKMAN, el cual consta de un módulo programable de solventes 126, detector UV-visible 168, un inyector Rheodyne 7725i una columna ODS-DABS (dp 5m y 4.6 mm x 25 cm). Las muestras se hidrolizaron con HCl 6N a 110°C por 24 hrs. en tubos de vidrio sellados (Slocum y Arrizon-Lopez, 1994). Posteriormente se neutralizaron con hidróxido de sodio 6N y se liofilizaron (en un liofilizador EF4, Modulyo Freeze Dryer, Edwards) hasta sequedad.

A las muestras secas se les realizó la dabsilación con los reactivos de Beckman (Dabs-Amino Acid Kit, Fullerton, CA, USA.) para análisis de aminoácidos por cromatografía de fase reversa. Las muestras secas (2-5 nmol de proteína) se disolvieron en 20 μl de amortiguador $\text{NaHCO}_3\text{-NaOH}$, pH 8.3. Se adicionaron 40 μl de la solución de cloruro de dabsilo (40 μg en 40 μl de acetonitrilo), se calentó a 70°C por 12 minutos con agitación. Después de la derivatización, las muestras fueron diluidas con 400 μl de etanol-agua (1:1) y 8 % de la muestra

diluida fue inyectada al HPLC para su análisis. Las condiciones cromatográficas que se aplicaron fueron las siguientes:

Solución A (pH final 6.5). A 100ml de citrato de sodio 0.11M (pH 6.51) se le agregaron 860 ml de agua grado HPLC y 40 ml de N,N-dimetilformamida (DMF).

Solución B. A 300 ml de la solución A, se le adicionaron 672 ml de acetonitrilo y 28 ml de DMF. La velocidad de flujo fué de 1.4 ml/min. y se monitoreó a una longitud de onda de 436 nm. Las condiciones del gradiente fueron las siguientes:

Tiempo (min)	Solvente		Duración (min.)
	A(%)	B(%)	
Inicio	71	29	
0	49	51	12
12	14	86	5
20	0	100	1
27	71	29	0.25
35			fin.

4.0 RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Pruebas preliminares de estabilidad

4.1.1. Actividad a diferentes valores de pH, temperatura y concentración de NaCl.

Se determinó la estabilidad del extracto crudo en base a la actividad proteolítica que presentaba a diferentes valores de pH, temperatura y concentración de NaCl. Los resultados se muestran en las figuras 9, 10 y 11 respectivamente. En la figura 9 se observa que a un pH de 8 la actividad es máxima y disminuye arriba de un pH de 10 y abajo de 2. Asimismo, a un pH entre 2 y 4.5 hay una fuerte precipitación de proteínas, lo cual se ve reflejado en la actividad tan baja o casi nula que se observa con estos valores. Esto se debe a que los puntos isoeléctricos de la mayoría de las enzimas proteolíticas presentes en el extracto tienen valores muy cercanos a 4, como se comprobó después de purificar cada enzima. Sin embargo, la presencia de actividad, aunque sea mínima, indica que también hay proteasas cuyos puntos isoeléctricos no están en este intervalo de pH aunque su aportación es menor a la actividad global del extracto. También se puede observar en esta gráfica que no hay una tendencia continua a aumentar o disminuir la actividad conforme aumenta o disminuye el pH, sino que hay varios "picos", lo cual sugiere la existencia de diferentes tipos de enzimas con actividades proteolíticas óptimas en diferentes intervalos de pH.

En la figura 10 se puede observar el perfil de actividad a diferentes temperaturas, siendo el máximo a 60 °C y el mínimo a 4 °C . Asimismo, se observa que a 75 °C ya no hay actividad y a -30 °C esta es muy poca, cabe señalar el hecho de que a una temperatura de -20 °C se observó un incremento en la actividad proteolítica esto puede indicar la presencia de algún tipo de enzima extremófila que se activa a bajas temperaturas. como en el caso de enzimas tipo tripsina aisladas de organismos poiquiloterms (*Gadus morhua*), las cuales mostraron adaptaciones evolutivas en medios ambientes con temperaturas muy bajas (Asgeirsson et al.,

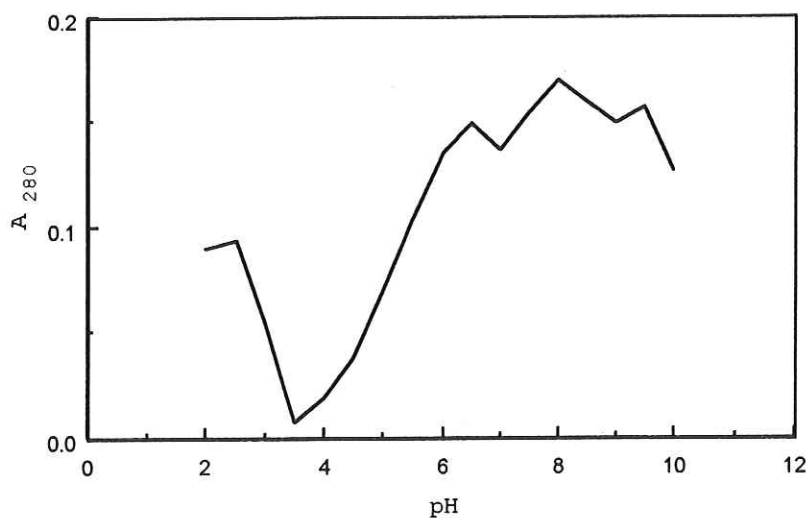


Figura 9. Actividad proteolítica sobre cuero-azure, del extracto obtenido de la precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación, a diferentes valores de pH.

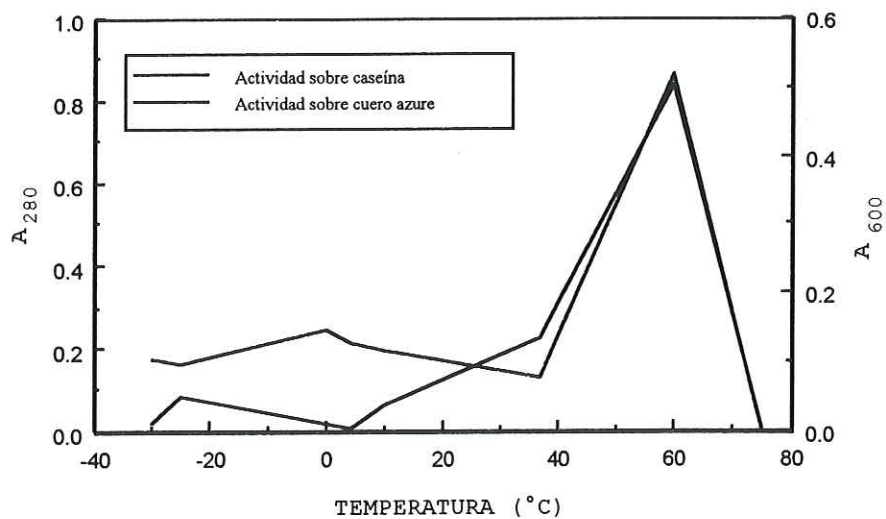


Figura 10. Actividad proteolítica del extracto obtenido de la precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación a diferentes temperaturas.

1989), dichas adaptaciones se ven reflejadas en diferencias en su contenido de aminoácidos, con respecto a enzimas de organismos endotermos. Finalmente, cuando se analizó el efecto de la concentración de NaCl en la actividad proteolítica (Fig. 11), se observó que hay una gran variedad de "picos" en donde se puede apreciar un máximo de actividad sobre caseína a una concentración de NaCl de 0.85M, sin embargo hay otro de mucha actividad a una concentración de 0.55M. Este perfil de actividad nos sugiere la presencia de diversos tipos de enzimas proteolíticas con diferentes óptimos de concentración de sal, es importante señalar que a partir de una concentración de 0.65M empieza a haber precipitación de algunas proteínas, lo cual nos da un indicio de la hidrofobicidad de algunas de estas enzimas que precipitan con bajas concentraciones de NaCl.

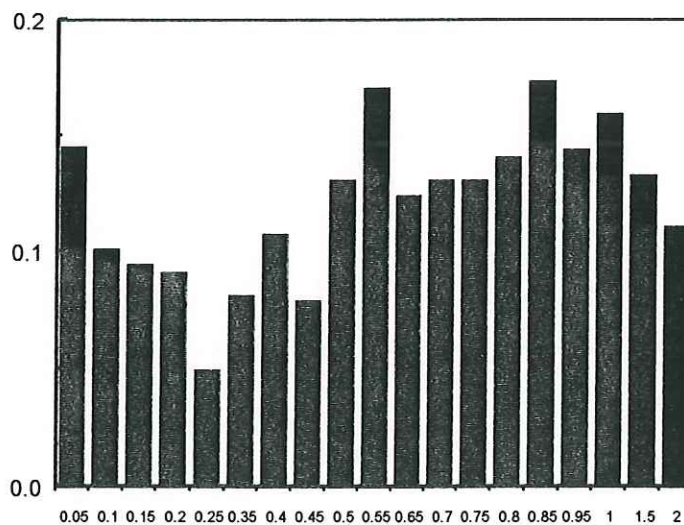


Figura 11. Actividad proteolítica sobre cuero-azure, del extracto obtenido de la precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación, con diferentes concentraciones de NaCl.

4.1.2. Actividad sobre diferentes sustratos.

En la Tabla III se puede apreciar que el extracto presenta actividad proteolítica sobre sustratos proteicos como son la caseína y el cuero-azure y sobre sustratos sintéticos como son, BAEE y BAPNA (específicos para proteasas serínicas), HHPA (específico para carboxipeptidasa A), TAME (para enzimas de tipo tripsina), N- α -CBZ-tirosina-p-nitrofenil éster y ATEE (específico para quimotripsina). Esto corrobora la existencia de una gran variedad de enzimas proteolíticas presentes en el tracto digestivo del abulón azul, las que pueden pertenecer a diferentes familias de enzima proteolíticas, o bien puede tratarse de proteasas no específicas que actúan sobre diversos sustratos. Esta poca especificidad se ha observado también en una metaloproteasa aislada de la esponja marina (*Sphaciospongia vesparia*), la cual tiene actividad sobre diferentes sustratos (Arreguín et al., 1993). Esta baja especificidad puede estar relacionada con el poco desarrollo evolutivo que presentan este tipo de organismos, ya que tanto la esponja como el abulón son organismos muy primitivos.

TABLA III. Actividad hidrolítica del extracto obtenido de la precipitación con sulfato de amonio al 60% sobre diferentes sustratos.

Sustrato	Concentración	Actividad
Caseína	1%	+
Cuero azure	0.5mg/ml	+
BAEE ¹	0.37mM	+
BAPNA ²	2.1mM	+
HPLA ³	1.0mM	+
TAME ⁴	1.0mM	+
N- α -CBZ-lisina-p-nitrofenil éster ⁵	0.37mM	+
ATEE ⁶	1.0mM	+

¹BAEE: N- α - benzoil-L-arginina etil éster

² BAPNA: N- α - benzoil-DL-arginina p-nitroanilida

³ HPLA: hipuril-L-fenilalanina

⁴ TAME:p-toluenosulfonil-L-arginina metil éster

⁵ N- α -CBZ-lisina-p-nitrofenil éster:

⁶ ATEE: N-acetil-L-tirosina etil éster

+ Indica que sí hubo actividad hidrolítica.

4.1.3. Actividad con diferentes inhibidores

Para esta prueba se utilizó el método de Rinderknecht et al., (1968). En la Tabla IV se muestran los resultados obtenidos al determinar la actividad remanente del extracto después de ponerlo en contacto con diferentes inhibidores. Se puede observar que diversos compuestos inhibieron la actividad proteolítica. Esto debido probablemente a que se trata de un extracto en el que pueden estar presentes diversos tipos de proteasas, pertenecientes a diferentes familias, con diferentes especificidades y sensibilidad a diferentes inhibidores. De esta manera, se puede pensar que en el extracto se encuentran presentes enzimas de tipo serínico, metaloproteasas y enzimas cisteínicas, es por esto que en ninguno de los casos se llegó a una inhibición total, con excepción de la urea, la que sí provocó una inhibición total, debido a que desnaturaliza a las proteínas. Cabe señalar que el EDTA fue el que causó mayor inhibición (90%) en la actividad del extracto, dicha inhibición puede ser ocasionada por la remoción de un cofactor que esté

involucrado en la catálisis enzimática, o bien, por la separación de un ión metálico esencial para la estabilización estructural de la enzima (Arreguín et al., 1993). En el caso del extracto de abulón parece ser que la remoción de un ión metálico está desestabilizando la estructura de las enzimas ya que al agregar el EDTA hay una precipitación casi total de dichas enzimas lo cual nos sugiere que el extracto debe contener una proporción mayor de enzimas que requieren algún metal, para lograr su estabilidad y ejercer su acción catalítica. Es importante señalar que se verificó el pH del medio en el que se realizó la prueba de inhibición, ya que cuando se utilizó EDTA a una concentración de 10 mM y 5 mM el pH bajó hasta un valor de 5 y 6.5 respectivamente, y la precipitación de las proteasas pudo deberse también a que el medio adquirió un pH cercano al punto isoeléctrico de las proteasas presentes en el extracto. Sin embargo, esta posibilidad fue descartada debido a que cuando se utilizó EDTA 1 mM el pH se mantuvo en 8, (ya que se trabajó con soluciones amortiguadoras que no permitieron un cambio drástico) y el efecto fue el mismo.

TABLA IV Efecto de diversos inhibidores en la actividad proteolítica sobre caseína, del extracto de la precipitación con sulfato de amonio al 60%

INHIBIDOR	CONCENTRACION	EFEECTO INHIBITORIO ¹
EDTA	10mM	+
EDTA	5mM	+
EDTA	1mM	+
1,10 fenantrolina	0.1mM	+
Acetato fenil mercúrico	0.1mM	+
Urea	6M	+
Inhibidor de tripsina II-S	1mg/ml	+
Inhibidor de tripsina I-S	1mg/ml	+
TPCK	1mM	+
Fluoruro fenil metil sulfonilo	10mM	+

+ Indica que sí hubo inhibición

4.2 Purificación

Al aplicar el extracto que presentaba actividad sobre caseína (precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación) a una columna de intercambio iónico DEAE-Sepharosa, se obtuvo el perfil de elución que se muestra en la figura 12. Se pueden apreciar 11 fracciones que se denominaron A, B, C, D, E, F, G, H I, J y K, respectivamente, todas con actividad proteolítica sobre caseína. Se seleccionaron las fracciones A, B, F, G, H y J para continuar con los pasos de purificación dado que fueron las que mostraron mayor actividad y abundancia. Este perfil varía cuando se trabajaba con organismos en estado de inanición y cuando los abulones habían comido. Cuando no han comido, se observa el mismo número de picos, pero

con diferente concentración, esta variación puede ser ocasionada porque al estar alimentándose, se producen enzimas digestivas que permiten la hidrólisis del alimento, como parte de sus procesos digestivos. Cuando no se está alimentando, no es necesaria la producción de este tipo de enzimas, por lo que su concentración se ve disminuida. El perfil aquí mostrado corresponde a abulones adultos y alimentados.

Este perfil también varía dependiendo de la temperatura del medio en que se colectaron los abulones, aún cuando se trate de organismos de la misma especie, de esta manera abulones colectados en zonas más frías presentan actividades específicas y concentraciones diferentes, esto debido a que se trata de organismos poiquiloterms, es decir, su temperatura corporal depende de la temperatura del medio y a su vez la actividad de las enzimas depende de la temperatura. Debido a esto, a una cierta temperatura pueden estar activas un tipo de enzimas y otras no, o bien estar activas pero con actividades muy bajas. Los abulones analizados en este trabajo corresponden a organismos colectados en una zona caliente (Isla Magdalena).

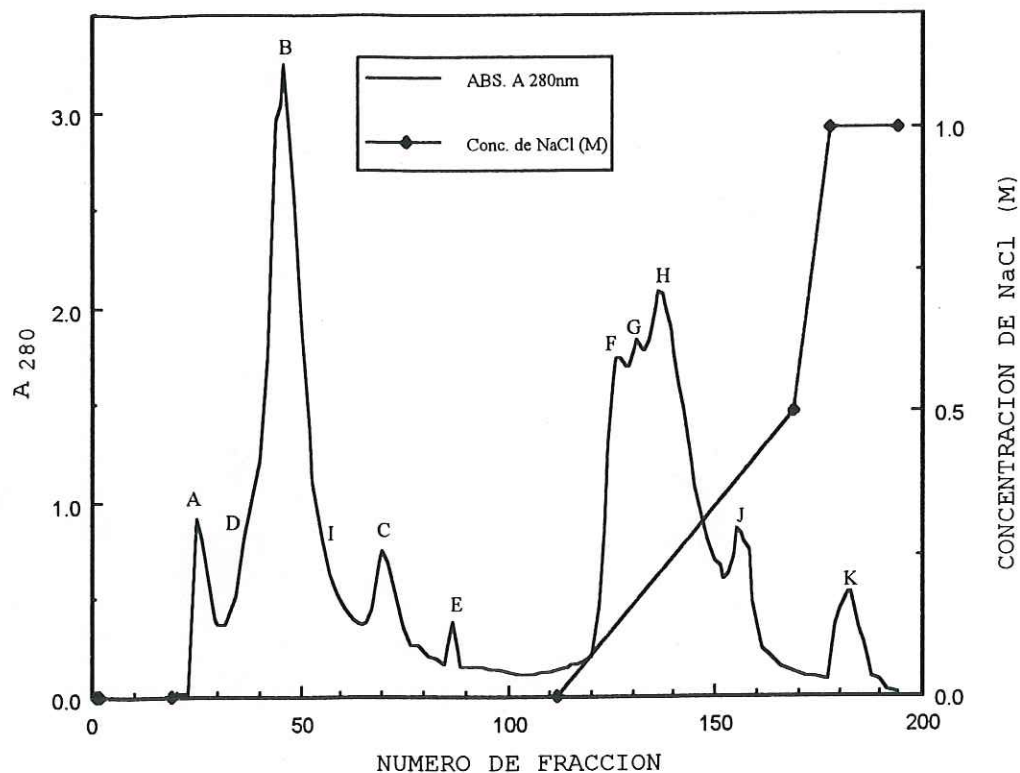
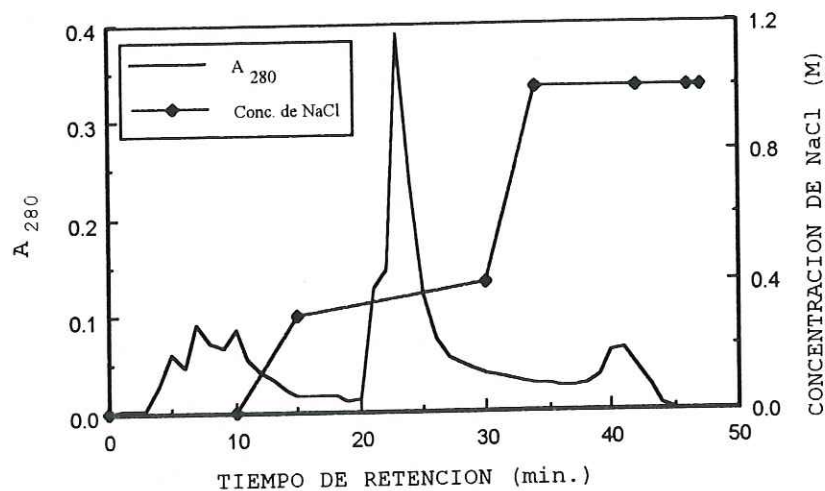


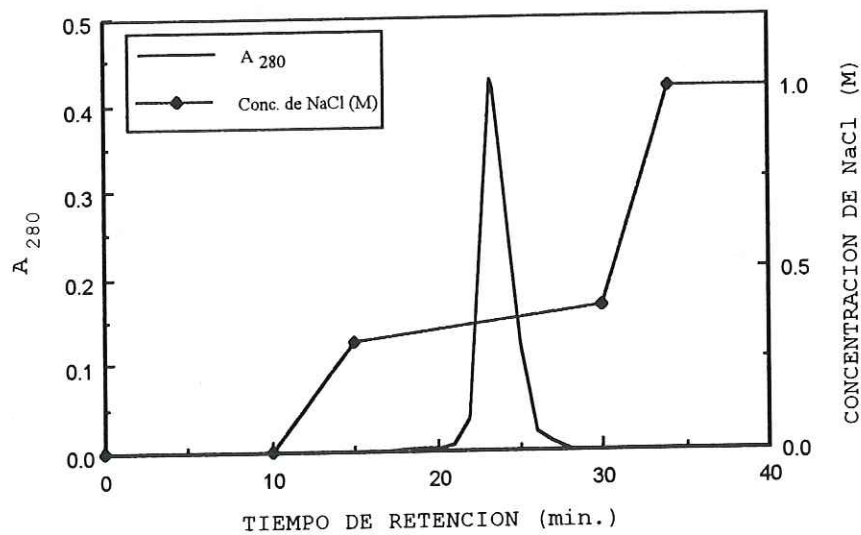
Figura 12. Cromatografía de intercambio iónico DEAE-Sepharosa. Se aplicó el extracto de la precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación. La columna se equilibró con amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 8 y se eluyó con un gradiente de NaCl de 0 a 1 M en el mismo amortiguador. La velocidad de flujo fue de 9 ml/min y se colectaron 3 ml por tubo. Todas las fracciones obtenidas presentaron actividad proteolítica sobre caseína.

Al aplicar las fracciones A, B, F, G, H y J en una columna TSK-DEAE-5PW utilizando HPLC, se obtuvieron los perfiles que se muestran en las figuras 13, 14, 15, 16, 17 y 18 respectivamente. Cada fracción requirió ser recirculada en la misma columna, bajo las mismas condiciones, con el fin de obtener una sola fracción homogénea y eliminar aquellas que no presentaron actividad proteolítica sobre caseína. Es importante señalar que las muestras no se podían concentrar demasiado antes de aplicarse al HPLC ya que se precipitaban, esto debido a que al concentrarse se agregaban. Este fenómeno de agregación es muy común cuando se

concentran enzimas proteolíticas debido, probablemente al incremento en las interacciones iónicas e hidrofóbicas intermoleculares, por lo que fue necesario hacer varias corridas con soluciones diluidas a fin de obtener una cantidad suficiente de muestra para las pruebas de caracterización. Cabe señalar que las fracciones que presentaron mayor precipitación en las condiciones en que se trabajó fueron la A y J. Además, se observó cierto grado de adsorción no específica de las muestras en las columnas, esto debido también a interacciones entre las proteínas y los azúcares de la matriz del gel de dicha columna. Esta retención también puede deberse a la forma de la proteína (globular, alargada, etc.).

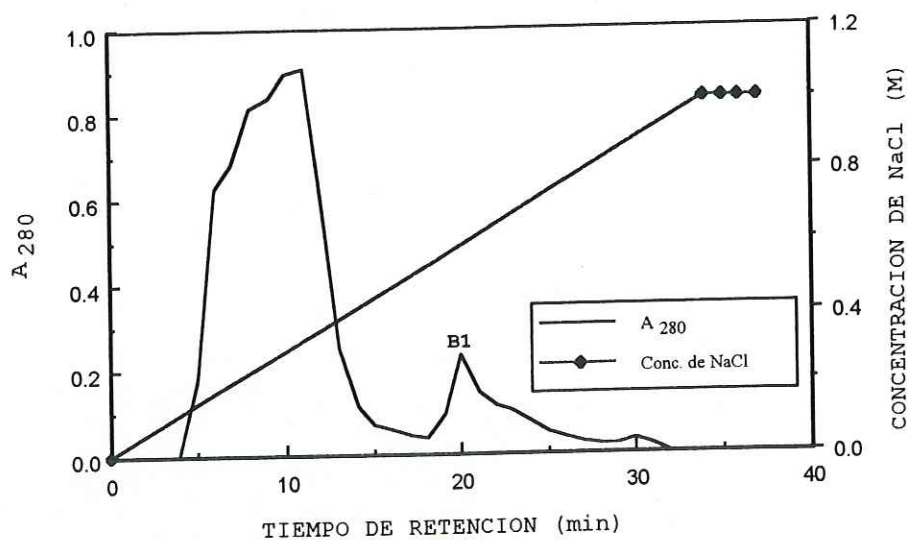


(A)

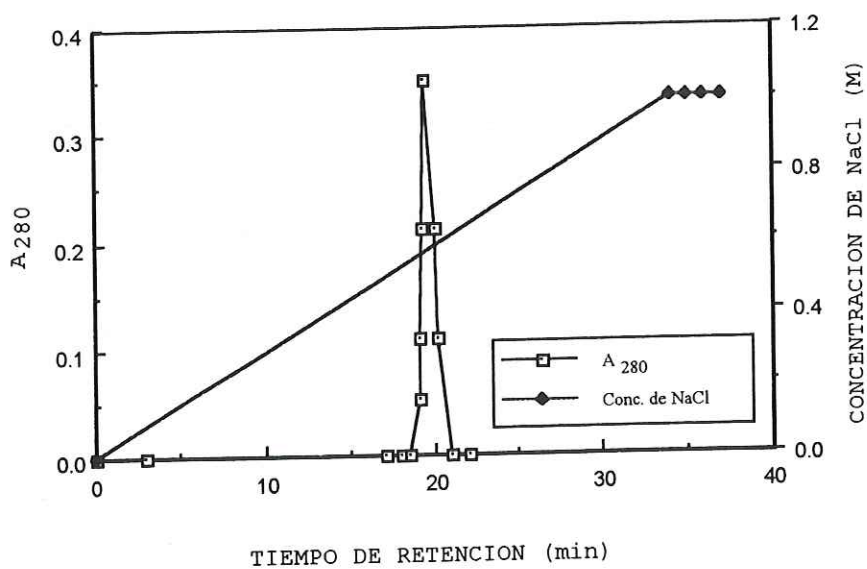


(B)

Figura 13. Cromatografía de intercambio iónico de alta resolución. Muestra A. (A) pasada por una columna TSK-DEAE 5pw. La columna (7.5 x 75mm) se equilibró con amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 8 y 0.05 M de NaCl. Para la elución se empleó un gradiente de NaCl de 0 a 1 M (B) Recirculación de la muestra A bajo las mismas condiciones.

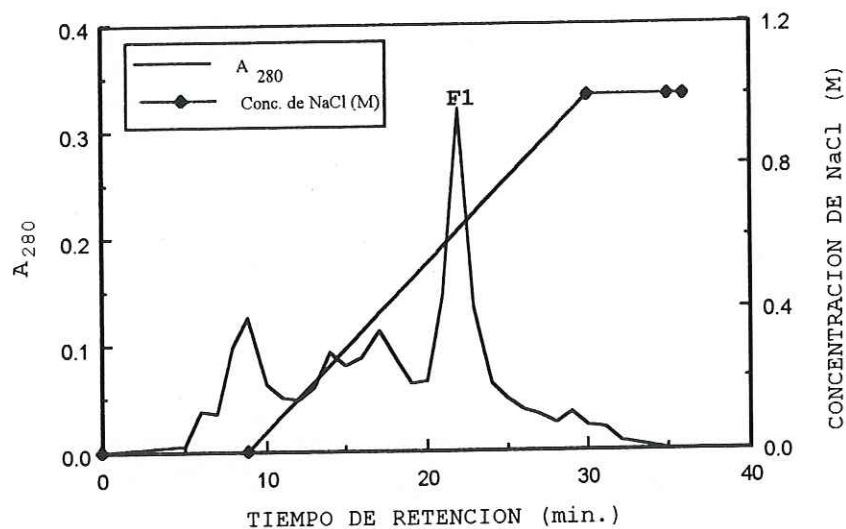


(A)

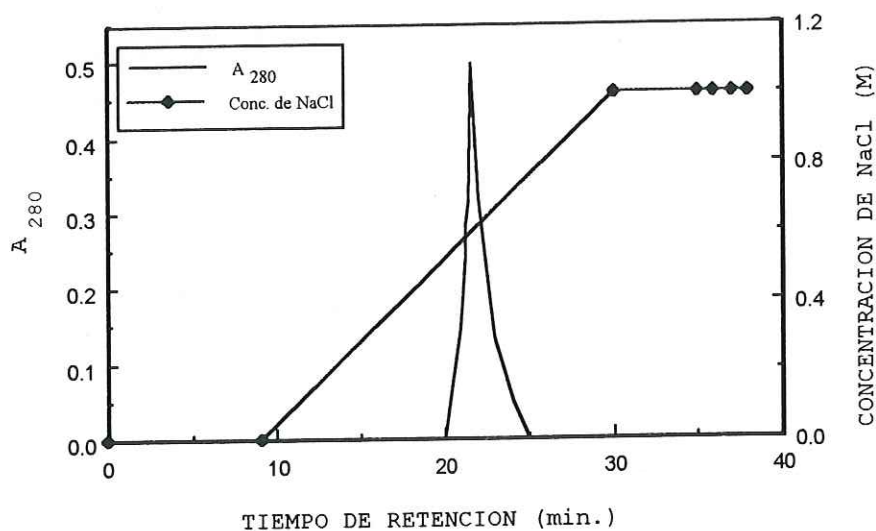


(B)

Figura 14. Cromatografía de intercambio iónico de alta resolución. Muestra B. (A) pasada por una columna TSK-DEAE 5pw. La columna (7.5 x 75mm) se equilibró con amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 8 y 0.05 M de NaCl. Para la elución se empleó un gradiente de NaCl de 0 a 1 M. (B) Recirculación de la muestra B1 (fué la que presentó actividad proteolítica sobre caseína) bajo las mismas condiciones.

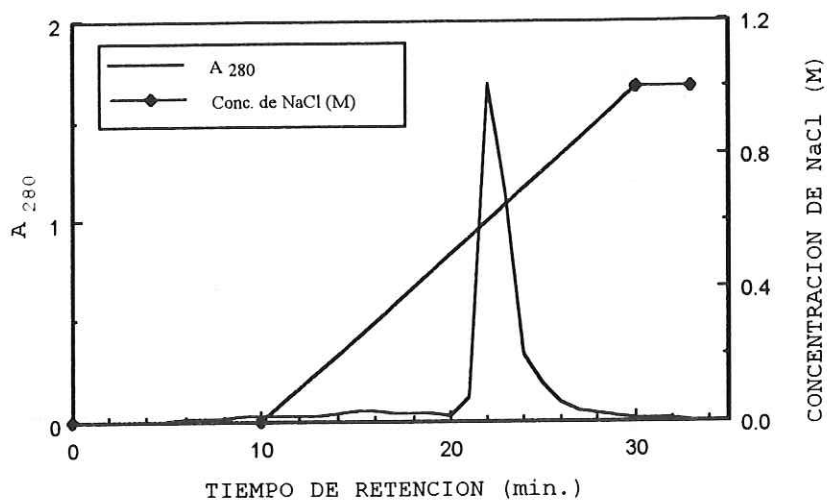


(A)

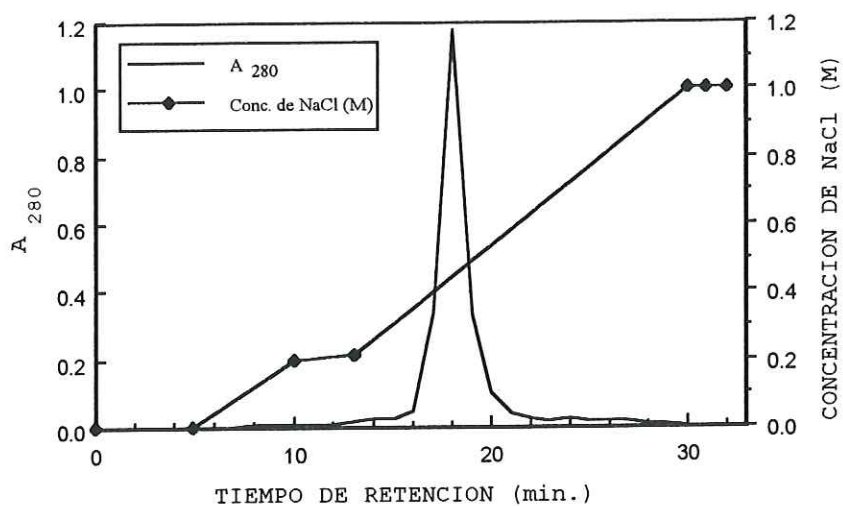


(B)

Figura 15. Cromatografía de intercambio iónico de alta resolución. Muestra F. (A) pasada por una columna TSK-DEAE 5pw. La columna (7.5 x 75mm) se equilibró con amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 8 y 0.05 M de NaCl. Para la elución se empleó un gradiente de NaCl de 0 a 1 M. (B) Recirculación de la muestra F1 (fue la que presentó actividad proteolítica sobre caseína) bajo las mismas condiciones.

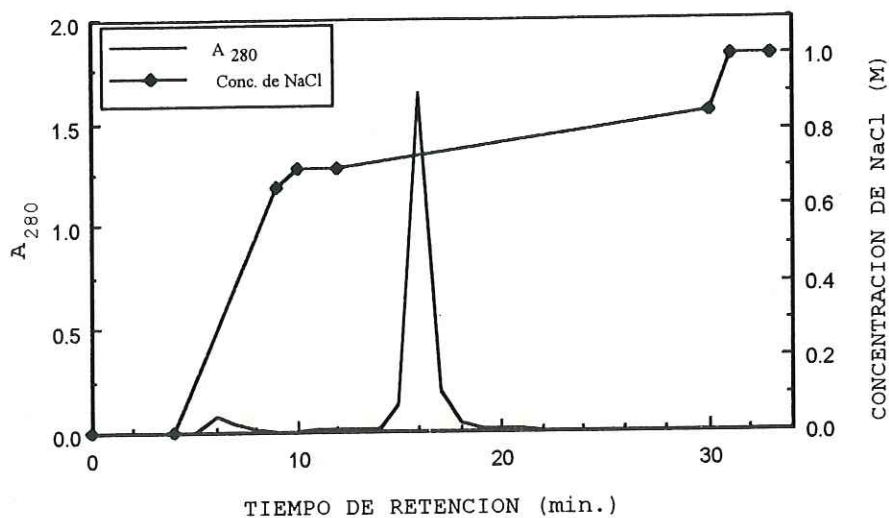


(A)

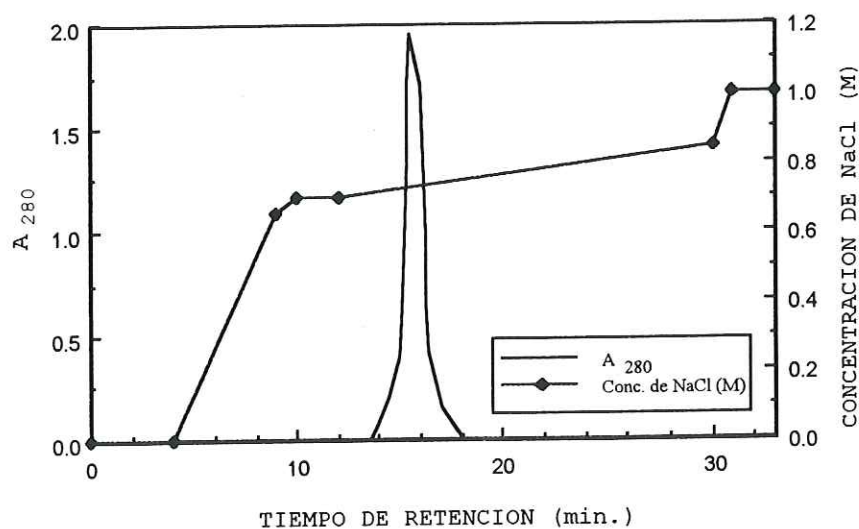


(B)

Figura 16. Cromatografía de intercambio iónico de alta resolución. Muestra G. (A) pasada por una columna TSK-DEAE 5pw. La columna (7.5 x 75mm) se equilibró con amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 8 y 0.05 M de NaCl. (B) Recirculación de la muestra G bajo las mismas condiciones.

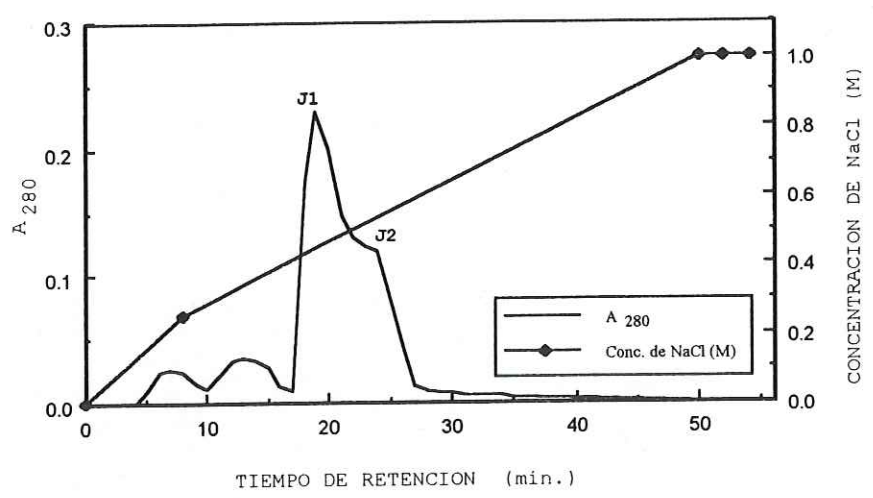


(A)

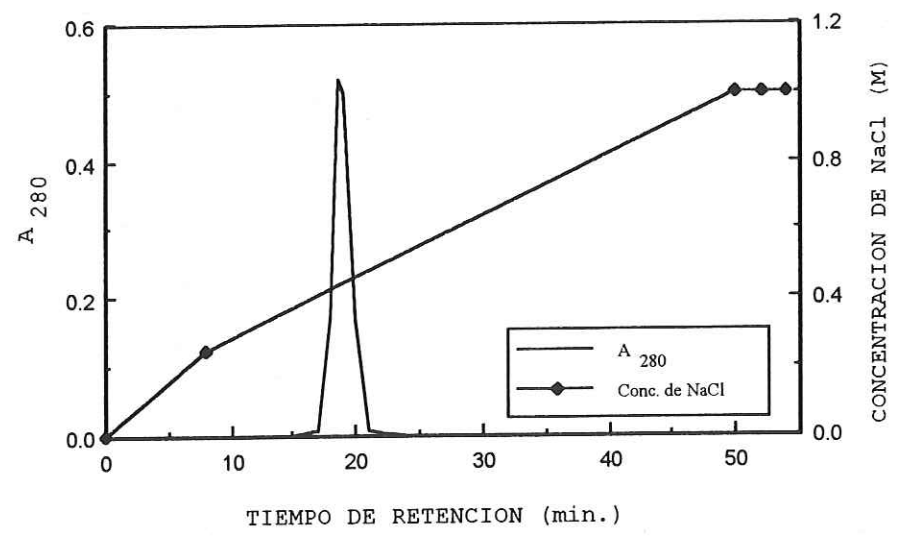


(B)

Figura 17. Cromatografía de intercambio iónico de alta resolución. Muestra H. (A) pasada por una columna TSK-DEAE 5pw. La columna (7.5 x 75mm) se equilibró con amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 8 y 0.05 M de NaCl. (B) Recirculación de la muestra H bajo las mismas condiciones.



(A)



(B)

Figura 18. Cromatografía de intercambio iónico de alta resolución. Muestra J. (A) pasada por una columna TSK-DEAE 5pw. La columna (7.5 x 75mm) se equilibró con amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 8 y 0.05 M de NaCl. (B) Recirculación de la muestra J bajo las mismas condiciones.

Las fracciones obtenidas en las recirculaciones se aplicaron en un gel de enfoque isoelectrico con gradiente de pH 3-9, con el fin de verificar su pureza (Fig. 19.). Las fracciones F, G y H mostraron dos bandas muy juntas, las que no fue posible separar lo que nos sugiere que se trata de dos formas moleculares muy semejantes, hecho que ya se ha reportado para otros organismos como es el caso de la carboxipeptidasa de Krill (Osnes y Mohr, 1985). Sin embargo, sólo se consideró la más concentrada (el colorante presentó mayor intensidad) para la realización de los estudios posteriores.

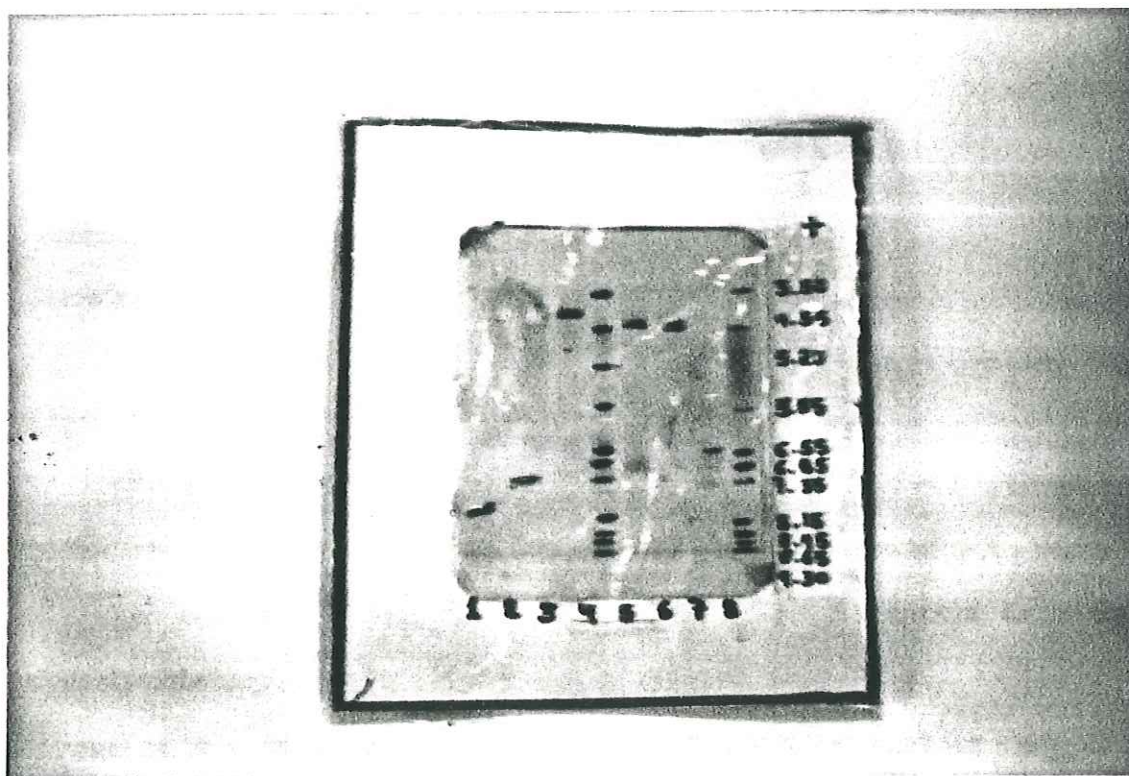


Figura 19. Enfoque isoelectrico en microgeles de poliacrilamida, con gradiente de pH 3-9. Los carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 corresponden a las fracciones A, B, F, patrones, G, H, J y patrones, respectivamente.

Durante los pasos de la purificación se observó que los mejores rendimientos se obtuvieron con las muestras F, G y H, siendo esta última la que lo tuvo mayor. Los menores rendimientos se obtuvieron con las muestras A, B y J, siendo el menor rendimiento el de la fracción A (TABLA V).

En términos generales, los rendimientos son buenos considerando que el volumen final obtenido de cada (TABLA V), se obtuvo con solo dos abulones. De hecho, se fueron trabajando de dos en dos abulones ya que si se homogenizaban más, la actividad de las celulasas era tal que reventaba las membranas de diálisis. Aún con solo dos estómagos, era necesario cambiar las membranas de diálisis cada 4 horas para evitar el rompimiento de las mismas y por ende la pérdida de la muestra.

La actividad específica se fué incrementando conforme se avanzaba en la purificación, no se llegó a superar la actividad del extracto crudo debido a que se trata de una mezcla de enzimas y la unión de todas ellas es la que da el valor tan alto del extracto crudo, comparado con cada una de las muestras individuales, las cuales presentan una actividad específica baja comparada con las de organismos terrestres.

TABLA V Purificación de proteasas digestivas del abulón azul (*H. fulgens*)

ETAPA DE PURIFICACION	ml	PROTEINA (mg)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (U/mg)	FACTOR DE PURIFICACION	RENDIMIENTO (%)
Precipitación con Sulfato de amonio	237	17663	2.5		100
DEAE-Sepharose	A=209 B=292 F=292 G=167 H=292 J=209	A=83.6 B=175.2 F=292 G=200.4 H=350.4 J=92.3	A=0.013 B=0.017 F=0.022 G=0.038 H=0.023 J=0.043	1	A=0.470 B=0.991 F=1.653 G=1.134 H=1.983 J=0.520
HPLC	A=28 B=42 F=56 G=112 H=139 J=42	A=11.2 B= 34 F= 39 G=172 H=290 J= 41	A=0.123 B=0.229 F=0.421 G=1.620 H=1.350 J=1.872	A=9.46 B=13.47 F=19.13 G=42.63 H=58.69 J=43.53	A=0.634 B=0.192 F=0.220 G=0.973 H=1.640 J=0.230

4.3 Caracterización

4.3.1. Determinación del Peso Molecular

Los resultados obtenidos en la determinación de peso molecular se muestran en la Figura 20 y Tabla VI, donde se observa que los valores para las diferentes enzimas purificadas varían entre 17,000 y 29,000 daltones. De acuerdo a Keil (1971), las enzimas tipo tripsina tienen masas moleculares en el intervalo de 20,000 a 24,000 daltones, sin embargo, enzimas de este tipo aisladas de organismos marinos vertebrados como invertebrados presentan pesos moleculares que se salen de este intervalo, lo que también sucede con las proteasas del abulón. Pesos moleculares entre 27,000-30,000 han sido reportados para tripsina de cangrejo (Muramatsu y Morita, 1981), krill (Osnes y Mohr, 1985), sardina (Murakami y Noda, 1981) y capelina (Hjelmeland y Raa, 1982), lo mismo sucede con las enzimas tipo quimotripsina y carboxipeptidasa para las cuales se han reportado pesos moleculares significativamente menores a los reportados para las de mamíferos (Chen et al., 1988).

4.3.2. Determinación del Punto isoeléctrico.

Los puntos isoeléctricos obtenidos para cada fracción se muestran en la Tabla VI. Las fracciones F, G y H mostraron dos bandas con puntos isoeléctricos muy cercanos (entre 3.7 y 4.0) como se observa en la figura 19. Esto sugiere la posibilidad de que estas enzimas estén compuestas por dos formas moleculares similares, sin embargo, este estudio se centró en la que mostró mayor concentración (Tabla V). Este tipo de situaciones se han observado en otras proteasas como el caso de la carboxipeptidasa de Krill (Osnes y Mohr, 1985), de hecho, muchas enzimas que se reportaban como una banda pura, se ha demostrado que realmente están constituidas por formas moleculares múltiples (Kramer y Whitaker, 1969). Por otro

lado, en organismos marinos se han encontrado enzimas tipo tripsina, arboxipeptidasa, quimotripsina y elastasa con puntos isoeléctricos muy ácidos, a diferencia de sus contrapartes de origen terrestre.

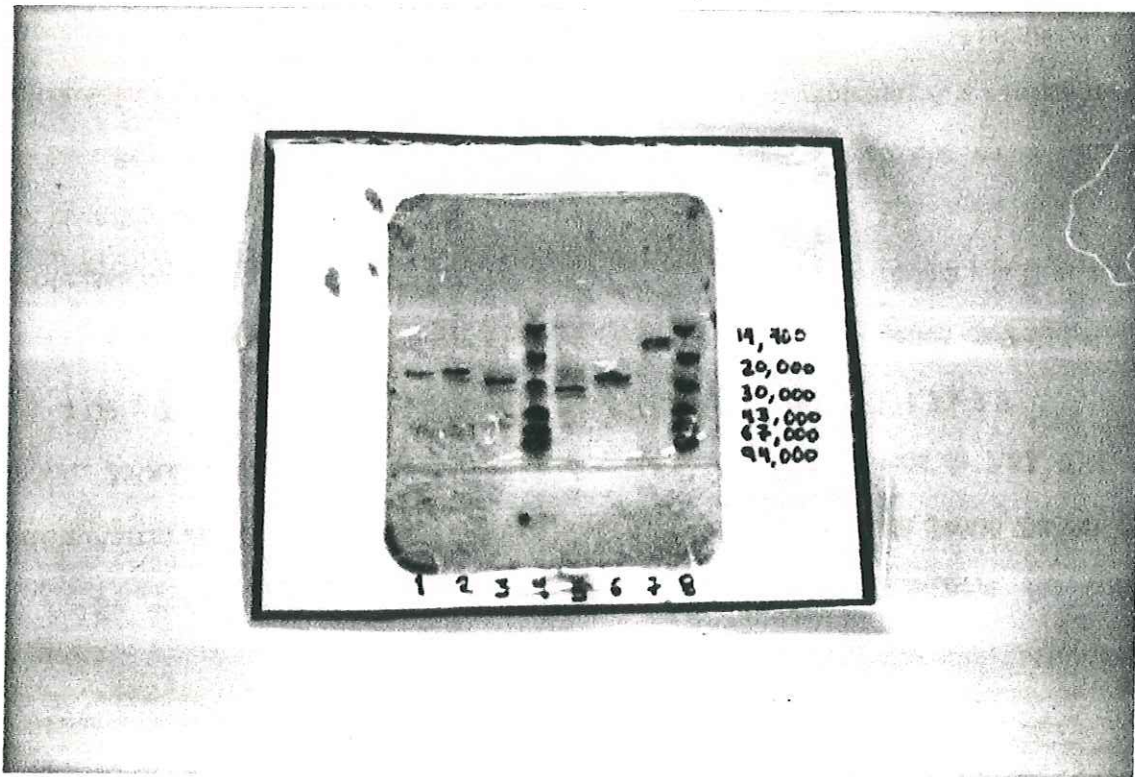


Figura 20. Electroforésis en microgeles homogéneos de SDS-poliacrilamida al 20%. Los carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 corresponden a las fracciones A, B, F, patrones, G, H, J y patrones, respectivamente.

4.3.3. Coeficiente de extinción

Los valores para las muestras A, B y J fueron muy altos, comparados con los reportados para proteasas pertenecientes a las diferentes familias. Esto es debido a que probablemente la concentración de proteína se subvaluó, ya que se utilizó albúmina de bovino para construir la curva de calibración, y como describe Smith et al. (1985) existen variaciones en la sensibilidad del método de una proteína a otra, esto debido a la diferente composición de aminoácidos de las mismas (por ejemplo, la quimotripsina es subvaluada por este método). Para un cálculo más exacto de este coeficiente se requiere secar, pesar, disolver una cantidad conocida en un volumen dado para tener una cierta concentración (por ejemplo 2 mg/ml) y entonces leer la absorbencia a 280 nm. Sin embargo, en este caso, la cantidad de proteína no era suficiente para realizar con precisión esta determinación, por lo que se optó por el método espectrofotométrico.

Tabla VI. Punto isoelectrico, peso molecular y coeficiente de extinción de las enzimas purificadas.

Muestra	Punto isoelectrico	Coefficiente de extinción	Peso Molecular (daltones)
A	7.81	3.77	24,000
B	7.10	3.12	24,000
F	3.72	2.78	29,000
G	3.80	0.93	32,000
H	4.02	1.3	25,000
J	6.61	2.78	17,000

4.3.4. Actividad proteolítica de cada fracción con diferentes sustratos

La actividad hidrolítica de cada una de las enzimas purificadas se probó sobre 6 diferentes sustratos. Todas ellas mostraron actividad sobre caseína y cuero azure (sustratos proteicos), mientras que con los sustratos sintéticos se observaron diferentes resultados como se muestra en la Tabla VI. Se puede observar que la muestra A puede ser una enzima del tipo de la quimotripsina ya que presenta actividad sobre BAEE, BAPNA y ATEE, este último es específico para este tipo de enzimas. La enzima H tiene características de carboxipeptidasa A al tener actividad sobre HPLA. Las fracciones B y J tienen características de proteasas serínicas (tipo tripsina). La muestra F no mostró especificidad sobre ninguno de los sustratos sintéticos probados y sólo mostró actividad sobre sustratos proteicos, mientras que la muestra G tiene características de enzima serínica.

Tabla VII. Actividad hidrolítica de las fracciones puras sobre diferentes sustratos sintéticos

Sustrato	A	B	F	G	H	J
Caseína	+	+	+	+	+	+
Cuero azure	+	+	+	+	+	+
BAEE ¹	+	+		+		+
BAPNA ²	+	+		+		+
HPLA ³					+	
TAME ⁴	+	+				+
ATEE ⁵	+					

¹BAEE: N- α -benzoil-L-arginina etil éster

²BAPNA: N- α -benzoil-DL-arginina p-nitroanilida

³HPLA: hipuril-L-fenilalanina

⁴TAME: N- α -p-tosil-L-arginina metil éster

⁵ATEE: N-acetil-L-tirosina etil éster

+ Prueba positiva sobre el sustrato referido

4.3.5. Actividad proteolítica en presencia de diferentes inhibidores

Los resultados obtenidos al realizar las pruebas de inhibición se muestran en la tabla Tabla VII. Con estos resultados se tiene que la muestra A es tipo quimotripsina ya que es inhibida por TPCK. Este resultado confirma los resultados obtenidos en las pruebas con sustratos sintéticos, la B una proteasa serínica o metaloproteasa por ser inhibida por EDTA y los inhibidores de tripsina de tipo I-S y II-S; la F una serínica por ser inhibida por los inhibidores de tripsina I-S y II-S y por la aprotinina, la G es metaloproteasa o serínica ya que es inhibida por EDTA, aprotinina e inhibidor de tripsina II-S. La muestra H tiene características de una carboxipeptidasa A (metaloproteasa) por ser inhibida por 1,10 fenantrolina y EDTA. La muestra J tiene características de una enzima de tipo serínico ya que es inhibida por los inhibidores de tripsina I-S y II-S. Sin embargo, no se puede afirmar de manera contundente a qué familia pertenecen las fracciones B, F, G y J debido a la poca especificidad que presentan ya que actúan sobre diferentes sustratos y además son inhibidas por diferentes compuestos.

TABLA VIII. Efecto de diversos inhibidores sobre la actividad proteolítica de las enzimas purificadas.

INHIBIDOR	A	B	F	G	H	J
EDTA	+	+		+	+	+
1,10 fenantrolina	+				+	
Acetato fenil mercúrico		+				
Inhibidor de tripsina II-S	+	+	+	+		+
Inhibidor de tripsina I-S	+	+	+			+
Aprotinina	+		+	+		
TPCK ¹	+					

¹TPCK: N-Tosil-L-fenilalanina clorometil cetona

+Presenta inhibición con el inhibidor referido

De esta manera, en base a las pruebas realizadas con diversos inhibidores y sustratos, se observa que el abulón azul presenta una mezcla compleja de enzimas proteolíticas en sus jugos digestivos, posiblemente para adaptarse a cambios en las condiciones del medio. Es decir, en el medio puede haber variaciones en temperatura, tipo de alimento disponible, salinidad, etc., que pueden favorecer la activación de un tipo de enzima o bien su inactivación, por lo cual, al tener diversos tipos de enzimas le da la posibilidad de adaptarse a estos cambios.

Debido a esta mezcla de enzimas, pueden degradar una gran variedad de proteínas ya que la eficiencia en la degradación de proteínas debe ser resultado de la acción concertada de proteínas que requieran las mismas condiciones para llevar a cabo su actividad. No obstante, posiblemente la combinación de proteínas de diferente clase catalítica no es tan eficiente en la degradación de sustrato debido a que las condiciones que favorecen la activación de una clase pueden ser inhibitorias para otra (Chávez y Pérez-Montfort, 1994), sobre todo cuando se trata de enzimas que requieren condiciones muy diferentes para poder mantener su estabilidad y actividad. En las vísceras del abulón se encuentran tanto enzimas perteneciente a diferentes clases catalíticas (serínicas y metaloproteasas), como pertenecientes a una misma clase (hay varias enzimas serínicas tanto tipo quimotripsina como tipo tripsina).

4.3.6. Contenido de aminoácidos

Las proteasas analizadas mostraron diferentes contenidos de aminoácidos, mismos que se muestran en la Tabla VIII. Se puede observar en dicha tabla que las fracciones A, J y B contienen más aminoácidos básicos que las F, G y H, de ahí que los puntos isoeléctricos de estas últimas sean más ácidos. Por otro lado, se puede observar la presencia de aminoácidos hidrofóbicos como son la alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina y metionina, los cuales varían en su porcentaje de contribución al contenido total, pero en general están presentes dándole a la proteína un alto grado de hidrofobicidad, lo que provoca su gran inestabilidad en medios acuosos y su poca solubilidad a altas concentraciones. Este problema se

hizo patente durante todos los pasos de la purificación y caracterización ya que la muestra se precipitaba al concentrar, descongelar y en presencia de altas concentraciones de NaCl (0.8M de NaCl).

TABLA IX. Composición de aminoácidos de las muestras purificadas*

Aminoácido	Muestra A	Muestra B	Muestra F	Muestra J	Muestra G	Muestra H
Ac. aspártico			15	31	17	4
Ac. glutámico			12	2	13	7
Serina		2	13	13	15	7
Treonina		3	10	3	11	
Arginina		3	5		9	4
Glicina	15.51	8	65	49	63	53
Alanina	39.19			36		
Prolina	1		22	6	30	37
Valina	2	7		3		
Metionina			13		19	
Isoleucina	1			3		27
Leucina	4	1	31	4	27	40
Fenilalanina	1	39	26	2	27	14
Cisteína	2	13		6		
Lisina	83	64	10	29	17	15
Histidina	36	10				
Tirosina	2	11	10	3	9	4

* Los valores presentados corresponden al número de residuos por molécula

7) Determinación de su estructura secundaria

El espectro de Dicroísmo Circular de una proteína en la región comprendida entre 183-260nm (UVlejano), es debido básicamente a la conformación secundaria de su cadena polipeptídica (Hennessey y Johnson, 1981). Además según Manavalan y Johnson (1983) las características de la curva de CD de una proteína permiten establecer, en forma relativa, el patrón de plegamiento de la macromolécula. De esta manera, una proteína puede ser clasificada

estructuralmente, dentro de una de las cuatro clases: clase α , clase β , clase $\alpha+\beta$ y clase α/β (Levitt et al., 1976).

Los espectros de dicroísmo circular (CD) que se muestran en las figuras 21, 22 y 23 corresponden a las proteasas purificadas A, F, G, H y J. Al hacer el análisis de dichos espectros según Compton y Curtis (1986), se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla X en donde se puede observar que las muestras A y J tienen un mayor porcentaje de hojas β antiparalelas, mientras que en las muestras F, G y H predomina la α hélice. Sin embargo al realizar el análisis de estos espectros, se observó, al igual que con el cálculo del coeficiente de extinción, que la concentración de proteína estaba subvaluada lo que provocó que los valores de $[\theta]$ no tuvieran un comportamiento lógico, mismo, que se aprecia en los valores de las contribuciones de las estructuras secundarias por lo que es necesario hacer la determinación más precisa del coeficiente de extinción, como ya anteriormente se mencionó, sobre todo para las muestras A y J. Además, quizás este método de análisis no es el más apropiado para este tipo de muestras (A y J) por lo que posteriormente sería conveniente utilizar otro método para analizar dichos espectros.

TABLA X. Contribución relativa de estructuras secundarias a los espectros de CD de cada enzima purificada

MUESTRA	H ¹	A ²	P ³	T ⁴	O ⁵
A	36.3	50	12	46	60
F	50.1	18.4	4	23	25
G	17.8	12.3	6.4	15.8	20
H	22.1	19.14	6	20	32.4
J	41.4	48	-	37.3	16

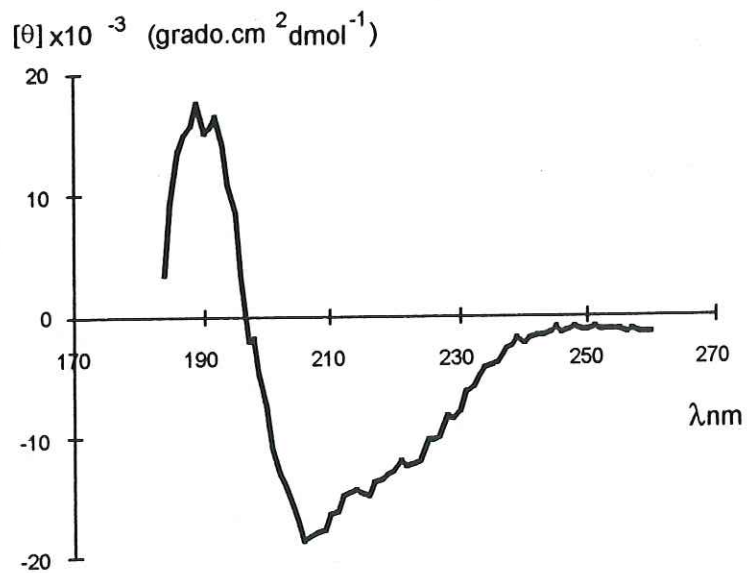
¹ α - hélice

² hoja β antiparalela

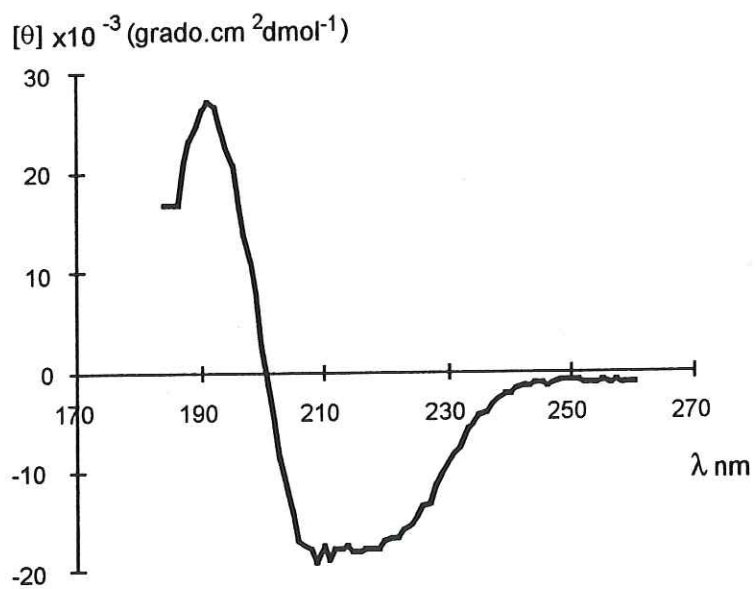
³ hoja β paralela

⁴ giro β

⁵ Otra estructura

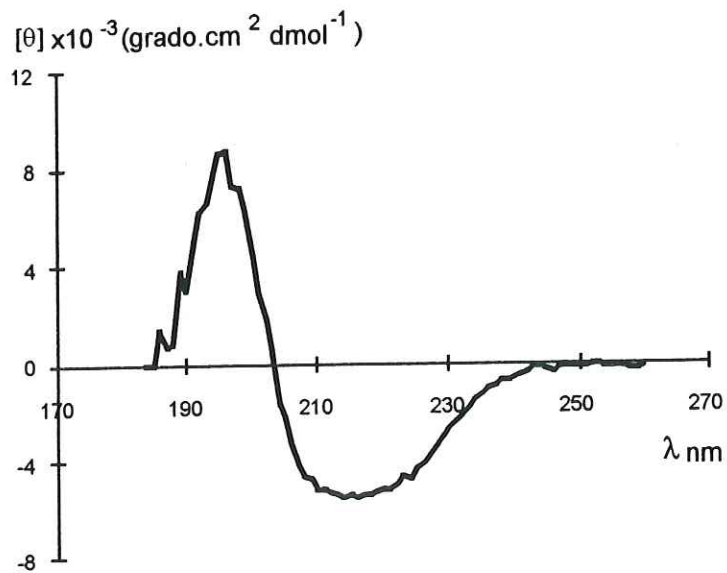


(A)

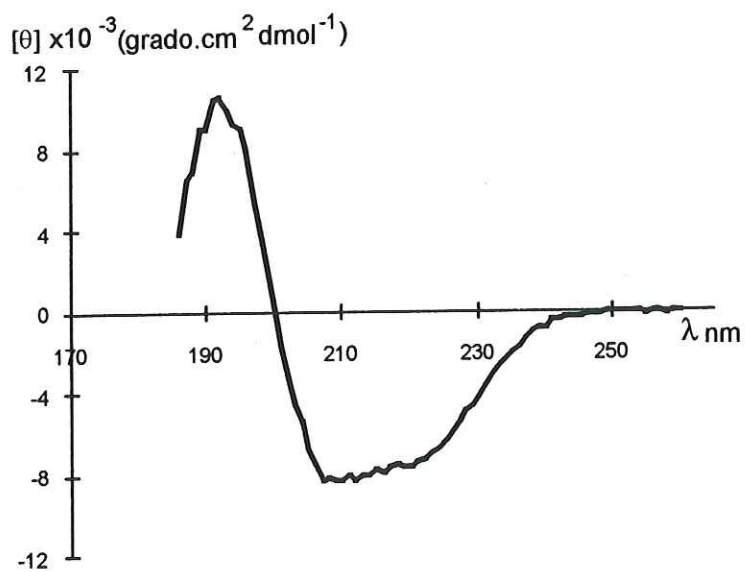


(B)

Figura 21. Espectros de Dicroísmo Circular en la región del UV lejano (183-260nm) de proteasas del abulón azul, *Haliotis fulgens*. (A) Proteasa A, (B) Proteasa F.



(A)



(B)

Figura 22. Espectros de Dicroísmo Circular en la región del UV lejano (183-260nm) de proteasas del abulón azul, *Haliotis fulgens*. (A) Proteasa G, (B) Proteasa H.

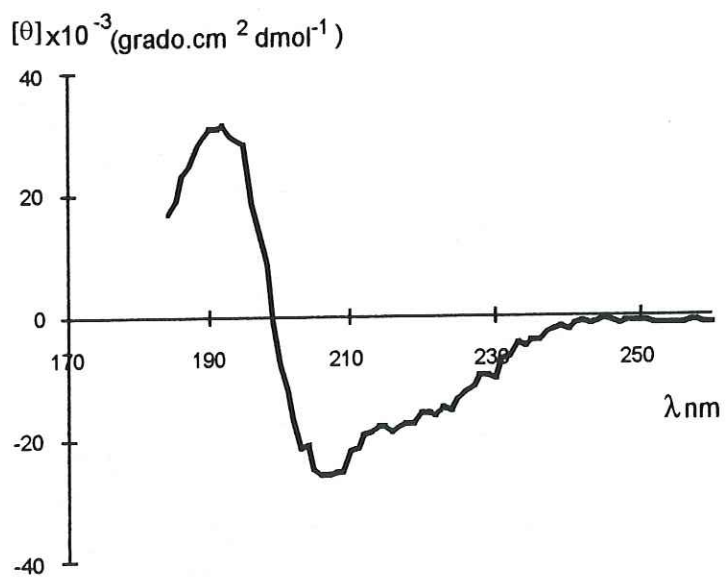


Figura 23. Espectros de Dicroísmo Circular en la región del UV lejano (183-260nm) de la proteasa J del abulón azul, *Haliotis fulgens*.

5.0 CONCLUSIONES

Este estudio se enfocó hacia la purificación y caracterización de proteasas digestivas del abulón azul, *Haliotis fulgens*. A partir de los resultados descritos anteriormente, se concluye que:

- Se purificaron 6 proteasas digestivas del abulón azul, *Haliotis fulgens*, las que se denominaron A, B, F, G, H y J.
- Las 6 proteasas mostraron actividad sobre sustratos proteicos (caseína y cuero-azure).
- Los pesos moleculares de las proteasas A, B, F, G, H y J fueron de 24000, 24000, 29000, 32000, 25000 y 17000 daltones respectivamente.
- El coeficiente de extinción de las muestras A, B, F, G, H y J fueron: 3.77, 3.12, 2.78, 0.93, 1.3, y 2.8 y su punto isoeléctrico de 7.81, 7.10, 3.72, 3.8, 4.02 y 7.1 respectivamente.
- El mayor rendimiento se obtuvo con las proteasas H y G y el menor con la A.
- Las enzimas que mostraron mayor actividad específica sobre caseína fueron la G, J y F
- Estas proteasas precipitan cuando se encuentran en altas concentraciones.
- En base a las pruebas de dicroísmo circular, se observó que las fracciones A y J tienen mayor porcentaje de hojas β antiparalelas, mientras que en las fracciones F, G y H predomina la α hélice, sin embargo es necesario determinar exactamente el coeficiente de extinción para poder interpretar de manera más eficiente estos espectros, sobre todo los de las muestras A y J.
- En base a las pruebas de inhibición con diferentes compuestos y de actividad sobre diferentes sustratos se obtiene que la muestra H es del tipo de la carboxipeptidasa A, la A es del tipo de la quimotripsina y las muestras B, J, F y G tienen características de proteasas de la familia de las serínicas. Todas con excepción de la muestra F necesitan iones metálicos para lograr su estabilidad.
- Estas proteasas presentan baja especificidad ya que actúan sobre diferentes sustratos y son inhibidas por diferentes compuestos, esto les permite actuar bajo diferentes condiciones.

6.0 BIBLIOGRAFIA

Arreguín, B. y Taboada, J. (1968) Un aparato de diálisis continua. Bol. Inst. Quím. UNAM, **20**:95-97.

Arreguín, R., Arreguín, B., Soriano, G., Hernández, A. and Rodríguez, R. (1993) Isolation and characterization of a protease from the marine sponge *Sphaciospongia vesparia*. Febs 12303. **320**(3): 235-238.

Asgeirsson, B., Fox, J.W., and Bjarnason, J.B. (1989) Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. Eur. J. Biochem. **180**: 85-94

Bender, M.L, Clement, G.E., Kézdy, F.J. and Heck, H.D'A. (1964) The correlation of the pH (pD) dependence and the stepwise mechanism of α -chymotrypsin-catalyzed reactions, J. Am. Chem. Soc. **86**: 3680-3690.

Beynon, R.J. and Bond, J.S. (1989) Proteolytic enzymes, a practical approach. Beynon, R. and Bond, J. (Eds). IRL Press, Oxford University, 255 pp.

Cassim, J.Y. and Young, J.T. (1969) A computerized calibration of the Circular Dichrometer. Biochemistry. **8**: 1947-1951.

Chánez, M.E. y Pérez-Montfort, R. (1994) Actividad proteolítica en mezclas de proteinasas de diferente clase catalítica. Memorias del congreso de Bioquímica, Zacatecas, México.

Chen, C.S., Tsao, C.Y. and Jiang, S.T. (1988) Purification and characterization of proteases from the viscera of milkfish (*Chanos chanos*). J. Food Biochem. **12**: 269-288.

Cho, D.M., Pyeun, J.H., Byun, D.S. and Kim, C.Y. (1983) Proteolytic activity of the crude enzyme extracted from the digestive tract of marine gastropods. Bull. Korean Fish. Soc. **16**(3): 216-224.

Clark, A.G. and Jowett, D.A. (1978) Hydrolitic enzymes of the Paua, *Haliotis iris*, a marine gastropod. N.Z.J. Mar. Freshwater Res. **12**: 221-222.

Clark, A.G. and Jowett, D.A. (1980) Rate measurements in cases of substrate inhibition. Biochem. Biophys. Acta **515**, 143-164.

Clark, A.G. and Jowett, D.A. (1988) Purification and properties of an arylsulphatase from the digestive gland of *Haliotis iris*. Comp. Biochem. Physiol. **89**(2):409-417.

Compton, L.A., and Curtis, J.W. (1986). Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra for Secondary Structure Using a Simple Matrix Multiplication. *Analytical Biochemistry* **155**: 155-167

Cox, W. (1962) California Abalone, Family Haliotidae. *Calif. Fish and Game. Fish Bull.* 118-130pp

Davis, G.E., Richards, D.V., Haaker, P.L. and Parker, D.O. (1992) Abalone population declines and fishery management in southern California. **In**: *Abalone of the World. Biology, fisheries and Culture*, Shepherd, S.A., Tegner, M.J. and Guzmán del Prío, S.A. (Eds). Fishing News Books. USA. pp 237-249

Dixon, M. and Webb, E. (1979) *Enzymes*. Academic Press, New York. p 1116.

Dunn, B.M. (1989) Determination of protease mechanism. **In**: *Proteolytic enzymes*. Beynon, R.J. and Bond, J.S. (Eds). IRL Press, Oxford University. pp 57-81.

Ebert, E.E. and Houk, J.L. (1989) Abalone cultivation methods used at the California Department of Fish and Game's Marine Resources Laboratory. **In**: *Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods*. Hahn, K.O. (Ed). CRC Press, Boca Raton. pp 239-254.

Fallu, R. (1991) *Abalone farming*. Fishing News Books. Great Britain 195 pp.

Fink, E., Schiessler, H., Arnhold, M. and Fritz, H. (1972) Hoppe-Seyler's. *Z. Physiol. Chem.* **353**: 1633.

Folk, J.E. and Schirmer, E.W. (1963) The porcine pancreatic Carboxipeptidase A system. *J. Biol. Chem.* **238**: 3884-3894.

García-Carreño, F.L. (1992) Protease inhibition in theory and practice. *Biotechnology Education.* **3**(4): 145-150.

Gómez-Pinchetti, J.L. and García-Reina, G. (1993) Enzymes from marine phycophages that degrade cell walls of seaweeds, *Marine Biology.* **116**: 553-558.

Gorbics, L., Urge, L. and Otvos L. (1994) Comparative and optimized dabsyl-amino acid analysis of synthetic phosphopeptides and glycopeptides. *Journal of Chromatography A.* **676**: 169-176.

Guzmán del Prío, S.A. (1992) A review of the biology of abalone and its fishery in Mexico. **In**: *Abalone of the World. Biology, fisheries and Culture*, Shepherd, S.A., Tegner, M.J. and Guzmán del Prío, S.A. (Eds). Fishing News Books. USA. pp 341-360.

Guzmán del Prío, S.A. y Ortíz Quintanilla (1972) Descripción y diagnóstico de la pesquería del abulón. INP, Progr. Invest. y Fom. Pes. México/PNUD-FAO. pp 227-258.

Haaker, P.L., Henderson, K.C. and Parker D.O. (1986) California abalones. California Marine Resources Leaflet, 11.

Hahn, K.O. (1989a) Survey of the commercially important abalone species in the world. **In:** Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods. Hahn, K.O. (Ed). CRC Press, Boca Raton. pp 3-11.

Hahn, K.O. (1989b) Gonad reproductive cycles. **In:** Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods. Hahn, K.O. (Ed). CRC Press, Boca Raton. pp 13-39.

Hahn, K.O. (1989c) Nutrition and growth of abalone. **In:** Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods. Hahn, K.O. (Ed). CRC Press, Boca Raton. pp 135-155.

Harris, E.L.V. (1989) Initial planning. **In:** Protein purification methods: a practical approach. Harris, E.L.V. and Angal, S. (Eds). pp 1-9.

Harris, E.L.V. (1989) Concentration of the extract. **In:** Protein purification methods: a practical approach. Harris, E.L.V. and Angal, S. (Eds). pp 125-161.

Hennessey, J.P. and Johnson, W.C. (1981) Information content in the circular dichroism of proteins. *Biochemistry*, **20**: 1085-1094

Hjelmeland K. and Raa J. (1982) Characteristics of two trypsin type isozymes isolated from the Antarctic fish capelin (*Mallotus villosus*). *Comp. Biochem. Physiol.* **71B**: 557-562

Keil, B. (1971) Trypsin. In *The Enzymes*, 3rd ed. Boyer, P.D. (Ed) Academic Press, New York. **3**: 249-275.

Kim, H.R., Meyers, S.P. and Godber J.S. (1992) Purification and characterization of anionic trypsins from the hepatopancreas of crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.* **103B**: 391-398.

Kramer, D.E. y Withaker, J.R. (1969) Multiple molecular forms of ficin evidence against autolysis as explanation. *Plant physiol.* **44**: 1560-1565.

Kunitz, M. (1947) Crystalline Soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.* **30**: 291

Lambin, P., Rochu, D. and Fine, J.M. (1976) A new method for determination of molecular weights of proteins by electrophoresis across a sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gradient gel. *Anal. Biochem.* **74**: 567-575.

Leighton, D.L. (1966) Studies of food preference in algivorous invertebrates of southern California kelp beds. *Pacific. Sci.* **20**(1): 104-113.

Leighton, D.L. (1974) The influence of temperature on larval and juvenile growth in three species of southern California abalones, U.S. Natl. Mar. Fish. Serv. Fish. Bull., **72**: 1137.

Lindberg, D.R. (1992) Evolution, distribution and systematics of Haliotidae **In**: Abalone of the World. Biology, fisheries and Culture, Shepherd, S.A., Tegner, M.J. and Guzmán del Prío, S.A. (Eds). Fishing News Books. USA. pp 3-18

Manavalan, P. and Johnson, W.C. (1983) Sensitivity of circular dichroism to protein tertiary structure class. *Nature*, **305**: 831-832.

Mottet, M.G. (1978). A review of the fishery biology of abalones. State of Washington Department of fisheries. Technical Report No. 37. 81 pp.

Murakami, K. and Noda, M. (1981) Studies on proteinases from the digestive organs of sardine. I. Purification and characterization of three alkaline proteinases from the pyloric caeca. *Biochim. biophys. Acta* **65B**: 17-26.

Muramatsu, T. and Morita, T. (1981) Anionic trypsin-like enzymes from the crab *Eriocheir japonicus* de Haan active in more acidic media. *Comp. Biochem. Physiol.* **70B**: 527-533.

Neuhoff, V., Stamm, R. and Eibl, H. (1985) Clear background and highly sensitive protein staining with coomassie blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* **6**: 427-448.

Neurath, H. (1989) The diversity of proteolytic enzymes. **In**: Proteolytic enzymes. Beynon R.J. and Bond J.S. (Eds). IRL Press, Oxford University. pp 1-13

Ortiz, Q. M. y León, C. G. (1994) La pesquería del abulón. Instituto Nacional de la pesca, pp 3-34 (en prensa).

Ortiz, Q. M., y León, C.G. (1988) Recursos pesqueros de México y sus perspectivas. Recurso Abulón (*Haliotis* spp) **En**: Recursos pesqueros del País. Sría de Pesca. INP. pp 11-51.

Osnes, K. and Mohr, V. (1985) On the purification and characterization of three anionic, serine-type peptide hydrolases from antarctic krill, *Euphausia superba*. *Comp. Biochem. Physiol.* **82B**: 607-619.

Parker, D.O., Haaker, P.L. and Togstad, H.A. (1992) Case histories for three species of California abalone, *Haliotis corrugata*, *H. fulgens* and *H. cracherodii*. **In**: Abalone of the

World. Biology, fisheries and Culture, Shepherd, S.A., Tegner, M.J. and Guzmán del Prío, S.A. (Eds). Fishing News Books. USA. pp384-394.

Polgár, L. (1987) Structure and function of serine proteases. **In:** Hydrolytic Enzymes, Neuberger, V and Brocklehurst, K. (Eds). pp 159-185.

Raae, A.J., and Walther, B.T. (1989) Purification and characterization of chymotrypsin, trypsin and elastase like proteinases from cod (*Gadus Morhua L.*). *Comp. Biochem. Physiol.* **93B(2)**: 317-324.

Ramírez-Granados, R. (1992) Alternativas científicas para la recuperación de los recursos abuloneros de la Baja California, México: administración biológico-pesquera y acuicultura. **In:** Abalone of the World. Biology, fisheries and Culture. Shepherd, S.A., Tegner, M.J. and Guzmán del Prío, S.A. (Eds). Fishing News Books. pp 361-369.

Richardson, J.S. (1981) The anatomy and taxonomy of protein structure. **In:** Advances in Protein Chemistry. Anfinsen, C.B., y Edsall J.T. (Eds). **34**: 167-339

Rinderknecht, H., Geokas, M.C., Silverman, P. and Haverback, B.J. (1968) A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. *Clin. Chim. Acta.* **21**:197-203.

Rocha, G.E. (1985) Diagnóstico de la pesquería del abulón en Baja California para un nuevo régimen de explotación del recurso. Instituto Nacional de la Pesca, México, 277pp.

Salas-Garza, A.E. y Searcy-Bernal, R. (1992) Desarrollo y estado actual del cultivo de abulón en México. **In:** Abalone of the World. Biology, fisheries and Culture. Shepherd, S.A., Tegner, M.J. and Guzmán del Prío, S.A. (Eds). Fishing News Books. USA. pp 538-546.

Salvesen, G. and Nagase, H. (1989) Inhibition of proteolytic enzymes. **In:** Proteolytic enzymes a practical approach. pp 83-103.

Searcy-Bernal, R., Salas-Garza, A.E. y Flores-Aguilar, R.A. (1992) Investigaciones en México sobre la etapa crítica de la producción de semilla de abulón (*Haliotis spp.*). **In:** Abalone of the World. Biology, fisheries and Culture. Shepherd, S.A., Tegner, M.J. and Guzmán del Prío, S.A. (Eds). Fishing News Books. USA. pp 547-560.

Silverstein, R.M., (1974) The assay for the bromelains using N-CBZ-L-lysine-p-Nitrophenyl ester and N-CBZ-L-glycine-p-nitrophenyl ester as substrates. *Anal. Biochem.* **62**:478-484

Slocum, R.H. and Arrizon-Lopez, V. (1994). Amino Acid Analysis of Hydrolyzed Proteins Using System Gold for Ion-Exchange Amino Acid Analysis. Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA. A-1762:1-11pp

Smalas, A.O., Heimstad, E. S., Hordvik, A., Willassen, N.P. and Male, R. (1994) Cold Adaption of enzymes: Structural comparison between salmon and bovine trypsins. *Proteins: Structure, Function and Genetics*. **20**: 149-166.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Garther, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985) Measure of protein Using Bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**:76-85.

Stoscheck, C.M. (1990). Quantitation of protein. *In: Methods in enzymology*. **182**: 49-68.

Tegner, M.J. and Butler, R.A. (1989) Abalone seeding. *In: Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods*. Hahn, K.O. (Ed). CRC Press, Boca Raton. pp 157-182.

Tegner, M.J., DeMartini, J.D. and Karpov, K.A. (1992) The California red abalone fishery: a case study in complexity. *In: Abalone of the World. Biology, fisheries and Culture*, Shepherd, S.A., Tegner, M.J. and Guzmán del Prío, S.A. (Eds). Fishing News Books. USA. pp 370-383

Towalski, Z. and Rothman, H. (1986). Enzyme technology. *In: The biotechnological challenge*. Cambridge university press, Great Britain. pp 38-75.

Uki, N. and Watanabe, T. (1992) A review of the nutritional requirements of abalone (*Haliotis* spp.) and development of more efficient artificial diets. *In: Abalone of the World. Biology, fisheries and Culture*, Shepherd, S.A., Tegner, M.J. and Guzmán del Prío, S.A. (Eds). Fishing News Books. USA. pp 504-517.

Walsh, K.A. (1970) Trypsinogens and trypsins of various species. *In: Methods in Enzymology*. Perlmann, G.E. and Lorand, L. (Eds). Academic Press, New York. **19**: 41-63.

Walsh, K.A. and Wilcox, P.E. (1970). Serine Proteases. *In: Methods in Enzymology*. Perlmann, G.E. and Lorand, L. (Eds). Academic Press, New York. **19**:31-111.

Whitaker, J.R. and Bender, M.L. (1965) Kinetics of Papain-Catalyzed Hidrolysis of alfa-N-Benzoyl-L-arginine ethyl ester and alfa-N-Benzoyl-L-argininamide. *Journal of the American Chemical Society*. **87**:12

Zwilling, R. and Neurath, H. (1981) Invertebrate Proteases. *In: Methods in Enzymology*. Perlmann, G.E. and Lorand, L. (Eds). Academic Press, New York. **80**: 633-665.