



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**PROTEASAS DE CRUSTACEOS CARACTERIZACION
BIOQUIMICA Y CONSIDERACIONES MOLECULARES**

T E S I S

Que para obtener el Grado en

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

p r e s e n t a

Martha Patricia Hernández Cortés

La Paz, B.C.S. México, Noviembre 1997.

Tesis de Doctorado en Ciencias
En el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

Martha Patricia Hernández Cortés

Conformación del Comité Tutorial:

Tutor Principal, Dr. Fernando L. García Carreño
Centro de Investigaciones del Noroeste, S.C.
Co-tutor, Dr. Edmundo Brito de La Fuente
Universidad Autónoma de México
Co-tutor, Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Centro en Investigación y Desarrollo en
Alimentos
Co-tutor, Dr. Kenneth Söderhäll
Universidad de Uppsala
Co-tutor, Dr. John R. Whitaker
Universidad de California, Davis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Fernando L. García Carreño
Dr. Alejandro M. Maeda Martínez
Centro de Investigaciones del Noroeste, S.C.
Dr. Humberto Mejía Ruíz
Centro de Investigaciones del Noroeste, S.C.
Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Dr. Ilie S. Racotta Dimitrov
Centro de Investigaciones del Noroeste, S.C.
Dr. Kenneth Söderhäll
Dr. John R. Whitaker

**Miembros del Jurado de Examen
Doctoral:**

Dr. John R. Witaker, Presidente
Dr. Alejandro M. Maeda Martínez, Vocal
Dr. Humberto Mejía Ruíz, Vocal
Dr. Ramón Pacheco Aguilar, Vocal
Dr. Ilie S. Racotta Dimitrov, Vocal
Dr. Fernando L. García Carreño, Secretario



Dr. Sergio Hernández Vázquez
Coordinador del Programa de Estudios de Posgrado

Para aquellos que han tocado mi corazón, mi alma y me hacen sentir vivo

A Martha, mi mamá

La tesis es también para quienes trabajan por la libertad, justicia y
democracia de México

Desde que tengo uso de razón, mi afición por el aprendizaje ha sido tan fuerte y violento que ni siquiera las recriminaciones de otras personas...ni mis propios reproches... me impidieron que siguiera esta inclinación natural que Dios me dió. Sólo El conoce el porqué, y también sabe que le he implorado que me quite la luz del discernimiento, que me deje únicamente la necesaria como para cumplir con su mandato ya que, según algunos, todo lo demás es excesivo para una mujer. Otros afirman que hasta es pernicioso.

-SOR JUANA INÉS DE LA CRUZ

Réplica al Obispo de Puebla (1691), que había criticado su trabajo erudito por ser inapropiado para su sexo

RESUMEN

Fueron encontradas actividades de peptidasas y proteinasas en el hepatopáncreas de crustaceos. Se identificó actividades de carboxipeptidasa A y B, aminopeptidasa, catepsina C, tripsina, quimotripsina y colagenasa en los sistemas digestivos de *Pleuroncodes planipes* y *Pacifastacus astacus*. Las colagenasas de crustaceos fueron serín proteinasas, demostrado por ensayos de inhibición. La hidrólisis de sustratos sintéticos por las preparaciones enzimáticas de los crustaceos fueron bajas y la identidad de las enzimas que hidrolizaron sustratos de quimotripsina y tripsina fueron parcialmente demostradas.

La quimotripsina del camarón *Penaeus vannamei* fue purificada. Esta quimotripsina tiene un peso molecular de 33.2 kDa y un punto isoeléctrico de 3.1. La enzima es termoestable a 25 y 37 °C y es sensible a pH ácido. La quimotripsina de camarón tiene un pH óptimo alcalino. La actividad de quimotripsina fue afectada por inhibidores de serín proteinasas pero no por inhibidores de quimotripsina de vertebrados como los de cetona de clorometilo. Las propiedades cinéticas de la quimotripsina de camarón muestran una baja eficiencia catalítica a sustratos sintéticos. La identidad de la quimotripsina fue demostrada por evidencia estructural y catalítica.

La tripsina de *Pacifastacus leniusculus* fue también purificada. La tripsina del langostino tiene un peso molecular de 18 kDa. El AND complementario que codifica para la tripsina fue aislado, amplificado, clonado y secuenciado. La enzima es sintetizada como zimógeno de acuerdo a la secuencia deducida de aminoácidos del péptido precursor putativo. Los constituyentes que determinan la actividad de tripsina fueron encontrados de manera conservada en la enzima de langostino, como es el sitio de reconocimiento específico. Los residuos de cisteína y los sitios de unión con calcio de la tripsina de langostino fueron mas similares a los de tripsina de bacteria que a los de vertebrados. No fue encontrada quimotripsina en el hepatopáncreas de *P. leniusculus*.

Las propiedades catalíticas, la secuencia de aminoácidos y la diversidad de las proteinasas de crustaceos apoyan la evolución divergente de las proteinasas de eucariotas.

La composición de proteasas de crustaceos cultivados fue determinada parcialmente con los resultados encontrados de las organismos estudiados. La estructura de las proteasas de crustaceos muestra que la digestión de proteínas es también regulada por la síntesis de zimógenos. La investigación en proteasas de camarones cultivados se ha enfocado en el efecto del alimento sobre la actividad enzimática y la digestibilidad proteica. Estas investigaciones podrían ser útiles en la optimización y manejo de los sistemas de cultivo. Las futuras líneas de investigación en las proteasas de crustaceos deberán incluir la suplementación de dietas, el control de calidad, los usos biotecnológicos y los marcadores fisiológicos.

PREFACIO

La tesis se basa en los siguientes artículos, los cuales serán referidos en el texto por números romanos:

I. García-Carreño, F. L. Hernández-Cortés, M.P. and Haard, N. 1994. Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and marine decapod. *J. Agricul. Food Chem.* 42, 1456-1461. *

II. Hernández-Cortés, P. Whitaker, J. and García-Carreño, F. 1997. Purification and characterization of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *J. Food Biochem.* In press.

III. Hernández-Cortés, M. Cerenius, L. García-Carreño, F. and Söderhäll, K. 1997. Purification and cDNA cloning of trypsin from *Pacifastacus leniusculus* hepatopancreas. To be submitted to *European Journal of Biochemistry*

IV. García-Carreño, F. and Hernández-Cortés M. 1997. Enzymes from the digestive system of shrimp I. State of the art and future trends in protein digestion. *La investigación de Peneidos en Iberoamerica. CYTED-CIBNOR.* In press*

*En estas publicaciones Hernández-Cortés hizo la misma contribución que García-Carreño.

CONTENIDO

RESUMEN	i
PREFACIO	ii
CONTENIDO	iii
ABREVIATURAS	iv
INTRODUCCION	
La diversidad y versitidad de las enzimas proteolíticas	1
Métodos para la identificación de proteasas	4
Proteasas digestivas de crustaceos	6
RESULTADOS Y DISCUSION	
Proteasas de crustaceos (PI)	8
Caracterización de la quimotripsina de camarón (PII)	9
Proteinasas del hepatopáncreas de langostino (PIII)	10
La investigación sobre proteasas en camarones cultivados (PIV)	13
DISCUSION GENERAL	15
CONCLUSIONES	18
PERSPECTIVAS	19
AGRADECIMIENTOS	20
REFERENCIAS	21

ABREVIATURAS

BAPNA	Benzoil-Arg- <i>p</i> -nitroanilida
CCT	Gly-Phe-NH ₂
LeuNa	L-Leu- <i>p</i> -nitroanilida
HA	Hippuryl-L-Arg
HPA	Hippuryl-L-Phe
PHMB	Acido benzoico <i>p</i> -hidroxi-mercúrico
PMSF	Fluoro de fenilmetilsulfonilo
SAAPFNA	Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> -nitroanilida
SBTI	Inhibidor de soya de la tripsina
TAME	Metil éster de <i>p</i> -toluenesulfonilo-Arg
TPCK	Cetona de tosil-Phe-clorometilo
ZPCK	Cetona de carbobenzoxi-Phe-clorometilo

INTRODUCCION

La diversidad y versatilidad de las enzimas proteolíticas.

Las proteasas son enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos. Estas enzimas juegan un papel importante en los procesos fisiológicos. La coagulación de la sangre de vertebrados involucra una cascada de activación de activación proteolítica de proteasas específicas que culmina con la transición del fibrinogeno a la fibrina (Furie and Furie, 1988). La acción fisiológica de algunos péptidos es regulada por la degradación de proteasas como la inactivación de la acetilcolina por la acetilcolinesterasa (Lu et al., 1996). Los precursores de proteínas son hidrolizados por proteasas para transformarlos en proteínas funcionales como las hormonas y los factores de crecimiento (Neurath, 1986). Las proteasas mejor caracterizadas son las enzimas pancreáticas por el interés que hay en la digestión de proteínas en animales incluidos el humano. La información sobre la cinética, inhibición, secuencia de aminoácidos y estructura de estas enzimas nos permite entender la función y mecanismo de catálisis.

La clasificación de proteasas está basada en la comparación de sus sitios activos, mecanismos de catálisis y estructura tridimensional (García-Carreño y Navarrete del Toro, 1997). Las proteasas se clasifican de acuerdo a mecanismos de catálisis y a la especificidad del sitio de hidrólisis. El primer grupo son las peptidasas o exoproteasas que hidrolizan en los enlaces de peptídicos extremos. El segundo grupo se denomina proteinasas o endoproteasas. Las proteinasas son enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos en el centro de la proteína. Las proteinasas se han clasificado de acuerdo al grupo funcional que es responsable por la actividad catalítica de la enzima y es nombrado en base a la naturaleza del aminoácido más prominente en el sitio activo. La posición del grupo catalítico ha sido determinada por una enzima

prototipo y los aminoácidos son numerados. La Unión Internacional de Bioquímica reconoce cuatro clases de proteinasas: serín (Asp-102, Ser-195 e His-57), cisteín (Cys-25, His-159 y Asp-158), aspártico (Asp-33 y Asp-213) y metalo proteinasas (Zn, Glu-270 y Tyr-248). Sin embargo, debido a diferencias en la posición catalítica, hay subdivisiones en las clases serín (Asp-32, Ser-221 e His-64) y metalo (Zn, Glu, 143 e His-231).

Las serín proteinasas son la clase de proteinasas mas versátiles porque están involucradas en diversos procesos fisiológicos (Neurath, 1986). La hidrólisis es posible porque las serín proteinasas tienen un sitio catalítico, un sitio de unión, un sitio específico de reconocimiento del sustrato y un sitio no específico para la unión del sustrato (Warshel et al., 1989). La especificidad de las serín proteasas es tal que, reconocen un grupo de aminoácidos específicos que forman el enlace peptídico. Esta especificidad está relacionada con la substitución de aminoácidos en el sitio primario de unión con el sustrato, P_1 , y diferencias menores en los sitios secundarios de unión.

Los aminoácidos que forman el enlace peptídico al centro de la proteína son hidrolizados selectivamente por las serín proteinasas. La quimotripsina hidroliza del lado carboxilo de grandes aminoácidos aromáticos, la tripsina hidroliza al lado de cadenas cargadas positivamente y la elastasa al lado de pequeñas cadenas sin carga (Branden y Tooze, 1991). La posición de los residuos que determinan la especificidad en las serín proteinasas también se conserva y corresponde a los aminoácidos 189, 216 y 226 como se indica por el sistema de numeración de la quimotripsina. La cadena específica del sustrato es orientada para coincidir en un sitio de la enzima que se denomina sitio específico. En la tripsina y quimotripsina, la posición 216 y 226 corresponde a residuos de Gly o Ala que permiten a las cadenas del sustrato penetrar al interior del sitio específico. En la elastasa, estas posiciones son reemplazadas por Val y Thr llenan la mayor parte del sitio de reconocimiento. La colagenasa de un

cangrejo tiene intercambiado la geometría del sitio activo de Gly-189 y Asp-226 comparada con Asp-189 y Gly-226 de tripsina de vertebrados (Tsu y Craik, 1996).

Las proteínas con producto de un proceso evolutivo de acuerdo con la similitud de sus secuencias de aminoácidos, su conformación, la homología de dominios, la comparación de sus sitios activos, los mecanismos de acción y sus estructuras tridimensionales (Neurath, 1984). Las proteínas surgieron por evolución convergente o divergente. La convergencia implica cambios adaptativos en entidades poco relacionadas parecen estar más relacionadas de lo que son. Proteínas tienen funciones, mecanismos o estructuras similares pero son diferentes en su secuencia de aminoácidos o estructura tridimensional aparecieron por evolución convergente (Doolittle, 1994). Por otra parte, similitudes en las secuencias de aminoácidos y estructura tridimensional implica evolución divergente de las proteínas.

Así, la caracterización de las secuencias de aminoácidos en proteínas es útil para entender la evolución de familias de genes. Las proteasas ejemplifican ambos procesos evolutivos. Las proteasas de mamíferos descendieron de ancestros comunes por evolución divergente (De Haen et al., 1975). Estas proteasas tienen similares funciones, sitios activos, secuencias de aminoácidos y estructuras tridimensionales. Sin embargo, proteasas de bacteria subtilisin tienen los mismos aminoácidos que forman el sitio catalítico pero se encuentran en diferente posición y la estructura tridimensional también es diferente respecto a la de vertebrados.

Se piensa que las variaciones de las serín proteasas de eucariotas surgieron por la duplicación de genes y mutaciones (Neurath, 1984). Es así como la especificidad apareció en este grupo de enzimas. Por procesos evolutivos divergentes, las proteasas de vertebrados adquirieron un mayor grado de especialización restringiendo su acción a un número selecto de enlaces peptídicos en sitios específicos de los sustratos proteicos (Neurath, 1984). Esta especialización está relacionada con la

función. Las proteasas digestivas hidrolizan proteínas a aminoácidos (Stroud, 1975). El proceso de coagulación de la sangre es regulado por diversas serín proteinasas secuencialmente activan ciertas proteasas que se encuentran en el plasma por proteólisis controlada (Furie and Furie, 1988).

Los patrones evolutivos de las proteínas pueden ser determinados a partir de sus secuencia de aminoácidos. Los análisis de secuencia de la misma proteína de especies diferentes genera información valiosa. Por lo tanto, la comparación de proteasas podría ayudar a explicar las relaciones filogenéticas entre organismos a nivel molecular.

Métodos para la identificación de proteasas

El método más fácil para distinguir entre proteasas específicas es la evaluación de la actividad con sustratos sintéticos. La detección de la actividad de proteasas específicas es posible con estos ensayos en mezclas de enzimas o muestras puras. Un sustrato sintético contiene un sitio susceptible de ser hidrolizado formado por el aminoácido para el cual la proteinasa es específica y de un grupo químico que se forma cuando la hidrólisis ocurre (Sarath et al., 1989). El grupo químico puede ser cromogénico, fluorogénico o marcado radioactivamente. La cantidad detectada está relacionada con la actividad de la enzima.

Las proteasas también pueden ser detectadas por medio de ensayos en fase sólida tal como la electroforesis. Las enzimas que se resuelven en geles pueden ser teñidas por su actividad enzimática (Othmar y Gersten, 1992a; Garcia-Carreño et al., 1993). Esta técnica se conoce como electroforesis de sustrato en gel. Las proteasas pueden ser analizadas sobre el gel por su actividad particular. La localización de las proteasas *in situ* es posible con sustratos sintéticos y proteicos. El uso de los sustratos sintéticos resulta en el desarrollo de color en el gel, si una proteinasa está

en la muestra. Bandas claras sobre el gel son visualizadas cuando se utilizan sustratos nativos como la gelatina (Paech et al., 1993z; Paech, et al., 1993b; Pourmotabbed et al., 1994) o caseína (García-Carreño et al., 1993; Rasner et al., 1995; Komatsu et al., 1996). El método de electroforesis de sustrato en gel es principalmente cualitativo. La separación en el gel y la detección por actividad enzimática da evidencia de la pureza. la presencia de isoenzimas, el peso molecular y sobre la enzima de interés (Othmar y Gersten, 1992b).

Un tercer método de identificación de proteasas es el uso de inhibidores específicos. Algunos inhibidores son específicos para una clase de proteinasas o selectivos de una proteinasa (Salvesen y Nagase, 1989). Los inhibidores ayudan a caracterizar los mecanismos de hidrólisis y clasificar proteinasas desconocidas. Los inhibidores reducen la actividad enzimática bloqueando los aminoácidos en el centro activo y los inactivadores quelando el catión involucrado en el sitio activo (García-Carreño, 1992; García-Carreño, 1996). Así, la reducción de la actividad en ensayos sólidos corrobora la clase de proteasa examinada (García-Carreño et al., 1993). La Tabla 1 muestra algunos sustratos para proteasas y sus inhibidores

Tabla 1.
Sustratos e inhibidores sintéticos para proteasas

Abreviatura	Descripción
PMSF, STBI	Inhibidores de serín proteinasas
TLCK	Inhibidor de tripsina
TPCK, ZPCK	Inhibidores de quimotripsina
LeuNA	Sustrato de leucin aminopeptidasas
HA	Sustrato de carboxipeptidasa B
HPA	Sustrato de carboxipeptidasa A
CCT	Sustrato de catepsina C
SAAPFNA	Sustrato de quimotripsina
BAPNA, TAME	Sustrato de tripsina

Proteasas digestivas de crustaceos

La digestión de la proteína en crustaceos es diferente porque no hay digestión química (ácida) o enzimática en el estómago y algunas de las funciones del hígado y el páncreas se combinan en un solo órgano conocido como el hepatopáncreas (Glass et al., 1989). El hepatopáncreas es el órgano responsable de la síntesis y secreción de proteasas digestivas en crustaceos (Gibson y Baeker, 1979). Dentro de las serín proteinasas, la tripsina se ha encontrado en el hepatopáncreas de crustáceos dulce acuícolas (Zwilling et al., 1975; Guizani et al., 1992; Garcia-Carreño y Haard, 1993; Kim et al., 1994) y marinos (Honjo et al., 1990; Lu et al., 1990; García-Carreño et al., 1994; Klein et al., 1996). La quimotripsina se ha encontrado en camarones (Tsai et al., 1986; Van Wormhoudt et al., 1992) pero en otros crustaceos no se ha encontrado (Gates y Travis, 1969; Galgani et al., 1984; Glass y Strark, 1994). La astacina y la carboxipeptidasa B son metalo proteinasas en langostino (Titani et al., 1987; Titani et al., 1984). Las cisteín proteinasas han sido caracterizadas en langosta y camarón (Laycock et al., 1989; Le Boulay et al., 1996). Otras actividades de proteasas han sido descritas en varios crustaceos pero no han sido purificadas y por tanto no totalmente caracterizadas.

Las serín proteinasas juegan un rol importante en el proceso digestivo de los crustaceos porque la desnaturalización ácida de las proteínas no existe. De acuerdo con Osnes (1985), las proteasas de crustaceos tienen menor especificidad comparada con las enzimas bovinas. Las serín proteinasas de crustaceos son capaces de hidrolizar proteína nativa como el colágeno (Iida et al., 1991; Tsu et al., 1994; García-Carreño et al., 1994; Roy et al., 1996), mientras las proteasas de vertebrados superiores no lo hacen (Guizani et al., 1992). La degradación del colágeno nativo en crustaceos adultos es muy útil porque ellos se alimentan de crustaceos pequeños que frecuentemente contienen cantidades relativamente grandes de colágeno nativo, por tanto, parece que

las serín proteinasas del hepatopáncreas de crustaceos están adaptadas a hidrolizar colágeno (Chen et al., 1991).

La especificidad de las proteinasas de crustaceos es menor que las de mamíferos, lo cual es demostrado por la hidrólisis de proteína de secuencia conocida. Una tripsina de cangrejo hidroliza no solo al lado del carboxilo de aminoácidos cargados positivamente, sino también entre los enlaces peptídicos 'Gly-Ile', 'Leu-Gly', 'Gly-Ile' y 'Ile-Ala' de sustratos sintéticos (Iida et al., 1991). La quimotripsina de *P. monodon* prefiere enlaces del lado carboxilo de residuos de tirosil, fenilalanil y leucil y en menor medida en residuos lisil, arginil y glutamil (Tsai et al., 1991).

El pH óptimo de las serín proteinasas de crustaceos es alrededor de 8 (Honjo et al., 1990). Estas son sensibles al pH ácido (Zwilling y Neurath, 1981; Hernández-Cortés et al., 1997a) y resistentes a la autólisis (Tsai et al., 1991). Estas enzimas tienen un punto isoeléctrico similar a otras proteinasas de invertebrados (Kim et al., 1994; Eberhardt, 1992). El mecanismo de catálisis es similar a las serín proteasas de mamíferos. El efecto de inhibidores y la baja eficiencia catalítica de las serín proteasas de crustaceos (Hernández-Cortés et al., 1997a; Hernández-Cortés et al., 1997b) muestra que los sitios secundarios de unión juegan un rol importante en el reconocimiento del sustrato (Tsai et al., 1986). Por esta razón, la clasificación de proteinasas de crustaceos es complicada. La combinación de las propiedades enzimáticas y la secuencia de aminoácidos, permitirá la determinación de la clase a la cual las proteinasas de crustaceos pertenecen cuando los ensayos usando inhibidores y sustratos sintéticos no proporcionan información suficiente.

RESULTADOS Y DISCUSION

Proteasas de crustáceos (P I)

Sustratos sintéticos fueron usados para caracterizar individualmente la actividad de proteasas. Actividad de peptidasas y proteinasas fueron encontradas en los extractos digestivos de crustáceo marino, *Pleurocondes planipes*, y dulce acuícola, *Pacifastacus astacus*. La caracterización se basó en la especificidad de las proteasas de vertebrados. Actividad de peptidasa como Leu-aminopeptidasa, carboxipeptidasa A y B, y catepsina C fue encontrada en los extractos de los crustaceos examinados. Actividad de tripsina y quimotripsina también fue encontrada (Tabla 2).

La actividad de la quimotripsina fue demostrada cuando se usó el sustrato sintético SAAPFNA. Las enzimas que hidrolizaron SAAPFNA tienen menor afinidad comparadas con las quimotripsinas de vertebrados. Los extractos digestivos de crustaceos no pudieron hidrolizar sustratos éster etil para quimotripsina de vertebrados (Hernández-Cortés, 1993). Cetonas de fenilclorometilo fallaron al inhibir la actividad de quimotripsina de crustaceos (García-Carreño y col., 1994; Hernández-Cortés y col., 1997a). Debido a la incapacidad de hidrolizar varios sustratos sintéticos para quimotripsina y el nulo efecto inhibitorio sobre la quimotripsina de crustaceos, otros han fallado en detectar la actividad de quimotripsina en sistemas digestivos de crustaceos (Glass and Stark, 1994).

Los extractos digestivos de crustaceos hidrolizaron colágeno. Las colagenasas digestivas fueron serin proteinasas como se muestra por inhibición con PMSF, contrastando con las colagenasas de vertebrados y bacterias las cuales son metalo proteinasas. Los resultados muestran que las proteinasas de crustaceos tienen diferentes propiedades catalíticas comparadas con las proteinasas de vertebrados.

Las enzimas hidrolizaron SAAPFNA y colágeno mostraron ser termoestables a 30 °C. Estas proteinasas retienen menos del 40% de su actividad después de ser incubadas por 60 minutos. Las enzimas tipo quimotripsina de crustáceos tienen un pH óptimo de 6 y el óptimo de las colagenasas es a pH 7.

Tabla 2
Actividad proteolítica en preparaciones de decápodos

Substrate	Crayfish	Red crab	Control	
LeuNa	0.0230	0.066	18.59	(Leucin aminopeptidasa)
HPA	31	124	144	(Carboxipeptidasa A)
HA	45	177	3568	(Carboxipeptidasa B)
CCT	0.093	0.163	11.25	(Catepsina)
SAAPFNA	0.022	0.255	1.009	(Quimotripsina)
BAPNA	0.65	9.46	881.2	(Tripsina)
COLLAGEN	1.819	0.985	2.453	(Colagenasa)

Caracterización de la quimotripsina del camarón blanco (P II)

La quimotripsina del hepatopáncreas del camarón blanco *Penaeus vannamei* fue purificada por medio de cromatografía de intercambio iónico y de interacción hidrofóbica. Un peso molecular de 33.2 kDa fue calculado usando electroforesis desnaturante. La enzima es un solo polipéptido y tiene un punto isoeléctrico de 3.1. La secuencia amino terminal de 30 amino ácidos fue determinada.

El pH óptimo de la quimotripsina del camarón blanco fue estimado alrededor de 8 y más del 80% de su actividad máxima es conservada entre pH 7 y 9. La actividad remanente fue del 72% cuando se incubó a pH 10 o pH 6 durante 40 minutos. La quimotripsina mostró sensibilidad al pH ácido, una total inactivación de la enzima se detectó a pH 3. La enzima retiene 84 % de su actividad después de 60 minutos de

incubación a 50 °C. Sin embargo, a quimotripsina del camarón retiene 100% de su actividad a 25 y 37 °C con el mismo tiempo de incubación.

Los valores cinéticos K_m y V_{max} de la quimotripsina del camarón blanco fueron similares a aquellos encontrados en la quimotripsina de *Penaeus monodon* (Tsai y col., 1991). Tiene baja eficiencia catalítica hacia sustratos sintéticos, pero hidroliza enlaces peptídicos en del lado carboxil de la fenilalanina como cualquier otra quimotripsina. El efecto del PMSF y STBI sobre la quimotripsina del camarón blanco confirma que se trata de una serin proteinasa. Sin embargo, algunos inhibidores para quimotripsinas de vertebrados como los de cetonas de clorometilo no redujeron la actividad de la quimotripsina del camarón en grado alguno (Tabla 3).

TABLA 3
Efecto de inhibidores de proteasas sobre quimotripsina de camarón y bovino

Compuesto	Proteasa afectada	Quimotripsina de <i>P. vannamei</i>	Quimotripsina de bovino
PMSF	Serino	99*	92
SBTI	Serino	100	100
TPCK	Quimotripsina	0	98
ZPCK	Quimotripsina	0	93

*Porcentaje de inhibición. Cada compuesto y la enzima fueron incubados por una hora a 25 °C. Alícuotas de esta mezcla fueron ensayadas con SAAPFNA

Proteinasas del hepatopáncreas de *Pacifastacus leniusculus* (P III)

Seis proteinasas fueron encontradas en el hepatopáncreas del langostino. Dos fueron purificadas después de cromatografías de afinidad e intercambio iónico. La proteinasa de 18 kDa fue identificada como tripsina porque fue inhibida por TLCK,

inhibidor de tripsina, hidroliza TAME, un sustrato de tripsina, y el extremo amino tiene una secuencia similar a la de otras tripsinas. La proteinasa mas pequeña (10 kDa) hidroliza caseína pero no sustratos de quimotripsina o elastasa.

La genoteca del hepatopáncreas del langostino fue tamizada (screened) con un clon que codifica para serín proteinasas el cual fue aislado de la genoteca del hemocito del langostino (Huan et al., 1997). Un fragmento de aproximadamente 900 pares de bases fue aislado, amplificado y clonado. Esta subclona fue secuenciada y la secuencia de aminoácidos deducida fue homóloga a otras tripsinas. La subclona codifica para una proteína de 268 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos presuntiva tiene una región hidrofóbica de 15 aminoácidos correspondientes al péptido señal, un péptido precursor de 13 residuos y un sitio de corte antes de una Lys entre los residuos 32 y 33. Esto apoya que la tripsina de langostino es sintetizada como zimógeno como otras serín proteinasas de crustaceos (Aspan and Söderhäll, 1990). Al momento no se dispone aun de un modelo de activación de las proteinasas digestivas de crustaceos.

La tripsina del langostino presenta los elementos estructurales de las serín proteasas como el sitio catalítico (His-57, Asp-102 y Ser-195), los residuos que lo estabilizan (Ile-16 y Asp-102) y los residuos que determinan los sitios primarios y secundarios de unión (Asp-189, Gly-216 y Gly-226) (Fig. 1). El número y la posición de los residuos de cisteína en *Pacifastacus* coinciden con otras tripsinas. Estos incluyen a los segmentos Cys 42 y 58 (His), Cys 168 y 182 (Met) y Cys 191 y 220 (Ser). Sin embargo, los residuos de cisteína localizados en la posición 22, 157, 127 y 232 coinciden solo en vertebrados. La unión disulfuro Cys 136-201 es típicamente característica de serín proteainasas de vertebrados y también se encuentra presente en la tripsina de camarón (Klein, y col., 1996), quimotripsina de abulón (Groppe y Morse, 1993) y en la serín proteainasa del hemocito de *Pacifastacus* (Huang y col., 1997). La tripsina del hepatopáncreas del langostino no presenta esta unión.

El calcio determina algunos parámetros funcionales de las serín proteinasas como la estabilidad térmica, resistencia a la degradación y activación. Los sitios de unión con calcio también se encuentran conservados. Sin embargo, las tripsinas de bacterias y crustáceos tiene sitios diferentes de unión con el calcio localizados en Asp-165 y Glu-230 que difieren a las posiciones de las tripsina de vertebrados (Rypniewski et al., 1994).

	189	o	*		216	o	226
Elastasa-porcina	S	C	S	C	V	C	T
Colagenasa-cangrejo	G	C	S	y	G	C	D
Quimotripsina-camarón	S	C	S	l	G	C	A
Quimotripsina-bovina A	S	C	S	C	G	C	A
Quimotripsina-bovina B	S	C	S	C	G	C	G
Tripsina- <i>Pacifastacus</i>	D	C	S	a	G	C	G
Tripsina-langostino	D	C	S	a	G	C	G
Tripsina-camarón	D	C	S	C	G	C	G
Tripsina-bovina	D	C	S	C	G	C	G

↑

Fig 1. Sitio específico de reconocimiento de sustrato de serín proteasas. Los círculos indican los residuos conservados de cisteína que forman un puente disulfuro. Los números indican la posición del sitio de reconocimiento específico y los residuos de aminoácidos que lo forman están en negritas. El asterisco indica el sitio catalítico de la serína. La flecha indica un sitio conservado de cisteínas en vertebrados, las letras en minúsculas indican las cisteínas no conservadas. Las secuencias se tomaron de la base de datos SWISS-PROT.

La presencia de quimotripsina en crustáceos fue claramente demostrada (Van Wourmouht y col., 1992; García-Carreño y col., 1994; Hernández-Cortés y col., 1997a). En *P. monodon* fue encontrada actividad de quimotripsina (Tsai y col., 1986) y se encontraron clones que codifican para esta enzima (Hernández-Cortés y col., 1997b).

La quimotripsina fue también buscada en el hepatopáncreas del langostino. No se encontró actividad de quimotripsina o detección de clones positivos.

La investigación sobre proteasas en camarones cultivados (P IV)

Las áreas donde la investigación de proteasas de camarones cultivados se enfoca incluyen: 1) estudios descriptivos y de caracterización), 2) efecto del alimento sobre la actividad enzimática 3) digestibilidad de la proteína y 4) tecnología de alimentos.

Existen descripciones generales y revisiones sobre los sistemas digestivos de crustaceos cultivados (Dall, 1992; Brow, 1995) y listas de enzimas que son sintetizadas por estos organismo (Lovett y Felder, 1990a). Sin embargo, pocas proteasas han sido completamente caracterizadas. Por ejemplo, proteasas digestivas como la tripsina (Klein y col., 1996), la quimotripsina (Hernández-Cortés y col., 1997a) y la catepsina-L (Le Boulay y col., 1996) son conocidas de varias proteasas presentes en el hepatopáncreas de camarón (Fig. 2). Una caracterización total es necesaria para la identificación de proteasas, propiedades enzimáticas y estudios comparativos incluyendo los ontogénicos (Lovett and Felder 1990b).

La fuente de proteína (Maugle y col., 1982; Lee y col., 1984) y la calidad de la proteína del alimento tienen un efecto sobre la actividad de las proteasas de los sistemas digestivos de camarones (Ezquerro y col., 1997a). El efecto sobre la actividad de las proteasas parecer ser una compensación del organismo a diferentes dietas (Rodríguez y col., 1994). Las variaciones de la actividad de las proteasas hacen a estas enzimas candidatas para indicadores bioquímicos del estado fisiológico. Las proteasas de organismos acuáticos son responsables de la deteriorización de los productos pesqueros como el ennegrecimiento o melanosis (Jiang et al., 1991), el

reblandecimiento (Kim et al., 1992) y autólisis (Kawamura et al., 1984); por lo tanto, la fuente proteica que se da a los crustaceos cultivados es también importante.

El último tópico sobre la digestión de crustaceos cultivados es la calidad de la proteína, la cual es una de las preocupaciones de los productores. Diferentes dietas han sido evaluadas por la digestibilidad protéica (Akiyama y col., 1989). Garcia-Carreño y col., (1997) han desarrollado un método *in vitro* para la digestibilidad de proteína en alimento para camarón. La correlación con los experimentos *in vivo* son altos (Ezquerria y col., 1997b).

Futuras líneas en la investigación de proteasas digestivas deberán incluir estudios de suplementación de dietas, vida de anaquel de organismos capturados, regulación metabólica y elementos estructurales.

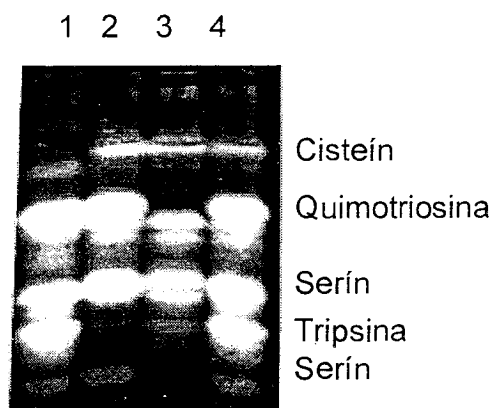


Fig. 2 Electroforesis de sustrato en gel de proteasas digestivas de camarón. Extractos del hepatopáncreas fueron incubados con diferentes inhibidores para detectar la clase de proteínasa. La identidad de las proteinasas fue detectada por el efecto del inhibidor. El PHMB reduce cisteín proteínasa (carril 1); el TLCK es un inhibidor de tripsina (carril 2); el PMSF reduce la actividad de serín proteinasas incluyendo tripsina y quimotripsina (carril 3). El extracto de hepatopáncreas del camarón sin inhibidor se muestra en el carril 4.

DISCUSION GENERAL

La digestión de la proteína en crustaceos es efectuada por la hidrólisis de los enlaces peptídicos por peptidasas y proteinasas. Los resultados en el hepatopáncreas de la langostilla y el langostino muestran que los crustaceos tienen las principales proteasas digestivas (PI). Ezquerria et al. (1997a, 1997c) también encontró actividad de tripsina, quimotripsina y aminopeptidasa usando sustratos sintéticos en el hepatopáncreas de camarón. La habilidad de las serín proteinasas de crustaceos para degradar colágeno nativo fue demostrada con los resultados de la actividad colagenolítica de las preparaciones de los hepatopancrea de la langostilla y el langostino. Sin embargo, la hidrólisis de los sustratos sintéticos por las preparaciones enzimáticas de los crustaceos fueron bajas comparadas con las de vertebrados, especialmente las del langostino. Debido a la amplia especificidad de las proteasas de crustaceos y la habilidad de las serín proteinasas para degradar colágeno, las enzimas que hidrolizaron los sustratos sintéticos de quimotripsina y tripsina fueron purificadas y caracterizadas para determinar su identidad y propiedades.

Una enzima es clasificada de acuerdo con su mecanismo de catálisis. La quimotripsina de camarón hidroliza enlaces peptídicos en el lado carboxilo de la fenilalanina coincidiendo con la definición de la quimotripsina (PII). También tiene propiedades catalíticas al igual que otras quimotripsinas como un pH óptimo alcalino y una termoestabilidad media como la encontrada para las enzimas de langostilla que hidrolizaron SAAPFNA (PI). La secuencia amino terminal corresponde a la secuencia deducida de aminoácidos de la quimotripsina de camarón (Sellos and Van Wourmhoudt, 1992). Debido a la baja especificidad de las proteasas de crustáceos hacia sustratos e inhibidores sintéticos, se requirió evidencia estructural para definir la actividad enzimática. La quimotripsina tiene que presentar el sitio de reconocimiento Ser-189, Gly-226 y Ala-226 lo cual es sustentado por la secuencia deducida de aminoácidos de la quimotripsina de camarón (Sellos and Van Wourmhoudt, 1992). Sin

embargo, esta quimotripsina tiene baja especificidad a inhibidores y sustratos sintéticos lo que refleja que los sitios secundarios de unión tienen un papel importante en el reconocimiento del sustrato. La quimotripsina de camarón tiene un punto isoeléctrico ácido y es a su vez sensible a éste como otras quimotripsinas de organismos acuáticos como la de poliquetos (Eberhardt, 1992) y bacalao (Kristjansson et al., 1995).

La tripsina hidroliza enlaces peptídicos del lado carboxilo de aminoácidos cargados positivamente. La enzima purificada del hepatopáncreas del langostino hidrolizó al lado carboxilo de arginina (PIII). La secuencia amino terminal correspondió a la secuencia deducida de aminoácidos de la tripsina de langostino. Los residuos que determinan la actividad de tripsina están presentes en la secuencia deducida de aminoácidos de la enzima del langostino como es la activación del zimógeno, el sitio catalítico y los puentes disulfuro. La especificidad de la tripsina es determinada por Asp-189 que se encuentra en el fondo del sitio específico de reconocimiento y es requerida para la interacción con arginina y lisina (Rypniewski et al., 1994). La especificidad de la tripsina de langostino es también determinada por Asp-189. sin embargo esta enzima también tiene baja especificidad a sustratos sintéticos. El número de aminoácidos reemplazados y los reemplazos conservativos indican que la tripsina de langostino tiene mayor homología con la tripsina de bacterias que con las de vertebrados.

No fue encontrada quimotripsina en *Pacifastacus*. Esta enzima tampoco se encuentra en el langostino *Astacus* (Brown, 1995). *Astacus* tiene una metalo proteinasa, la astacina, la cual hidroliza del lado carboxilo de residuos leucina, fenilalanina y tirosina (Ströker et al., 1990). La astacina podría compensar la ausencia de quimotripsina porque hidroliza al lado de aminoácidos aromáticos como lo hace esta última. Una proteinasa con el peso molecular de la astacina fue encontrada en *Pacifastacus* pero su identidad no ha sido determinada aun. La baja hidrólisis de SAAPFNA por la preparación enzimática del hepatopáncreas de langostino (PI) podría ser un artefacto.

La estructura de la tripsina del langostino, la ausencia de la quimotripsina en éste, las propiedades catalíticas de la quimotripsina de camarón y la habilidad de las serin proteinasas de crustaceos para hidrolizar colágeno sugieren que éstas enzimas podrían ser un punto de divergencia anterior a las ramas que dieron origen a la tripsina y quimotripsina de vertebrados.

Los resultados de esta investigación contribuyen a clarificar la composición de enzimas de crustaceos cultivados (PIV). Las propiedades catalíticas encontradas en camarón, langostilla y langostino servirán como referencia a los estudios bioquímicos de nuevas proteasas en otros crustaceos. Las características catalíticas de la quimotripsina de camarón como el amplio espectro de hidrólisis de enlaces peptídicos, la sensibilidad al ácido y sus propiedades termoestable medias la hacen candidata para aplicaciones en la tecnología de alimentos. Los aspectos prácticos de la caracterización de proteasas de crustaceos pueden explicar como digieren éstos la proteína. La tripsina y quimotripsina no son las únicas proteinasas en los peneidos y los crustaceos de agua dulce parecen tener otras con mayor especificidad; por lo tanto, la digestibilidad de proteína tiene que considerar otras proteinasas. La activación de zimógenos y la presencia de inhibidores tiene que ser investigada para entender como la digestión es regulada en estos organismos. Finalmente, si la vida de anaquel de los productos pesqueros esta siendo determinada por proteasas endógenas, la investigación sobre la regulación de éstas ayudará a incrementar la calidad de estos productos.

CONCLUSION

La digestión de proteínas por los crustáceos es llevada a cabo por proteinasas y peptidasas. Las serin proteinasas de crustáceos hidrolizan colágeno. La especificidad de las proteasas de crustáceos hacia sustratos sintéticos es baja. Entre las serin proteinasas, la quimotripsina estuvo presente en decápodos marinos como el camarón *Penaeus vannamei*. Esta quimotripsina tiene un pH óptimo alcalino y un punto isoeléctrico ácido. Otras características cinéticas de la quimotripsina del camarón incluyen sus propiedades termoestables medias y su sensibilidad a pH ácido. La identidad de la quimotripsina fue demostrada tanto por su mecanismo catalítico como por evidencia estructural de la enzima pura.

La tripsina es otra serin proteinasa que los crustáceos tienen. La estructura primaria de la tripsina de *Pacifastacus* apoya estudios previos de proteinasas de crustáceos que son sintetizadas como zimógenos. Las tripsinas de crustáceos comparten la mayor parte de las características moleculares con las proteinasas de otras especies. Estas características incluyen la región catalítica, el sitio de reconocimiento del sustrato y seis residuos de cisteína conservados. La identidad de la tripsina fue demostrada por la secuencia y posición de los aminoácidos que determinan la especificidad de tripsina. Los sitios de unión con calcio y el número de residuos de cisteína no conservados, muestran que las tripsinas de crustáceos son más similares a las tripsinas de bacterias que a las de vertebrados. La quimotripsina no fue encontrada en *Pacifastacus*.

La diversidad de las proteasas de crustáceos muestran que la evolución de las proteasas tiene más de un punto de divergencia. Esto es apoyado por la presencia de peptidasas y proteinasas como en vertebrados, la capacidad de hidrolizar colágeno por las serin proteinasas de crustáceos, las propiedades catalíticas de la quimotripsina de camarón, la estructura de la tripsina de langostino y la ausencia de quimotripsina en esta especie.

La presente caracterización de las proteasas de crustáceos y la futura investigación ayudará a los sistemas de cultivo a través de mejores dietas, suplementación de las mismas y control de calidad de productos pesqueros vivos y almacenados. Las características de las proteasas de crustáceos las hacen también interesantes en los procesos de tecnología de alimentos.

PERSPECTIVAS

Varias áreas en la investigación de proteasa de crustáceos pueden ser investigadas. El primer objetivo debería ser un trabajo extra en la bioquímica relacionada a la caracterización de proteasas. En particular la tripsina y quimotripsina debe ser examinada por actividad colagenolítica para determinar la participación de las serín proteinasas en la degradación del colágeno. La identidad de las proteasa no purificadas en crustaceos tiene que ser también determinada. Las propiedades catalíticas son una condición para el entendimiento de la digestión de proteína. La regulación de proteasa es un tarea que deberá incluir la activación de zimógenos, inhibidores, estimuladores y expresión génica. En esta dirección, la sustitución de aminoácidos por mutación dirigida complementará los estudios de función. La caracterización de las proteasas de crustaceos deberá estar ligada a aplicaciones biotecnológicas. La investigación de la estructura como la cristalografía de la quimotripsina y tripsina incrementará el conocimiento de sus propiedades funcionales. El énfasis en las secuencias de nuevas proteasas de crustaceos contribuirá a establecer relaciones filogenéticas. En este punto, la astacina tiene que ser buscada en varios crustaceos para determinar cuando apareció esta enzima. Finalmente, deberán incluirse estudios sobre la ontogenia de proteasas de crustaceos y estudios comparativos.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi gratitud a quienes me apoyaron y colaboraron conmigo, en particular:

Al Dr. Fernando García Carreño por su continuo estímulo para involucrarme en el disfrute de la ciencia, por su amistad y enseñarme las reglas no escritas de la investigación.

Al comité tutorial por impulsar y guiar mi trabajo: Dr. Edmundo Brito de La Fuente y Dr. Ramón Pacheco Aguilar. Gracias particularmente al Profesor Kenneth Söderhäll y Profesor John Whitaker por mi entrenamiento en sus laboratorios. Aprender con ellos fue un honor y un placer. Las gracias son extensivas al Dr. Lage Cerenius por su supervisión en la parte molecular del trabajo.

Los nuevos miembros del comité de tesis me ayudaron a perfeccionar el manuscrito: Dr. Alejandro Maeda Martínez, Dr. Humberto Mejía Ruíz y Dr. Ilie Racotta Dimitrov. Gracias por su tiempo e interés en mi trabajo.

Una mención especial a la Dra. Gloria Yépez Plascencia, el Dr. Francisco Vargas Albores y su grupo en CIAD, Hermosillo. Sus útiles consejos durante estos años han sido determinantes para mi.

A los colegas y trabajadores del CIBNOR, en especial al Dr. Ellis Glazier por su edición en la versión en inglés del manuscrito y la gente de nuestro laboratorio por todos los buenos momentos.

A Ednucha, Manolo, Kallaya y Ann por compartir conmigo mas allá de los días de trabajo. Mis amigos fuera del laboratorio se rien de mí, no creen lo que digo de mi misma y siempre están señalando mis errores. Gracias a Karina, Joath, Memo, Gaviota, He-tor, Rolando, Carlos, Maggi, Aurelio y Ana Luisa por tener fe en mi.

Martha, Larissa, Juan L., Juan J. y el resto de mi familia me hacen sentir que siempre están conmigo no importando donde me encuentre yo. Miguel, te amo por tantas cosas pero sobre todo por nuestra complicidad.

La gente trabajadora de México, con la quien estoy verdaderamente en deuda, financió mi educación de posgrado a través de la beca No. 87144 y el apoyo No. 3589-N a Fernando García del Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología. Parte de esta investigación fue también financiada por un apoyo del Consejo de Investigación Científico Sueco y del Consejo de Investigación Agrícola y Forestal Sueco a Kenneth Söderhäll.

REFERENCIAS

- Akiyama, D. M. Dominy, W.G. Lawrence, A.L. and Robinson, E.H. 1989. Apparent digestibility of feedstuffs by the marine shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Nippon Suisan Gakkaishi. 59, 91-98.
- Aspan, A. and Söderhäll, K. 1990. Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells, and its activation by an endogenous serine proteinase. Insect. Biochem. 21, 263-373.
- Branden, C. and Tooze, J. 1991. An example of enzyme catalysis: serine proteinases. In : Introduction to Protein Structure. Garland Publishing, Inc. London. pp 231-246.
- Brown, P. 1995. Physiological adaptations in the gastrointestinal track of crayfish. Amer. Zool. 35, 20-27.
- Chen, Y. Lu, P. and Tsai, I. 1991. Collagenolytic activity of crustacean midgut serine proteases: comparison with bacterial and mammalian enzymes. Comp. Biochem. Physiol. 100B, 763-768.
- Dall, W. 1992. Feeding, digestion and assimilation in Penaeidae. In: Proceedings of the Aquaculture Nutrition Workshop. Salamander Bay, 15-17 April. 1991. NSW Fisheries. Australia. 57-63.
- De Haen, C. Neurath, H. and Teller, D. 1975. The phylogeny of trypsin-related serine proteases and their zymogens. New method for the investigation of distant evolutionary relationships. J. Mol. Biol. 92,225-259.
- Doolittle, R. 1994. Convergent evolution: the need to be explicit. TIBS. 19, 15-19.
- Eberhardt, J. 1992. Isolation and characterization of five serine proteases with trypsin-, chymotrypsin- and elastase-like characteristics from the gut of the lugworm *Arenicola marina* (L.) (Polychaeta). J. Comp. Physiol B. 162,159-167.
- Ezquerro, M. J. García-Carreño, F.G. and Haard, N. 1997a. Effects of feed diets on digestive proteases from the hepatopancreas of white shrimp (*Penaeus vannamei*). J. Food Biochem. In press
- Ezquerro, J. M. García-Carreño, F.L. Civera, R. and Haard, N.F. 1997b. pH-stat method to predict digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture. In press.
- Ezquerro, J.M. García-Carreño, F.L. Arteaga, G. and Haard, N.F. 1997c. Aminopeptidase activity from the hepatopancreas of the white shrimp (*Penaeus vannamei*) fed with different diets. Submitted to J. Food Biochem.
- Furie, B. and Furie, B. 1988. The molecular basis of blood coagulation. Cell 53, 505-518.

- Galgani, F. Benyamin, Y. and Ceccaldi, H. 1984. Identification of digestive proteinases of *Penaeus kerathurus* (Forsk.) a comparison with *Penaeus japonicus* Bate. *Comp. Biochem. Physiol* 78, 355-361.
- García-Carreño, F. 1991. Proteases in food technology. *Biotechnol. Edu.* 2, 150-153.
- García-Carreño, F. 1992. Protease inhibition in theory and practice. *Biotechnol. Edu.* 3, 145-150.
- García-Carreño, F. 1996. Proteinase inhibitors. *Trends Food Sci. Technol.*
- García-Carreño, F. and Haard, N. 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *J. Food Biochem.* 17, 97-113.
- García-Carreño, F. Dimes, L. and Haard, N. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214, 65-69.
- García-Carreño, F. L. Hernández-Cortés, M.P. and Haard, N. 1994. Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and marine decapod. *J. Agricul. Food Chem.* 42, 1456-1461.
- García-Carreño, F. and Navarrete del Toro, M. 1997. Classification of proteases without tears. *Biochem. Edu.* 25. In press.
- García-Carreño, F.L. Navarrete del Toro, A. and Ezquerro, M. 1997. Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility in vitro. I. Effect of protease inhibitors in protein ingredients. *J. Marine Biotechnol.* 5, 36-40.
- García-Carreño, F. and Hernández-Cortés M. 1997. Enzymes from the digestive system of shrimp I. State of the art and future trends in protein digestion. *La investigación de Peneidos en Iberoamerica.* CYTED-CIBNOR. In press
- Gates, B and Travis, J. 1969. Isolation and comparative properties of shrimp trypsin. *Biochemistry* 8, 4483-4489.
- Gibson, R. and Barker P. 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 17, 197-204.
- Glass, H. MacDonald, R. Moran, R. and Stark, J. 1989. Digestion of protein in different marine species. *Comp. Biochem. Physiol.* 94B, 607-611.
- Glass, H. and Stark, J. 1994. Protein digestion in the European lobster, *Homarus gammarus* (L.) *Comp. Biochem. Physiol.* 108B, 225-235.
- Groppe, J. and Morse, D. 1993. Molluscan chymotrypsin-like protease: structure, localization and substrate specificity. *Arch. Biochem. Biophys.* 305, 159-169.

- Guizani, N. Marsahl, E. and Wei, C. 1992. Purification and characterization of a trypsin- like enzyme from the hepatopancreas of crayfish (*Procambarus clarkii*). *Comp. Biochem. Physiol.* 130B, 809-815.
- Hernández-Cortés, M. P. 1993. Proteinases con actividad de quimotripsina y colagenasa en langostilla *Pleurocondes planipes*. Bs Thesis. Universidad Autonoma de Baja California Sur, La Paz, Mexico.
- Hernández-Cortés, P. Whitaker, J.R. and García-Carreño, F. 1997a. Purification and characterization of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *J. Food Biochem.* In press.
- Hernández-Cortés, M. Cerenius, L. García-Carreño, F. and Söderhäll. K. 1997b. Purification and cDNA cloning of trypsin from *Pacifastacus leniusculus* hepatopancreas. To be submitted to *European J. Biochemistry*.
- Honjo, I. Kimura, S. and Nonaka, M. 1990. Purification and characterization of trypsin-like enzyme from shrimp *Penaeus indicus*. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 56,1627-1634.
- Huang, T. Söderhäll, K. and Cerenius L. 1997 Cloning and expression analysis of a cDNA encoding a masquerade-like protein, a serine proteinase homologue from crayfish hemocytes. *FEBS Lett.* In press.
- Iida, Y. Nakagawa, T. and Nagayama, F. 1991. Properties of collagenolytic proteinase in Japanese spiny lobster and horsehair crab hepatopancreas. *Comp. Biochem. Physiol.* 98B, 403-410
- Jiang, S. Moody, M. Chen H. 1991. Purification and characterization of protease from digestive tract of grass shrimp (*Penaeus monodon*) *J. Food Sci.* 56, 322-326.
- Kawamura, Y. Nishimura, K. Matoba T. and Yonezawa, D. 1984. Effects of protease inhibitors on the autolysis and protease activities of antarctic krill. *Agric. Biol. Chem.* 48, 923-930.
- Kim, H.R. Meyers, S.P. and Godber, J. 1992. Purification and characterization of anionic trypsin from the hepatopancreas of crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1303B, 391-398.
- Kim, H. Meyers, S. Pyeun, J. and Godber, S. 1994. Enzymatic properties of anionic trypsin from the hepatopancreas of crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem Physiol.* 107B, 197-203.
- Klein, B. Le Moullac, G. Sellos, D. and Van Wormhoudt, A. 1996. Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Use in assessing gene expression during the moult cycle. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 28, 551-563.
- Komatsu, M. Matsumoto, W. and Hayashi, S. 1996. Protease activity appeared after trypsin treatment of the purified vitellogenin from eel *Anguilla japonica* *Comp. Biochem. Physiol.* 113B, 561-571.

- Kristjansson, M. Gudmundsdottir, S. Fox, J. and Bjarnasom, J. 1995. Characterization of a collagenolytic serin protease from the Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.* 110B, 707-717.
- Laycock, M. Hiram, T. Hasnain, S. Watson, D. and Storer, A. 1989. Purification and characterization of a digestive cysteine proteinase from the American lobster (*Homarus americanus*). *Biochem J.* 263, 439-444.
- Le Boulay, C. Van Wormhoudt, A. and Sellos, D. 1996. Cloning and expression of cathepsin L-like proteinases in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* during the intermolt cycle. *J. Comp. Physiol* 166B, 310-318.
- Lee, P.G. Smith, L.L. and Lawrence, A. L. 1984. Digestive proteases of *Penaeus vannamei* Boone: Relationship between enzyme activity, size and diet. *Aquaculture.* 42, 225-239.
- Lovett, D. and Felder, D. 1990a. Ontogenic changes in enzyme distribution and midgut function in developmental stages of *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Biol. Bull.* 178, 160-174.
- Lovett, D. and Felder, D. 1990b. Ontogenic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) *Biol. Bull.* 178, 144-159.
- Lu, P. Liu, H. and Tsai, I. 1990. The midgut trypsins of shrimp (*Penaeus monodon*) High efficiency toward native protein substrates including collagens. *Biol. Chem. Hoppe-Syler.* 371, 851-859.
- Lu, B. Gerard, N. Kolakowski, L. Finco, O. Carrol, M. Gerard, C. 1996. Neural endopeptidase modulates septic shock. *Annals New York Acad. Sci.* 780, 156-163.
- Maugle, P.D., Deshimaru, D., Katayama, T. and Simpson, K.L. 1982. Effect of short-necked clam diets on shrimp growth and digestive enzyme activities. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 48, 1759-1764.
- Neurath, H. 1984. Evolution of proteolytic enzymes. *Science.* 224, 350-357.
- Neurath, H. 1986. The versatility of proteolytic enzymes. *J. Cell. Biochem.* 32, 35-49.
- Neurath, H. 1989. The diversity of proteolytic enzymes. In: *Proteolytic enzymes* (R. Beynon and J. Bond, eds) IRL Press Oxford, England p 1-13.
- Osnes, K. 1985. Peptide hydrolases of antarctic krill *Euphasia superba*. Ph.D. Thesis. University of Trondeheim, Norway.
- Othmar, G. and Gersten, D. 1992a. Staining for enzymatic activity after gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 203, 1-21.

Othmar, G. and Gersten, D. 1992b. Detection of enzymatic activity after polyacrylamide gel electrophoresis and agarose gel isoelectric focusing. In : Enzyme Assays (Eisenthal, R. and Danson, J. eds.). IRL Press NY. 217-253.

Paech, C. Christianson, T. and Maurer, K. 1993a. Zymogram of proteases made with developed film from nondenaturing polyacrylamide gels after electrophoresis. Anal. Biochem. 208, 249-254

Paech, C. Christianson, T. and Bläsigg, S. 1993b. Enhanced zymography of proteases. Anal. Biochem. 213, 440-441.

Pourmotabbed, T. Solomon, T. Hasty, K. and Mairnardi, C. 1994. Characteristics of 92 kDa type IV collagenase/gelatinase produced by granulocytic leukemia cells: Structures, expression of cDNA in *E. coli* and enzymatic properties. Biochim. Biophys. Acta. 1204, 97. -107.

Rasner, J. Posner, A. and Wang, K. 1995 Casein zymography: A method to study μ -calpain, m-calpain, and their inhibitory agents. Arch. Biochem. Biophys. 319, 211-216.

Rodriguez, A. Le Vay, L. Mourente, G. and Jones, D. 1994. Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. Marine Biol. 118, 45-51.

Roy, P. Colas, B. and Durand, P. 1996. Purification, kinetic and molecular characterizations of a serine collagenolytic protease from greenshore crab (*Carcinus maenas*) digestive gland. Comp. Biochem. Physiol. 115B, 87-95.

Rypniewski, W. Perrakis, A. Vogias, C. and Wilson, K. 1994. Evolutionary divergence and conservation of trypsin. Prot. Engin. 7, 57-64.

Salvesen, G. and Nagase, H. 1989. Inhibition of proteolytic enzymes. In: Proteolytic Enzymes (R. Beynon and J. Bond eds) IRL Press Oxford, England p 83-104.

Sarath, G. De La Motte, R. and Wagner, F. 1989. Protease assay methods In: Proteolytical enzymes (R. Beynon and J. Bond eds) IRL Press Oxford England p 25-55.

Sellos, D. and Van Wormhoudt, A. 1992. Molecular cloning of a cDNA that encodes a serine protease with chymotryptic and collagenolytic activities in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). FEBS. 309, 219-224.

Stöcker, W. Ng, M. Auld, D. 1990. Fluorescent oligopeptide substrates for kinetic characterization of the specificity of *Astacus* protease. Biochemistry 29, 10418-10425.

Stroud, R. 1975. A family of protein-cutting proteins. Sci. Am. 231, 74-89

Titani, K. Ericsson, L. Kumar, S. Jakob, F. Neurath, H. and Zwilling, R. 1984. Amino acid sequence of crayfish (*Astacus fluitatilis*) carboxypeptidase-B. Biochemistry 23, 1245-1250.

- Titani, K. Torff, H. Hormerl, S. Kumar, S. Walsh, K. Rödl, J. Neurath, H. and Zwilling, R. 1987. Aminoacid sequence of a unique protease from the crayfish *Astacus fluvialis*. *Biochemistry* 26, 222-226.
- Tsai, I. Liu, H. and Chuang, K. 1986. Properties of two chymotrypsins from the digestive gland of prawn *Penaeus monodon*. *FEBS Lett.* 203, 257-261.
- Tsai, I. Lu, P. and Chuang, J. 1991. The midgut of shrimps *Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus penicillatus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1080, 59-67.
- Tsu, C. Perona, J. Schellenberger, V. Turck, C. and Craik, C. 1994. The substrate specificity of *Uca pugilator* collagenolytic serine proteases 1 correlates with the bovine type I collagen cleavage sites. *J. Biol. Chem.* 269, 19565-19572.
- Tsu, C. and Craik, C. 1996. Substrate recognition by recombinant serine collagenase 1 from *Uca pugilator*. *J. Biol. Chem.* 271, 11563 -11570
- Van Wormhoudt, A. Chevalier, P. and Sellos, D. 1992. Purification, biochemical characterization and N-terminal sequence of a serine-protease with chymotryptic and collagenolytic activities of a tropical shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 103B, 675-680.
- Warshel, A. Naray-Szabo, G. Sussman, F. and Hwang, J. 1989. How do serine proteases really work? *Biochemistry* 28, 3629-3637
- Zwilling, R. Neurath H. Ericsson, L. H. and Enfield, D. L. 1975. The amino terminal sequence of an invertebrate trypsin (Crayfish *Astacus leptodactylus*): Homology with other serine proteases. *FEBS Lett.* 60, 247-249.
- Zwilling, R. and Neurath, H. 1981. Invertebrate proteases. *Methods Enzymol.* 80, 633-644.