



TRIPSINA DE CALAMAR GIGANTE (*DOSIDICUS GIGAS*): PROPIEDADES Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO.

A.G. Villalba-Villalba^a, E. Márquez-Ríos^b, M. Ezquerro-Brauer^b, W. Torres-Arreola^b, M.E. Cruz-Campas^a

^aUniversidad Estatal de Sonora, villalba13@gmail.com, martincruzcampas@hotmail.com

^bUniversidad de Sonora, marquez@uson.mx, meb@uson.mx, wtorresa@uson.mx

RESUMEN

La importancia de las enzimas como herramienta biotecnológica se ha incrementado en los últimos años (Haard, 1994), así como también la demanda por enzimas con propiedades específicas; además se ha generado el interés por diversificar las fuentes de obtención de éstas biomoléculas. El ambiente marino contiene una gran diversidad de material genético, por lo tanto, representa un enorme potencial como fuente de enzimas de interés comercial (Haard, 1994). Alrededor del 50-60% de la producción pesquera es usada para consumo humano directo, mientras que millones de toneladas de subproductos derivados de esta actividad son eliminados, ya que son considerados desecho (Morrissey y Okada, 2007). La actividad de las enzimas digestivas (proteasas) en cefalópodos como el calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es inusualmente alta, además estos animales cuentan con un sistema digestivo especializado para un procesamiento rápido de los alimentos (Seed, 1983). Se purificó tripsina del hepatopancreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*), por fraccionación con sulfato de amonio (30-70% de saturación), filtración en gel y cromatografía de afinidad. La tripsina mostró PM de 23.5 kDa de acuerdo al análisis SDS-PAGE, mostró una sola banda de actividad en el zymograma. La enzima exhibió máxima actividad a pH 8.5 y 40 °C, usando BAPNA como sustrato. K_m y k_{cat} mostraron valores de 0.085 ± 1.45 mM y 1.76 ± 0.12 s⁻¹, respectivamente.

1. INTRODUCCIÓN

La importancia de las enzimas como herramienta biotecnológica se ha incrementado en los últimos años, así como también la demanda por enzimas con propiedades específicas; además se ha generado el interés por diversificar las fuentes de obtención de éstas biomoléculas.

El ambiente marino contiene una gran diversidad de material genético, por lo tanto, representa un enorme potencial como fuente de enzimas de interés comercial (Haard, 1994). Alrededor del 50-60% de la producción pesquera es usada para consumo humano directo, mientras que millones de toneladas de subproductos derivados de esta actividad son eliminados, ya que son considerados desecho (Morrissey y Okada, 2007). La actividad de las enzimas digestivas (proteasas) en cefalópodos como el calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es inusualmente alta, además estos animales cuentan con un sistema digestivo especializado para un procesamiento rápido de los alimentos (Seed, 1983). Las proteasas del sistema digestivo (Hepatopáncreas, HP) del calamar gigante son principalmente cistein, metalo y serina proteasas (Raksakulthai y Haard 1999). La pesquería del calamar gigante es una de las principales en México, con una producción en promedio de 72, 144 toneladas de 2004 a 2013 (SAGARPA, 2015), el cual es normalmente vendido (filete) en la presentación fresco-congelado o cocido-congelado (Luna-Raya et al, 2006). Sin embargo, el sistema digestivo no es utilizado (aproximadamente 5,770 toneladas), representando además una fuente de contaminación. Este material constituye hasta el 8% del peso



corporal total del calamar, el cual contiene 20% de proteína cruda (Ezquerria-Brauer et al, 2002). Proteasas extraídas del tracto digestivo del calamar *Illex illecebrosus*, han sido utilizadas de manera experimental en procesos de la industria alimentaria tales como, elaboración de salsa de pescado, salado y fermentado de carnes, ablandamiento y maduración de quesos (Lee et al 1982). Una de las enzimas serina proteasas más importantes en peces e invertebrados es la tripsina (endopeptidasa), la cual hidroliza el enlace peptídico del lado carboxilo de los aminoácidos arginina y lisina, mostrando pesos moleculares entre 22 a 28 kDa (Whitaker, 1994). Tripsina ha sido aislada de varias especies de peces, por ejemplo *Siniperca chuatsi*, *Balistes capriscus*, *Sepia officinalis*, *Lutjanus vitta*, *Diapterus rhombeus*, *Salaria basilisca*, *Pterygoplichthys disjunctivus* (Lu et al 2008, Jellouli et al 2009, Balti et al 2009, Khantaphant y Benjakul 2010, Silva et al 2011, Ktari et al 2012, Villalba-Villalba et al 2013) y caracterizada en base a sus propiedades físico-químicas, sin embargo la información de tripsina de cefalópodos es escasa. El objetivo de este trabajo fue purificar y caracterizar la tripsina del sistema digestivo del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) para generar información básica que contribuya a dilucidar el potencial biotecnológico de dicha enzima.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Obtención de la muestra

Los calamares se capturaron en el Golfo de California ((27°55'N110°54'N). Inmediatamente después de la captura fueron almacenados en hielo y transportados al Laboratorio de Alimentos Marinos de la Universidad de Sonora en Hermosillo, Sonora, México. El tiempo transcurrido desde la captura hasta el eviscerado fue menos de 12 h.

Preparación del extracto crudo de enzimas

El HP (100 g) se homogenizó con 200 ml de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 por 2 min y centrifugado a 18,000xg por 30 min a 2-4 °C. Después de la centrifugación, los lípidos fueron removidos manualmente y el sobrenadante se filtró; el extracto crudo (EC) sin lípidos se almacenó a -80 °C hasta el momento de los análisis.

Purificación de la enzima

El EC se fraccionó con sulfato de amonio al 30 y 70% de saturación, cada vez se centrifugó a 20,000 xg por 20 min a 4°C. El precipitado se disolvió en 20 ml de buffer Tris-HCl 50 mM a pH 7.5 (buffer A), y se inyectó en una columna de Shepadex G-75 (1.6 cm x 120 cm), la muestra de eluyó con buffer A con un flujo de 0.3 ml/min, se colectaron 3 ml por fracción. Las fracciones con actividad tipo tripsina fueron mezcladas e inyectadas en una columna de Benzamidina-Sepharose 4 Fast Flow (1.1 cm x 15 cm), equilibrada con el buffer A. Las fracciones retenidas fueron eluidas con cambio de pH de la fase móvil de 7.5 a 3.0, usando buffer Glicina-HCl 50 mM, pH 3.0 (antes de la elución adherer 200 µL Tris-HCl 1 M, pH 9.0 en cada tubo o fracción). Las fracciones eluidas se mezclaron para futuros análisis.

Determinación de la concentración de proteína

Se utilizó el método de Bradford, usando albúmina de suero bovino como estándar.

SDS-PAGE y Zymograma

Los ensayos de electroforesis se realizaron según la metodología descrita por Laemmli, 1970, usando 14% en el gel de separación. Para el zymograma las muestras no se calentaron ni se sometieron a condiciones desnaturizantes y reductoras.

Actividad amidasa



La actividad tipo amidasa se evaluó siguiendo la metodología de Erlanger et al (1962), usando 1 mM de BAPNA como sustrato. Las unidades de BAPNA hidrolizado (U) se calcularon con la siguiente ecuación: $U = A_{410}/\text{min} \times 1000 \times 1 / 8,800 \times \text{mg enzima}$.

pH óptimo y temperatura óptima

El efecto del pH sobre la actividad de la tripsina fue evaluado usando un buffer universal de pH 4 a 11 a 25 °C por 15 min (Stauffer, 1989). Para el análisis del efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima, el extracto fue incubado a 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65 y 70 °C por 15 min en buffer Tris-HCl 50 mM a pH óptimo.

Estabilidad al pH y a la temperatura

Se evaluó midiendo la actividad residual a varios pH's (de 4 a 11) por 60 min a 25 °C, usando un buffer universal (Stauffer, 1989). La estabilidad a la temperatura se evaluó incubando la enzima a varias temperaturas (25, 35, 45, 55 y 65 °C) por 60 min para después medir actividad residual.

Parámetros cinéticos

Las constantes K_m y k_{cat} fueron evaluadas usando varias concentraciones de BAPNA como sustrato (0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 mM).

3. CONCLUSIONES

Este trabajo describe las principales características fisicoquímicas, bioquímicas y cinéticas de una serin-proteasa obtenida del hepatopancreas del calamar gigante (*Dosidicus gigas*). En base a los resultados obtenidos, se concluye que la enzima aislada y purificada es tripsina, la cual mostró alta actividad en un rango de pH de 6.5 a 11 y temperaturas de 25 a 40 °C. Por lo que, el hepatopáncreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) puede ser una fuente importante de tripsina para usarse como herramienta biotecnológica.

BIBLIOGRAFÍA

1. N.F. Haard, "Speciality enzymes from marine organism", Food Technol, 52, 1994, pp. 64-67.
2. M. T. Morrisey, T. Okada: 'Marine enzymes from seafood by-products, In: Maximising the Value of Marine By-Products (edited by F. Shahidi)', 2007, Pp. 374-396. New York, USA: CRC Press.
3. R. Seed "Structural organization, adaptive radiation, and classification of molluscs. In the mollusca, metabolic biochemistry and molecular biomechanics" (P. Hochachka, ed) Academic Press, New York, 1983, pp 1-54.
4. R. Raksakulthai y N.F. Haard, "Purification and characterization of aminopeptidase fractions from squid (*Illex illecebrosus*) hepatopancreas" , J of Food Biochem, 23, 1999, pp. 123-144.
5. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2015) <http://www.sagarpa.gob.mx/Paginas/default.aspx>
6. M. C. Luna-Raya, J.L. Urciaga-García, C.A. Salinas-Zavala, M. A. Cisneros-Mata, L.F. Beltrán-Morales, "Diagnosis of giant squid consumption in Mexico and Sonora" Economy, Society and Territory ,2006, VI:535-5
7. J.M. Ezquerro-Brauer, N.F. Haard, R. Ramirez-Olivas, H. Olivas-Burrola, C.J. Velazquez-Sanchez, "Influence of harvest season on the proteolytic activity of hepatopancreas and mantle tissues from jumbo squid (*Dosidicus gigas*)" J Food Biochem, 26, 2002, pp. 459-475.



8. Y.Z. Lee, B.K. Simpson, N.F. Haard, "Supplementation of squid fermentation with proteolytic enzymes" *J. Food Biochem*, 6:1, 1982, 27-134.
9. J Whitaker, "Principles of Enzymology for the Food Sciences", 2nd ed. Marcel Dekker, New York, 1994.
10. B. Lu, L. Zhou, Q. Cai, "Purification and characterization of trypsins from the pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)" *Food Chem*, 110, 2008, pp. 352-360.
11. K. Jellouli, A. Bougatef, D. Daasi, R. Balti, A. Barkia, M. Nasri, "New alkaline trypsin from the intestine of grey triggerfish (*Balistes capricus*) with high activity at low temperature: purification and characterization", *Food Chem* 116, 6, 2009, 44-650.
12. R. Balti, A. Barkia, A. Bougatef, N. Ktari, M. Nasri, "A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia of officinalis*): purification and characterization" *Food Chem*, 113, 2009, pp.146-154.
13. S. Khantaphant, S. Benjakul, "Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*)", *Food Chem*, 120, 2010, pp. 658-664.
14. J. Silva, T. Espósito, M. Marcuschi, K. Ribeiro, R. Cavalli, V. Oliveira, R. Bezerra, "Purification and partial characterization of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*)", *Food Chem*, 129, 2011, pp. 777-782.
15. Ktari N, Khaled H, Nasri R, Jellouli K, Ghorbel S, Nasri M Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: Purification, characterization and potential application as a detergent additive. *Food Chem*, 130, 2012, pp. 467-474.
16. Villalba-Villalba AG, Ramírez-Suárez JC, Valenzuela-Soto EM, García-Sánchez G, Carvallo-Ruiz G, Pacheco-Aguilar R (2013) Trypsin from viscera of vermiculated sailfin catfish, *Pterygoplichthys disjunctivus* Weber, 1991: Its purification and characterization. *Food Chem* 141(2): 940-945
17. U. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4", *Nature*, 227, 1970, pp. 680-685.
18. B.F. Erlanger, N. Kokowski, W. Cohen, "The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin", *Arch Biochem Biophys*, 95, 1961, pp. 271-278.
19. C. Stauffer, "Effect of pH on activity, *Enzyme Assays for Food Scientist*" Stauffer C (eds) Van Nostrand Reinhold, 1989, New York, pp 63-117.