



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**EFFECTO DE AGENTES QUÍMICOS Y  
PROTEOLÍTICOS EN LA ACTIVIDAD Y LA  
CONFORMACIÓN DE LA CATEPSINA D1 DE  
LANGOSTA AMERICANA (*Homarus americanus*).**

TESIS

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

Orientación en Biotecnología

P r e s e n t a

**Iván Rodríguez Siordia**

La Paz, Baja California Sur, diciembre, 2016.

### ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 11 del mes de noviembre del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**“Efecto de agentes químicos y proteolíticos en la actividad y la conformación de la CD1 de langosta americana (*Homarus americanus*)”**

Presentada por el alumno:

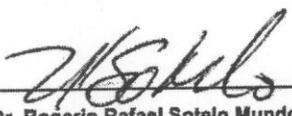
**Iván Rodríguez Siordia**

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biotecnología**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

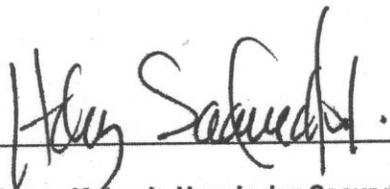
#### LA COMISIÓN REVISORA

 <hr/> Dr. Fernando Luis García Carreño Director de Tesis	 <hr/> Dra. Lilitana Carolina Rojo Arreola Co-Tutor
--	--


---

 Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo  
 Co-Tutor


---

 Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,  
 Directora de Estudios de Posgrado y  
 Formación de Recursos Humanos

## **CONFORMACIÓN DE COMITÉS**

### **COMITÉ TUTORIAL**

#### **Director de Tesis**

Dr. Fernando Luis García Carreño

Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste, S.C.

#### **Co-tutor**

Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola

Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste, S.C.

#### **Co-tutor**

Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo S.C.

### **COMITÉ REVISOR DE TESIS**

Dr. Fernando Luis García Carreño

Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola

Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo

### **JURADO DE DEFENSA DE TESIS**

Dr. Fernando Luis García Carreño

Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola

Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo

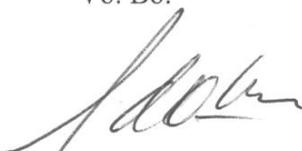
Suplente: Dr. Julio Córdova Murueta

## Resumen

La búsqueda de peptidasas con propiedades novedosas es uno de los objetivos principales en la industria biotecnológica. Muchas aplicaciones de las peptidasas ocurren a baja temperatura y pH ácido, así como en presencia de aditivos como solventes orgánicos, sales, surfactantes y peptidasas. La catepsina D1 de langosta americana (CD1) es una enzima adaptada al frío, que puede catalizar en un amplio rango de temperatura (5-50 °C) y pH ácido (pH 2.0-5.5). En este trabajo se estudiaron las condiciones en las cuales la catepsina D1 mantiene la actividad en función de la conformación. La CD1 fue extraída del jugo gástrico de la langosta y aislada por cromatografía de afinidad e intercambio iónico. La actividad proteolítica fue cuantificada utilizando un sustrato fluorogénico específico y la conformación fue estimada por la cuantificación de la fluorescencia intrínseca del triptófano. Los surfactantes no iónicos Tween-20 y Tritón-X (0.05-0.001%) estabilizaron la enzima por al menos 24 h, manteniendo el 100 y el 50% de actividad residual, respectivamente. Etanol, metanol e isopropanol (5-15%) incrementaron la actividad enzimática hasta en un 80%. La enzima en 2.5 M de urea y 1 M de NaCl mantiene hasta un 50% de actividad. La CD1 es una enzima resistente a la proteólisis por renina y papaina. En este trabajo, se reporta una peptidasa de un crustáceo que es capaz de mantener la actividad en presencia de solventes, surfactantes no iónicos, sales y peptidasas. Los crustáceos son un buen modelo en la búsqueda de peptidasas estables para futuras aplicaciones biotecnológicas. Estas enzimas pueden ser obtenidas como un subproducto de la pesca o por producción heteróloga utilizando técnicas de ingeniería molecular de proteínas.

**Palabras clave:** *Aspártico peptidasa, actividad, conformación, Homarus americanus*

Vo. Bo.



---

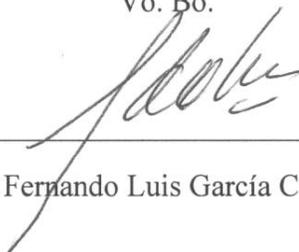
Dr. Fernando Luis García Carreño

## Summary

The search for peptidases with novel properties is one of the aims in biotechnology industries. Some applications of peptidases are carried out at low temperature, acidic pHs, in the presence of organic solvents, salts, detergents or proteolytic additives. American lobster cathepsin D1 (CD1) is a cold adapted enzyme with high catalytic efficiency at a broad temperature range (5-50 °C) acidic pH (pH 2.0-5.5). We assessed the conditions at which CD1 maintains conformation and activity. The CD1 was extracted from the gastric fluid of American lobster and isolated by affinity anionic exchange chromatography. The proteolytic activity was measured using a fluorogenic specific substrate the conformational stability was estimated by intrinsic fluorescence. Non-ionic surfactants (0.05-0.001 %) Tween-20 Triton-X stabilized the enzyme for at least one month, maintaining 100 % more than 50 % of residual activity, respectively. Ethanol, DMSO, methanol isopropanol (5-15 % v/v) increased the enzyme activity up to 80%. The enzyme in 2.5 M urea 1 M NaCl kept 50 % of its activity. Papain and renin did not hydrolyze nor affect the proteolytic activity of the CD1. In this work, a crustacean peptidase that maintains activity when it is exposed to solvents, non-ionic detergents, salts and peptidases, is reported. Proving that crustaceans are a good model for discovery of novel stable peptidases for future biotechnology applications. Such enzymes can be obtained either from fisheries by-products or via heterologous systems.

**Keywords:** *aspartic peptidase, activity, conformation, Homarus americanus*

Vo. Bo.



---

Dr. Fernando Luis García Carreño

## Dedicatoria

*A mis padres por ser mi apoyo siempre,  
aun cuando mi sueño suene descabellado.*

*“Sometimes, things may not go your way, but the effort should be there every single night”*

**-Michael Jordan.**

## **Agradecimientos**

A CIBNOR por disponer de sus instalaciones y la formación académica en el Programa de posgrado.

A CONACyT por la beca para la realización de mis estudios de posgrado No. 392201 y por el financiamiento al proyecto de ciencia básica No. 177954, otorgado a FLGC, en el cual se basa mi trabajo de tesis.

A mi comité tutorial: Dr. Fernando Luis García Carreño, Dr. Rogerio Sotelo Mundo y Dra. Liliana Rojo Arreola, por la asesoría, críticas y sugerencias positivas que me llevaron concluir con éxito esta investigación.

Al técnico responsable del Laboratorio de Bioquímica María de los Ángeles Navarrete del Toro por el entrenamiento técnico en manejo de equipo, técnicas y de laboratorio en general.

A la Dra. Patricia Hernández Cortés por su ayuda técnica en cromatografía y para el entendimiento de la estructura de las proteínas. Al Dr. Julio Córdova por revisar la tesis y enriquecer el trabajo con sus comentarios.

A la Dra. Crisalejandra Rivera Pérez que compartió un poco de su experiencia profesional conmigo y me dio una mano amiga en los momentos de alegría y de crisis.

A mis compañeros de laboratorio Mario Matamoros, Tito Díaz, Claudia Maytorena, Rocio Mendoza y Ana Mayoral, todos esos consejos fueron de gran ayuda; las risas y los buenos momentos nunca hicieron falta. A Diana Martínez y Betsaida Bibó agradezco su amistad y apoyo a pesar de la distancia.

A mi padres, hermanos, tíos y primos las muestras de cariño y apoyo en cada momento han sido un impulso para seguir adelante y superarme.

A Juan Flores por el gran apoyo emocional, gracias por compartir tantas alegrías y retos, te agradezco por estar conmigo acompañarme día a día en esta aventura.

A mis compañeros de maestría Abel Ramos y Crystal Guluarte, gracias por todo el cariño, el apoyo y la amistad, los admiro por ser entregados y de gran corazón. Marlencita Luquin, por tantos acuerdos y desacuerdos, pláticas interminables y consejos que ayudaron a formar una amistad invaluable.

A “Do Science”: Eva Benavides, Carolina Jacobson, Mónica Félix, Juan Pablo Molina, Daniela Maldonado, Rigel Sansores y Marlene por todas las risas, interesantes conversaciones y buenos momentos, nos apoyamos en momentos de dificultad y seguimos juntos.

A Diego Gijón, Cari y Mirna Castillo, Memo Salgado, Ely Gani, Kalid Álvarez, Lupita Muñoz, José Diosdado, Aby Pañola y Rodro de Luna, por seguir ahí y sacarme una sonrisa cuando más lo necesito.

A los trabajadores del Departamento de Posgrado del CIBNOR: Norma Yolanda Hernández Saavedra, Osvelia Ibarra Morales, Tania Verónica Núñez Valdez y Horacio Sandoval Gómez, por toda la ayuda, paciencia y entrega que dan a los estudiantes.

## Contenido

Resumen.....	iii
Summary.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vii
Contenido.....	viii
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xii
Abreviaturas.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Relación estructura-función de las enzimas.....	4
2.2 Interacción enzima sustrato.....	5
2.3. Técnicas para evaluar cambios conformacionales en las proteínas.....	6
2.3.1 Accesibilidad del triptófano para evaluar cambios conformacionales en las proteínas.....	7
2.4 Enzimas intrínsecamente estables y su importancia en la industria biotecnológica.....	8
2.4.1 Las peptidasas en la industria de las enzimas.....	9
2.4.2 Caracterización de peptidasas de crustáceos y su potencial biotecnológico.....	9
2.5 Las aspártico peptidasas.....	11
2.5.1 Mecanismo de catálisis de las aspártico peptidasas.....	11
2.5.2 Las aspártico peptidasas y su importancia en la industria.....	12
2.6 La langosta americana ( <i>Homarus americanus</i> ).....	13
2.6.1 Las peptidasas del sistema digestivo de langosta americana, <i>H. americanus</i> .....	14
2.6.2 La CD1 de <i>Homarus americanus</i> .....	14
3. JUSTIFICACIÓN.....	16
4. HIPÓTESIS.....	17
5. OBJETIVOS.....	18
5.1 Objetivo general.....	18
5.2 Objetivos particulares.....	18
6. MATERIAL Y METODOS.....	19
6.1 Técnicas recurrentes.....	19
6.1.1 SDS-PAGE.....	19

6.1.2 Cuantificación de la actividad.....	19
6.1.3 Evaluación de la fluorescencia del triptófano .....	21
6.2 Obtención y procesamiento de las muestras .....	21
6.2.1 Obtención de jugo gástrico.....	21
6.2.2 Purificación de CD1 .....	21
6.3 Evaluación de la actividad de la CD1 de langosta americana en condiciones ambientales .....	23
6.4 Efecto de aditivos químicos en la actividad de la CD1 .....	23
6.4.1 Evaluación de la actividad de la CD1 en respuesta a la conformación por la exposición a urea.....	23
6.4.1.1 Curva de desnaturalización inducida por urea .....	24
6.4.2 Efecto de surfactantes no iónicos en la actividad de la CD1.....	26
6.4.3 Efecto del NaCl en la actividad y la conformación de la CD1.....	26
6.4.4 Efecto de solventes orgánicos en la actividad y la conformación de la CD1.....	27
6.5. Exposición de CD1 de langosta americana a otras peptidasas comerciales.....	27
7. RESULTADOS.....	29
7.2. Espectro de emisión de la CD1 nativa .....	31
7.3. La actividad de la CD1 en condiciones ambientales.....	31
7.4. Efecto de surfactantes no iónicos en la actividad de la CD1.....	32
7.5. Efecto de Urea en la actividad y la conformación de la CD1. ....	33
7.6. Efecto del NaCl en la actividad y la emisión de fluorescencia de la CD1.....	35
7.6. Efecto de solventes en la actividad y la emisión de fluorescencia de la CD1.....	36
7.7. Exposición de la CD1 a enzimas proteolíticas.....	39
8. DISCUSIÓN .....	41
8.1. La estabilidad de la CD1 .....	41
8.2. Desnaturalización de la CD1 inducida por urea refleja relación estructura-función.....	44
8.3. Incremento de la actividad de la CD1 a bajas concentraciones de solventes y pérdida a concentraciones altas.....	45
8.4. Respuesta de la CD1 a la presencia de otras peptidasas .....	48
8.5. Observaciones importantes .....	49
9. CONCLUSIONES .....	50
10. LITERATURA CITADA .....	51

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de catálisis de las aspártico peptidasas. ....	12
<b>Figura 2.</b> Cromatograma de la separación de la CD1 por afinidad con Pepstatin-Agarosa..	29
<b>Figura 3.</b> Purificación de la catepsina D1 de langosta americana.....	30
<b>Figura 4.</b> Cromatograma del aislamiento de la CD1 por intercambio aniónico. ....	30
<b>Figura 5.</b> Representación a diferentes longitudes de onda del espectro de emisión de fluorescencia de la CD1 excitada a 290 nm a 25 °C y pH 4.5.....	31
<b>Figura 6.</b> Actividad de la CD1 en el tiempo. ....	32
<b>Figura 7.</b> Efecto de surfactantes no iónicos en la actividad de la CD1.....	33
<b>Figura 8.</b> Efecto de la concentración de urea en la actividad y la fluorescencia intrínseca de la CD1 de langosta americana, después de 24 horas de incubación a 25 °C y pH 4.5 .....	34
<b>Figura 9.</b> Curva de desnaturalización de la CD1 inducida por urea después de 24 h de incubación a 25 °C, pH 4.5.....	35
<b>Figura 10.</b> Efecto de la concentración de NaCl en la actividad y la emisión de fluorescencia de la CD1 de langosta americana, después de 24 h de incubación a 25 °C, pH 4.5 .....	36
<b>Figura 11.</b> Efecto de la exposición de la CD1 a distintas concentraciones de etanol, metanol e isopropanol en la actividad y la fluorescencia intrínseca después de la incubación por 24 h, a 25 °C, pH 4.5. ....	38
<b>Figura 12.</b> Efecto de la exposición de la CD1 a distintas concentraciones de DMSO en la actividad y la fluorescencia intrínseca después de la incubación por 24 h, a 25 °C, pH 4.5. ....	39
<b>Figura 13.</b> SDS-PAGE de la exposición de la CD1 a A) papaína y, B) renina. ....	40

**Lista de tablas**

<b>Tabla I.</b> Propiedades de fluorescencia de los aminoácidos aromáticos en agua a pH neutro (Held, 2003).....	8
<b>Tabla II.</b> Tabla de purificación de la CD1 de langosta americana. ....	31

## Abreviaturas

°C = grados centígrados

°K = grados Kelvin

μL = microlitros

μg = microgramos

ADN = ácido desoxirribonucleico

Asp = ácido aspártico

CD1 = catepsina D1

CL1 = catepsina L1

CL2 = catepsina L2

CL3 = catepsina L3

DMSO = dimetil sulfóxido

DTT = dithiothreitol

EDTA = ácido etilendiaminotetraacético

*g* = fuerza centrífuga relativa

*h* = horas

*H. americanus* = *Homarus americanus*

HCl = ácido clorhídrico

$K_{cat}$  = Constante catalítica

kDa = kilodaltones

M = molar

mg = miligramos

min = minutos

mL = mililitro

mM = milimolar

N-terminal = amino terminal

NaCl = cloruro de sodio

ng = nanogramo

nm = nanómetros

Phe = fenilalanina

SDS-PAGE = Sodium-Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide-Gel Electrophoresis

Trp = triptófano

Tris = trizma base

Tyr = tirosina

URF = unidades de fluorescencia relativa

MCA = 7-methoxycoumarin-4-ácido acético

U = unidades de actividad

ui = intensidad de fluorescencia

## 1. INTRODUCCIÓN

El paradigma estructura-función señala que la actividad de una enzima es dependiente de su estructura tridimensional, es decir, para que una proteína desempeñe su función necesita tener una conformación específica. Si dicha conformación se pierde y afecta la estructura del sitio activo, el acoplamiento entre la enzima y el sustrato no se llevará a cabo, perdiendo la actividad. La capacidad de las proteínas de mantener la estructura se conoce como estabilidad conformacional (Beadle y Shoichet, 2002), la cual se define desde el punto de vista termodinámico, como la diferencia en la energía libre entre el estado plegado y el estado desplegado de una proteína (Pace, 1990). Dado que las proteínas y, por ende, las enzimas, son moléculas dinámicas, un balance entre la flexibilidad y la estabilidad estructural es necesario para que una reacción de catálisis pueda llevarse a cabo (Fields, 2001). Por ejemplo, las enzimas adaptadas al frío, se caracterizan por poseer un sitio activo flexible que les permite aumentar los estados conformacionales del complejo enzima-sustrato generando una reducción de la energía libre y, de esta manera, acelerar la reacción enzimática a bajas temperaturas (D'Amico *et al.*, 2002; Kokkinidis *et al.*, 2012).

A lo largo de la evolución, la naturaleza ha seleccionado a los organismos que presentan adaptaciones que garantizan la reproducción aún bajo la presión del medio ambiente. A nivel metabólico, este proceso está relacionado con la diversidad de funciones y conformaciones que presentan las enzimas, las cuales les permiten catalizar reacciones eficientemente (Copley, 2012). Mientras que en condiciones fisiológicas las enzimas mantienen una conformación que les permite tener una actividad óptima, en biotecnología, las enzimas pueden verse expuestas a distintas condiciones que repercuten en la actividad (Dubey y Jagannadham, 2003). Afortunadamente, en la naturaleza existen algunas enzimas que a lo largo de la evolución adquirieron adaptaciones que les permiten resistir efectos adversos, por lo cual han sido excelentes herramientas para ser utilizadas en procesos de biocatálisis en la industria (Prakash y Jaiswal, 2010).

El uso de las enzimas en la industria ha sido de gran importancia debido a la capacidad única que tienen estas moléculas de catalizar reacciones a gran velocidad y en una amplia diversidad de ambientes, de modo que ha permitido el desarrollo de nuevos procesos biocatalíticos factibles y rentables. En la industria, las enzimas son expuestas a condiciones a las que difícilmente se verían expuestas en la naturaleza tales como: temperaturas extremas, fuerzas iónicas, solventes, así como a la presencia de enzimas proteolíticas. Estas condiciones pueden afectar las interacciones intramoleculares que mantienen la conformación activa de las proteínas, dando lugar a la pérdida de la actividad (Chi *et al.*, 2003). Por esta razón, la búsqueda de enzimas que puedan catalizar en las condiciones a las cuales podrían ser expuestas en la producción, almacenamiento y aplicación, resultan de gran importancia para entender sus mecanismos de acción y de esta manera poder ser aplicadas en procesos biotecnológicos. Entre las enzimas más importantes en biotecnología se encuentran las peptidasas, también conocidas como enzimas proteolíticas, las cuales hidrolizan los enlaces peptídicos que unen a los aminoácidos que forman a las proteínas. Las peptidasas se clasifican en exopeptidasas y endopeptidasas, de acuerdo al sitio donde hidrolizan en la proteína. Las primeras hidrolizan el enlace peptídico en aminoácidos terminales, y las endopeptidasas al interior de la proteína; esto se conoce como especificidad de reacción. Las peptidasas también se clasifican según su mecanismo de catálisis en serino-, cisteíno-, aspártico-, metalo-, treonino- y glutámico- peptidasas (Rawlings y Barrett, 2013).

La catepsina D1 (CD1) del jugo gástrico de langosta americana (*Homarus americanus*) es una aspártico peptidasa de que ha sido aislada y caracterizada desde el punto de vista bioquímico y termodinámico (Rojo *et al.*, 2010a, 2010b; Bibo-Verdugo *et al.*, 2016). La CD1 es una enzima que cataliza en un intervalo de pH de 3.5 a 5.0 y presenta alta eficiencia catalítica a bajas temperaturas (< 5 °C) con relación a enzimas homólogas de organismos homeotermos, por esta razón ha sido considerada como una enzima adaptada al frío (Rojo *et al.*, 2013a). La CD1, por encima de los 25 °C, tiene una mayor eficiencia catalítica que la de organismos endotermos, incluso a temperaturas de hasta 55 °C, característica que no había sido reportada en enzimas adaptadas al frío (Bibo-Verdugo *et al.*, 2016).

En este trabajo se evaluó la relación estructura-función de la CD1 en respuesta a cambios químicos en su microambiente, mediante la cuantificación de cambios en la actividad y la conformación de la enzima por efecto de solventes orgánicos, surfactantes no iónicos, NaCl y agentes caotrópicos, para conocer las condiciones en las que la aspártico peptidasa de langosta mantiene una conformación con capacidad catalítica y, dado que es una proteína, evaluar su resistencia a proteólisis al exponerla a peptidasas con actividad a pH ácido.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Relación estructura-función de las enzimas

La función de una enzima se encuentra intrínsecamente relacionada a la estructura tridimensional, la cual determina la manera en la que esta puede llevar a cabo la reacción de catálisis (Dill y Shortle, 1991; Pace *et al.*, 1996). La estabilidad de una proteína es producto de la contribución de distintas interacciones moleculares, como puentes de hidrógeno, interacciones iónicas y atracciones hidrofóbicas; por otro lado, la entropía conformacional es la fuerza desestabilizadora principal (Pace *et al.*, 1996). La ruptura de los distintos enlaces intermoleculares conducen al cambio de conformación, e incluso la desnaturalización, con pérdida de actividad (Fersht, 2008). El mecanismo más simple a través del cual una proteína se desnaturaliza se debe a la transición entre dos estados, en el cual la proteína pasa de una conformación plegada a una desplegada de forma cooperativa. Esta transición es descrita por  $N \leftrightarrow D$ , donde N se refiere a la proteína plegada, mientras D a la proteína desnaturalizada. Cabe mencionar que, entre estos dos estados por lo general solo existe una diferencia de entre 5 a 10 kcal/mol en condiciones fisiológicas (Pace *et al.*, 1996).

Los estudios que exploran la relación estructura-función de las proteínas se basan en la interacción que existe entre la actividad enzimática, la estabilidad estructural y la flexibilidad al ser expuestas a distintas condiciones de temperatura, pH, fuerza iónica y composición del solvente, con el fin de interpretar los posibles mecanismos que les permiten mantener y/o cambiar la conformación en respuesta a cambios en el ambiente y, al mismo tiempo, entender estos cambios en función de la actividad (Georlette *et al.*, 2004; Doukyu y Ogino, 2010). Estudios llevados a cabo en enzimas psicrófilas han demostrado que éstas presentan una mayor flexibilidad estructural, en comparación con enzimas mesófilas y termófilas homólogas (Collins *et al.*, 2003; D'Amico *et al.*, 2003). La exposición de algunas enzimas a solventes orgánicos afecta la estructura y, por consiguiente, repercute negativamente en la actividad (Parravicini *et al.*, 2016). No

obstante, algunas enzimas presentan mecanismos estructurales que les permiten mantener la actividad e incluso aumentarla, de modo que se eficientiza el proceso de catálisis (Alsafadi y Paradisi, 2013).

## 2.2. Interacción enzima sustrato

El mecanismo más simple que describe la interacción enzima-sustrato, se maneja como la “teoría de llave cerradura” la cual menciona que tanto la enzima como el sustrato presentan una estructura predeterminada que les permite interactuar para generar productos. Sin embargo, considerando que las moléculas son dinámicas, esta teoría es obsoleta. En la actualidad existen dos modelos que tratan de explicar cómo sucede la interacción de una enzima con el sustrato (Csermely *et al.*, 2010). El primero conocido como “teoría de arreglo inducido” menciona que el sustrato, al estar en contacto con una proteína, induce un cambio conformacional que les permite interactuar para formar productos. El segundo se conoce como “teoría de selección conformacional”, la cual menciona que las enzimas, al ser moléculas dinámicas, fluctúan entre conformaciones y únicamente cuando presenten una conformación específica pueden interactuar con el sustrato (Gianni *et al.*, 2014). Teóricamente la interacción enzima-sustrato es representada por:



donde E es la enzima, S el sustrato y ES es el complejo enzima-sustrato. No obstante, este modelo no resulta tan simple, ya que la relación entre la función, el mecanismo de reconocimiento, estructura, cinética, energía y dinámica se encuentran influenciados por el ambiente en que se encuentran las moléculas. Por lo tanto, el estudio de la interacción enzima sustrato debe de ser evaluado mediante la exposición de las enzimas a diferentes condiciones de temperatura, pH, composición del amortiguador (fuerza iónica y naturaleza), osmolitos, solventes (incluyendo cosolventes), sales y concentraciones de otros iones, desnaturalizantes (caotrópicos), surfactantes (detergentes), estabilizantes (glicerol) y agentes reductores de disulfuros como el ditioneitol (DTT; Chowdhry y Harding, 2001).

Los cambios que suelen presentarse en la proteína no solo se encuentran referidos a cambios en la estructura (secundaria/terciaria/cuaternaria), conformación, tamaño, geometría de forma y topología, sino que también incluye cambios en la distribución de carga, el estado de hidratación y protonación, el volumen molar parcial, así como los cambios en el área de superficie accesible, la polaridad (hidrofobicidad), y los factores de entropía intra- e intermolecular. Tales cambios, pueden afectar directamente al sitio activo de una enzima, evitando que esta pueda interactuar con el sustrato y llevar a cabo la actividad catalítica (Chowdhry y Harding, 2001).

### **2.3. Técnicas para evaluar cambios conformacionales en las proteínas**

La evaluación de los cambios conformacionales en una proteína pueden ser evaluados desde distintas perspectivas: 1) cambios globales, cuando una proteína se mueve o se reorganiza modificando, de manera general, las estructuras secundarias o terciarias que la conforman; 2) cambios regionales, cambios en regiones específicas en que la forma total y el pliegue de la proteína permanece relativamente constante, pero una porción diminuta puede moverse; 3) cambios locales, cuando la conformación individual de los elementos de la cadena principal de aminoácidos experimentan continuamente variaciones menores.

Diversas técnicas experimentales han sido utilizadas para investigar diversos aspectos de la conformación y dinámica, así como para evaluar cambios conformacionales a escala global de las proteínas. Entre ellas, la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética de alta resolución son capaces de proporcionar (en muchos casos) una estructura detallada de las proteínas y sus complejos, aportando conocimientos que han sido realmente inestimables para el desarrollo de muchos productos en la industria biotecnológica (Scarff *et al.*, 2008). Desafortunadamente, estas poderosas técnicas tienen limitaciones metodológicas y económicas, que a menudo hacen imposible su aplicación a los análisis de cambios estructurales en las proteínas. Por lo tanto, el uso de otro tipo de análisis biofísicos básicos de conformación de las proteínas, tales como diversas técnicas espectroscópicas (especialmente dicroísmo circular, fluorescencia, absorción UV y espectroscopia FTIR),

dispersión de luz, calorimetría, así como la centrifugación analítica y cromatografía de exclusión de tamaño han sido frecuentemente empleado para evaluar cambios conformacionales en las proteínas (Nguyen *et al.*, 2003).

### **2.3.1. Accesibilidad del triptófano para evaluar cambios conformacionales en las proteínas**

Muchas moléculas biológicas tienen la capacidad de emitir fluorescencia intrínsecamente al ser excitadas a una longitud de onda específica. Los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano son los responsables de que las proteínas puedan fluorescer. Si bien, estos tres aminoácidos tienen la capacidad de emitir fluorescencia, la cuantificación de la fluorescencia que emite el triptófano es la medida más utilizada para estimar los cambios conformacionales que se presentan en una proteína al ser expuesta a distintas condiciones en el microambiente, debido a que el triptófano es un aminoácido sumamente sensible a la polaridad del ambiente. Así mismo, el rendimiento cuántico de la fluorescencia del triptófano es superior al de los otros dos aminoácidos y no existe transferencia de energía entre ellos y el triptófano, lo cual evita el opacamiento de la fluorescencia (Möller y Denicola, 2002).

El triptófano es un aminoácido aromático hidrofóbico que suele encontrarse completa- o parcialmente dispuesto en el centro hidrofóbico de las proteínas. De igual manera puede localizarse en la interfaz de sistemas proteicos oligoméricos o en la interfaz de dos dominios y/o subdominios. El triptófano presenta máxima absorción a 280 nm, pese a ello, en la mayoría de los estudios suele ser excitado a 290 nm con el fin de disminuir la interferencia de la fluorescencia emitida por la tirosina (Tabla I). Por otro lado, el punto de emisión máxima del triptófano se localiza en la mayoría de las proteínas a 348 nm (Royer *et al.*, 1993). Debido a que la fluorescencia intrínseca del triptófano es sensible a la polaridad del microambiente donde se encuentra la proteína, los cambios en la polaridad pueden dar lugar a modificaciones en la exposición de este aminoácido al medio. El aumento en la polaridad del solvente favorece la formación de puentes de hidrógeno entre

el agua y el grupo amino del triptófano, produciendo una reducción del nivel de energía del estado excitado del triptófano por efecto del solvente, lo que se refleja en cambios en la intensidad de la fluorescencia, que pueden ser entendidos como cambios conformacionales en la proteína, tales como asociación de subunidades, ruptura de enlaces o desnaturalización (Royer, 2006).

**Tabla I.** Propiedades de fluorescencia de los aminoácidos aromáticos en agua a pH neutro (Held, 2003).

	Tiempo de vida ( $\tau$ )	Absorción		Fluorescencia	
	(ns)	$\lambda$ (nm)	Absortividad ( $\epsilon$ )	$\lambda$ (nm)	Absortividad ( $\epsilon$ )
Triptófano	3.1	280	5600	348	0.20
Tirosina	3.6	274	1400	303	0.14
Fenilalanina	6.4	257	200	382	0.04

#### 2.4. Enzimas intrínsecamente estables y su importancia en la industria biotecnológica

Debido a la diversidad de ambientes que existen en nuestro planeta podemos encontrar organismos que habitan en distintas condiciones de temperatura, pH, salinidad y presión. Estos organismos presentan adaptaciones evolutivas en sus mecanismos de biocatálisis que les permiten sobrevivir en ambientes en los cuales otros organismos no sobrevivirían (Niehaus *et al.*, 1999). Entre las adaptaciones fisiológicas que presentan, podemos encontrar la producción de enzimas termófilas, acidófilas, alcalófilas, psicrófilas, barófilas (Demirjian *et al.*, 2001). Enzimas activas al ser expuestas a distintas condiciones, han sido de gran interés en el desarrollo de nuevas biotecnologías, muchas de las cuales han encontrado su camino en aplicaciones industriales debido a la capacidad que tienen de mantener la conformación, evitando así la pérdida de la actividad (Karan *et al.*, 2012).

En la industria, durante la manipulación, la formulación, el almacenamiento y/o la administración de las enzimas, cualquier tipo de entrada de energía desde el microambiente puede generar cambios en la conformación que repercuten en la actividad. Para contrarrestar el efecto del ambiente, así como solventar la demanda que existe para la producción y el abastecimiento de las enzimas, se han implementado diversas estrategias

para incrementar la estabilidad. Entre la cuales se pueden mencionar la inmovilización, la cristalización, modificaciones químicas, producción de enzimas heterólogas y el uso de aditivos estabilizantes (Iyer y Ananthanarayan, 2008). Una gama de aditivos ejerce efectos de estabilización mediante la inducción de la hidratación preferencial de las proteínas, es decir, el aditivo tiende a ser excluido de la superficie de la proteína induciendo en ella una conformación compacta con la que evitan la desnaturalización (Vagenende *et al.*, 2009).

#### ***2.4.1. Las peptidasas en la industria de las enzimas***

Las peptidasas son un importante grupo de enzimas que representa aproximadamente el 60% del total de las enzimas utilizadas en la industria. Estas enzimas son frecuentemente empleadas en la elaboración de detergentes, alimentos y productos farmacéuticos debido a su alta eficiencia en la ruptura de los enlaces peptídicos (Tunga *et al.*, 2003; Merheb *et al.*, 2007). Los microorganismos representan la fuente más representativa de peptidasas utilizadas en la industria debido a su fácil manejo y cultivo, así como a su elevada tasa de producción y la gran diversidad de ambientes en los que se pueden desarrollar. Así mismo, existen peptidasas de eucariotas marinos con características catalíticas atractivas y cuya abundancia en organismos de interés comercial y su aplicación permitiría el aprovechamiento total del recurso (Aspmo *et al.*, 2005; Espósito *et al.*, 2009). De igual manera, la producción heteróloga en vectores microbianos de peptidasas provenientes de plantas y animales ha sido una práctica común en biotecnología con el fin de optimizar y reducir los costos de extracción, procesamiento y abastecimiento así como la obtención de peptidasas a partir de organismos con poco o nulo valor comercial (Macouzet *et al.*, 1999; Venkatesh *et al.*, 2005).

#### ***2.4.2. Caracterización de peptidasas de crustáceos y su potencial biotecnológico***

En biotecnología, la actividad de las peptidasas en condiciones físicas y químicas no fisiológicas es un requisito (Sumantha *et al.*, 2006). Por tanto, peptidasas que mantengan la actividad en presencia de solventes, detergentes, sales y enzimas proteolíticas tiene una

gran relevancia en la aplicación de procesos en la industria. En crustáceos se han estudiado y caracterizado peptidasas desde distintos puntos de vista, que van desde aspectos fisiológicos (Lemos *et al.*, 2002; Gamboa-Delgado *et al.*, 2003), bioquímicos (Ezquerria *et al.*, 1997; González-Zamorano *et al.*, 2013) a termodinámicos (Rojo *et al.*, 2013; Bibo-Verdugo, 2014), en los cuales se han descrito algunas características sobresalientes de estas enzimas que las hacen atractivos modelos de estudio y fuente de peptidasas con potencial biotecnológico.

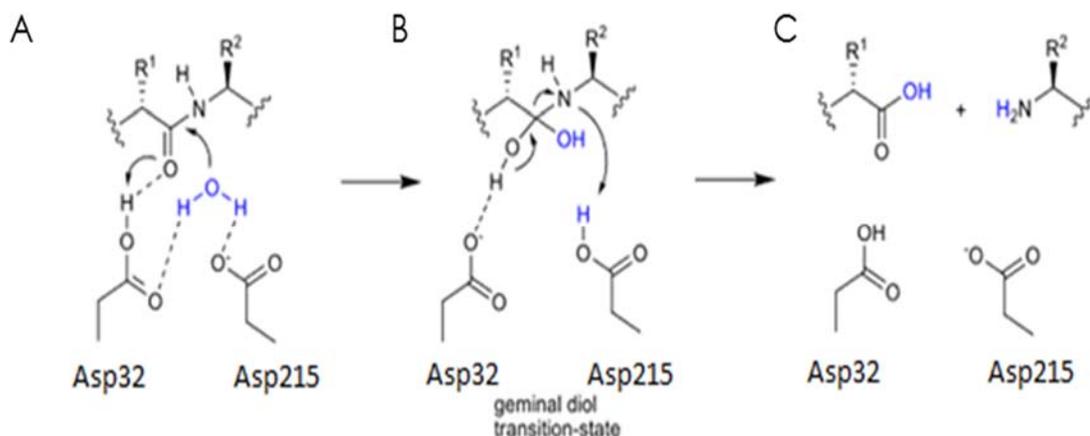
Las peptidasas de camarones, cangrejos y langostas han mostrado tener la capacidad de catalizar reacciones en condiciones a las que difícilmente se verían expuestas en la naturaleza. La tripsina del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, ha demostrado tener un aumento en la actividad al exponerla a iones  $\text{Ca}^{+2}$ , situación que no se presenta en tripsinas de vertebrados (Sainz *et al.*, 2004). Por otro lado, algunas peptidasas han demostrado, no solo mantener la actividad al ser expuestas a distintas concentraciones de solventes, sino que incluso se activan en presencia de éstos. Se ha reportado un aumento en la actividad de serino peptidasas de *Cancer pagurus* de hasta un 600% al ser expuestas a 20% de los solventes orgánicos etanol, metanol, propanol y acetona (Saborowski *et al.*, 2004). Las aspártico peptidasas digestivas de las langostas del género *Homarus* han sido caracterizadas y denominadas como enzimas adaptadas al frío, ya que presentan alta eficiencia catalítica a temperaturas de bajas a moderadas (5-20 °C; Rojo *et al.*, 2013). La quimotripsina de la langosta *Panulirus interruptus*, a pesar de tener un pH óptimo en condiciones alcalinas, mantiene la actividad desde pH ácido a alcalino (3-9 pH), además de ser una enzima tolerante a la exposición de solventes orgánicos, mostrando incluso un aumento significativo en la actividad en presencia algunos de ellos (Bibo-Verdugo *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha demostrado que las enzimas digestivas de *Callinectes bellicosus* y *L. vannamei* son resistentes a hidrólisis cuando son expuestas en presencia de tripsina bovina, siendo esta última enzima hidrolizada por las peptidasas de crustáceos (González-Zamorano *et al.*, 2013)

## 2.5. Las aspártico peptidasas

Las peptidasas de tipo aspártico (EC 3.4.23.X), son enzimas ampliamente distribuidas, que pueden encontrarse en organismos diversos como retrovirus, bacterias, levaduras, plantas y animales (Sumantha *et al.*, 2006). Esta clase de enzimas se caracterizan por catalizar reacciones a pH ácido, condición que se encuentra asociada a la ionización los dos residuos de ácido aspártico en el sitio activo (Yreeva y Rumsh, 2008). Estructuralmente, las aspártico peptidasas se caracterizan por poseer una cadena polipeptídica de entre 320 a 360 residuos de aminoácidos y presentar un peso molecular de entre 32 y 36 kDa. La estructura tridimensional de estas enzimas está formada principalmente por placas beta arregladas en dos lóbulos homólogos. El sitio catalítico, dispuesto entre los dos lóbulos, se forma por dos residuos de ácido aspártico: Asp32 y Asp215, que se encuentran unidos mediante un puente de hidrógeno entre el extremo carboxilo de ambos y una molécula de agua (Pearl y Blundell, 1984); ambos residuos activan a la molécula de agua responsable del ataque nucleofílico al enlace peptídico.

### 2.5.1. Mecanismo de catálisis de las aspártico peptidasas

El mecanismo de catálisis de las aspártico peptidasas ha sido descrito (Rawlings y Barrett, 2013). En la figura 1, se observa una molécula de agua próxima a los dos residuos de ácido aspártico del sitio activo (Fig. 1A). La catálisis comienza cuando Asp215 se protona aceptando un hidrógeno de la molécula de agua, la cual se activa y actúa como nucleófilo atacando al átomo del carbono el grupo carbonilo del enlace peptídico, lo que resulta en una disrupción del doble enlace y en la formación de un intermediario tetrahédrico metaestable (Fig 1B). Posteriormente, el Asp215 forma un puente de hidrógeno con el átomo de oxígeno de la molécula de agua original, mientras que el protón restante forma un puente de hidrógeno con el oxígeno de Asp32. La modificación estérica del átomo de nitrógeno, permite la formación de un puente de hidrógeno con el protón de Asp215, produciendo la ruptura del enlace entre el grupo amino y el carboxilo generando dos productos (Fig. 1C).



**Figura 1.** Mecanismo de catálisis de las aspártico peptidasas.

### 2.5.2. Las aspártico peptidasas y su importancia en la industria

Las serino peptidasas son la clase de enzimas proteolíticas más utilizadas en la industria biotecnológica, debido a su capacidad de catalizar reacciones en medios alcalinos, condición que les permite participar en una amplia gama de aplicaciones diversas en la industria tales como, detergentes, limpieza de pieles, purificación de ácidos nucleicos, entre otras (Tavano, 2013). Las aspártico peptidasas, por la capacidad de llevar a cabo reacciones a pH ácido, han sido utilizadas en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica. En la industria alimentaria la aplicación más importante es la capacidad de coagular proteínas, como evidencia de esto, existe una gran demanda de peptidasas aspárticas en la industria de la fabricación de quesos, debido a la capacidad de coagular la caseína de la leche (Neelakantan *et al.*, 1999); la renina y la quimosina son las dos aspártico peptidasas más utilizadas para la coagulación de la caseína, así mismo se han reportado catepsinas D con la misma capacidad (Hurley *et al.*, 2000). Enzimas de tipo aspártico se usan para eliminar turbidez en jugos de frutas y bebidas alcohólicas, previniendo la formación de agregados de proteínas (Lybo *et al.*, 2006; Pinelo *et al.*, 2010). El proceso de clarificación de algunas bebidas ocurre a baja temperatura ( $< 10^{\circ} \text{C}$ ), en condiciones ácidas, en presencia de cierta fuerza iónica y, en ocasiones, a baja concentración de etanol y algunos polifenoles (Mesquita *et al.*, 2001; Marangon *et al.*, 2011; Dufrechou *et al.*, 2012), por esta razón las

enzimas utilizadas en esta industria deben de tener la capacidad de catalizar en estas condiciones (Pocock *et al.*, 2003).

Por otra parte, el uso de aspártico peptidasas también ha cobrado interés en la industria farmacéutica y dermatológica, ya que diferentes padecimientos y procesos de infección se encuentran regulados por aspártico peptidasas (Benes *et al.*, 2008). Esta clase de enzimas son empleadas en tratamientos dermatológicos para prevenir la descamación de la piel (Horikoshi *et al.*, 1999) y para la eliminación de piojos y liendres (Watkms y Hayyvard, 1999). De igual manera, han sido utilizadas en la industria farmacéutica por la actividad retroviral que algunas de ellas poseen (Dunn *et al.*, 2002; Bernard *et al.*, 2005). En la industria cosmética y farmacéutica el uso de distintos solventes orgánicos como isopropanol, metanol, DMSO, polioles y surfactantes es muy común, de tal forma que peptidasas que mantengan la actividad en estas condiciones resultan de gran interés para ser explotadas y aplicadas.

## **2.6. La langosta americana (*Homarus americanus*)**

La langosta americana, también conocida como langosta quelada (*H. americanus*), es un crustáceo decápodo de la familia Nefropidae que se distribuye en la costa oeste del Atlántico Norte, lugar donde es reconocida por su alto valor comercial. En 2012, la pesca de langosta americana fue de 148 millones de libras de langosta desembarcada, que corresponde aproximadamente a un ingreso de 429 millones de dólares, lo cual la convierte en la tercera pesquería más importante de Estados Unidos, por debajo únicamente del salmón y el camarón (NMFS, 2016). La abundancia en la pesquería de esta langosta sugiere la generación de gran cantidad de desechos que podrían ser utilizados como materia prima en aplicaciones biotecnológicas a mediano y largo plazo, como ha sucedido con desechos pesqueros de otros organismos marinos (Aspmo *et al.*, 2005; Espósito *et al.*, 2009).

### **2.6.1. Las peptidasas del sistema digestivo de langosta americana, *H. americanus***

Contrario a lo que se observa en la mayoría de los sistemas digestivos de crustáceos, el jugo gástrico de las langostas del género *Homarus* (*H. gamarus* y *H. americanus*) presenta mayor actividad a pH ácido (Navarrete Del Toro *et al.*, 2006). Se han purificado y caracterizado las peptidasas digestivas aspártico y cisteíno a partir de la glándula digestiva y del jugo gástrico de langosta americana (Laycock *et al.*, 1989; Rojo *et al.*, 2010a). Las cisteíno peptidasas del jugo gástrico corresponden a tres isoenzimas de catepsina L (CL): CL1, CL2 y CL3 (Laycock *et al.*, 1991; Bibo-Verdugo *et al.*, 2016). Además, se ha identificado, purificado y caracterizado una aspártico peptidasa, denominada catepsina D1 (CD1; Rojo *et al.*, 2010b).

### **2.6.2. La CD1 de *H. americanus***

En la langosta americana ha sido descrita una aspártico peptidasa en el jugo gástrico, la cual, por medio de secuenciación del extremo N-terminal, espectrometría de masas y secuenciación del ADN complementario, se denominó como CD1 (Rojo *et al.*, 2010a). A esta enzima se le ha atribuido una función digestiva por encontrarse activa en el jugo gástrico de la langosta y por expresarse únicamente en la glándula digestiva y formar parte del jugo gástrico (Rojo *et al.*, 2010a).

La CD1 del jugo gástrico de langosta americana está formada por 386 residuos de aminoácidos con una masa molecular de 42.6 kDa (Rojo *et al.*, 2010a). Esta enzima, al igual que enzimas homólogas de mamíferos, tiene afinidad principalmente por residuos de aminoácidos hidrofóbicos Phe, Trp y Tyr en las posiciones P1-P1' (Bibo-Verdugo *et al.*, 2016). La enzima tiene un pH óptimo en un rango de 3.5 a 5.5, y alta eficiencia catalítica en un rango de 5 a 25 °C, de manera que es considerada como una enzima con capacidad de catalizar a bajas temperaturas (Rojo *et al.*, 2013). La CD1, presenta una mayor  $K_{cat}$  que enzimas homólogas de endotermos desde 5 a 55 °C, lo que se relaciona a una mayor capacidad catalítica en relación a sus homólogas (Bibo-Verdugo *et al.*, 2016). La capacidad

de la enzima de langosta de catalizar a un amplio rango de temperatura se ha asociado a la ausencia de un lazo de prolina que le provee de mayor flexibilidad (Rojo *et al.*, 2013), característica indispensable de las enzimas adaptadas al frío.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En biotecnología, la actividad de las peptidasas en condiciones extremas de pH, temperatura y presencia de solventes, detergentes, sales y enzimas proteolíticas es un requisito; tales condiciones pueden llegar a modificar la estructura de las proteínas, o incluso desnaturalizarlas, dando lugar a la pérdida de la actividad, de manera que el estudio de la capacidad que tienen las enzimas de mantenerse activas en condiciones extremas en las que podrían verse expuestas durante su extracción, procesamiento y aplicación, resulta de gran relevancia en el momento de buscar procesos en la industria. Por otro lado, la exposición a distintas condiciones físicas y químicas en el microambiente no afectan de la misma manera a todas las proteínas, por ello la comprensión de cambio en la conformación de las enzimas en relación a la actividad enzimática resulta de gran importancia ya que permite tener un mejor control sobre el proceso de pérdida de actividad, estabilización y propiedades catalíticas (Chi *et al.*, 2003).

Entender la relación entre la estructura-función de la CD1 bajo diferentes condiciones resulta de interés tanto en caracterización teórica como en innovación biotecnológica, ya que esta enzima presenta alta eficiencia catalítica a temperaturas frías y moderadas, así como a un amplio espectro de pH, características que la hacen una enzima con potencial biotecnológico. En consecuencia, un estudio donde se evalúe el efecto de agentes desnaturalizantes en la estructura y la función de la CD1 permitirá explorar la posibilidad de ser utilizada como biocatalizador en la industria. Bajo estos supuestos se plantearon las siguientes preguntas científicas: ¿Es la CD1 de langosta americana (*H. americanus*) capaz de mantener la actividad en presencia de aditivos químicos y proteolíticos?, ¿Existe una relación estructura-función al ser expuesta a estas condiciones?

#### 4. HIPÓTESIS

Si las peptidasas de crustáceos son particularmente activas al ser expuestas a agentes químicos desnaturizantes y enzimas proteolíticas, lo cual se relaciona con el arreglo conformacional que poseen, entonces, la CD1 de *H. americanus* mantendrá su actividad en función de la conformación al ser expuesta a diferentes agentes químicos desnaturizantes y será resistente a la presencia de enzimas proteolíticas.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Evaluar la respuesta de la Catepsina D1 de *H. americanus* al ser expuesta a agentes químicos y proteolíticos.

### 5.2. Objetivos particulares

1. Purificar la CD1 a partir de jugo gástrico de *H. americanus*.
2. Evaluar la estabilidad de la CD1.
3. Cuantificar el efecto del glicerol, Tritón-X y Tween-20 en la actividad de la CD1
4. Cuantificar los cambios en la actividad de la CD1 al ser expuesta a urea, NaCl y solventes orgánicos: etanol, DMSO, metanol e isopropanol.
5. Estimar los cambios conformacionales de la CD1 al ser expuesta a urea, NaCl y solventes orgánicos: etanol, DMSO, metanol e isopropanol.
6. Estudiar el efecto de la exposición de la CD1 a las peptidasas renina y papaína.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Técnicas recurrentes

#### 6.1.1. SDS-PAGE

La técnica de “Sodium-Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide-Gel Electrophoresis” (SDS-PAGE) utilizando la metodología descrita por Laemmli (1970), fue empleada para comprobar la pureza de la CD1, así como para evaluar la respuesta de la enzima de langosta al ser expuesta a otras peptidasas. Las muestras de interés fueron adicionadas con amortiguador de muestra 4X-DTT y se calentaron a 100 °C por 10 min, finalmente las muestras fueron colocadas y separadas en un gel de poliacrilamida 12%. Posterior a la electroforesis, los geles fueron lavados con agua destilada y teñidos con azul de Coomassie R-250 o tinción de plata. Por otro lado, se llevaron a cabo ensayos de actividad por zimograma utilizando la metodología descrita por García-Carreño *et al.* (1993), con algunas modificaciones. Las muestras fueron separadas en un gel de policarilamida 12% en condiciones nativas con amortiguador de muestra 4X sin DTT. Finalizada la electroforesis, el gel fue lavado en agua destilada y posteriormente se ajustó el pH mediante tres lavados consecutivos de 10 min con 50 mM acetato de sodio pH 4.5. El gel fue incubado por 30 min en baño de hielo en una solución de 0.25% hemoglobina en 100 mM amortiguador de acetato de sodio, pH 4.5. Finalizado el tiempo los geles fueron extraídos del baño de hielo e incubados a temperatura ambiente por 1.5 h. Después de la incubación los geles fueron lavados con agua destilada y teñidos con solución de azul de Coomassie R-250. En ambas técnicas SDS-PAGE y actividad por zimograma, los geles fueron desteñidos y analizados en un fotodocumentador de imagen Image-Lab (BIO-RAD).

#### 6.1.2. Cuantificación de la actividad

La actividad específica de la CD1 de langosta americana a fue cuantificada por la hidrólisis del sustrato fluorogénico 7-metoxicumarin-4-ácidoacético-Gly-Lys-Lys-Pro-Ile-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys-(2,4dinitrofenil)-D-Arg-NH<sub>2</sub> (EnzoLife Sciences BML-P145-0001),

siguiendo la metodología de Yasuda *et al.* (1999) usando en un lector de microplaca Synergy 4 (Biotek) a una longitud de onda de 328 y 393 nm de excitación y emisión, respectivamente. Se utilizó una curva de calibración generada por la emisión de fluorescencia de distintas concentraciones conocidas del fluorocromo 7-methoxycoumarin-4-ácido acético (MCA) y por la comparación de las unidades de fluorescencia relativa (UFR) contra la concentración de MCA. La actividad de la CD1 es expresada en pmol de MCA liberados por minuto por cada  $\mu\text{g}$  de proteína.

Dependiendo del análisis se llevaron a cabo tres diferentes metodologías:

- a) Análisis de actividad de las fracciones cromatográficas: 10  $\mu\text{L}$  de cada una de las fracciones fueron colocados en una microplaca negra con 80  $\mu\text{L}$  de amortiguador de acetatos, 50 mM, pH 4.5; la reacción fue iniciada con la adición de 10  $\mu\text{L}$  de sustrato 2  $\mu\text{M}$  de concentración final, disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) y amortiguador de reacción.
- b) Análisis de actividad a baja concentración: la enzima purificada a una concentración de 0.5 mg/mL, fue diluida 1:10000 hasta una concentración de 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en amortiguador de acetato de sodio 100 mM a pH 4.5, y/o la concentración de aditivo deseada utilizando soluciones stock del aditivo disueltas en el mismo amortiguador. Del extracto final, 90  $\mu\text{L}$  fueron extraídos y depositados en una microplaca a la cual se le añadieron 10  $\mu\text{L}$  de sustrato sintético específico para CD a una concentración final de a 2  $\mu\text{M}$  y se evaluó la actividad a 25 °C. La actividad de la CD1 se expresó mediante unidades de actividad relativa, considerando al control positivo como el 100%.
- c) Análisis de actividad a alta concentración: la enzima purificada a una concentración de 0.5 mg/mL, fue diluida 1:100 hasta una concentración de 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en amortiguador de acetatos 100 mM a pH 4.5, y/o la concentración de aditivo deseada utilizando soluciones stock del aditivo disueltas en el mismo amortiguador. Minutos antes de medir la actividad, la enzima fue nuevamente diluida 1:100 en amortiguador y/o la solución stock del aditivo hasta una concentración final de proteína de 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La actividad de la enzima fue medida inmediatamente después de la segunda dilución, de la misma manera que en el apartado b.

### ***6.1.3. Evaluación de la fluorescencia del triptófano***

Los cambios conformacionales de la CD1 fueron estimados por espectrometría de fluorescencia, empleando un espectrofluorómetro de microplaca Synergy 4 (BIO-TEC), utilizando la técnica espectrométrica de emisión de fluorescencia del triptófano. La emisión de fluorescencia de las muestras que contenían 0.05 mg/mL de la enzima de langosta en un volumen de 220  $\mu$ L de amortiguador de fosfatos pH 4.5, con o sin aditivo, fueron analizadas mediante la lectura del espectro de fluorescencia excitando las muestras a 290 nm y recuperando la emisión cada 5 nm en un rango de 315 a 400 nm de longitud de onda, utilizando 120 unidades de sensibilidad. Como control positivo se utilizó la enzima disuelta en el amortiguador de reacción y como control negativo, la enzima disuelta a la máxima concentración de aditivo. Todos los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado, haciendo dos lecturas de cada muestra.

## **6.2. Obtención y procesamiento de las muestras**

### ***6.2.1. Obtención de jugo gástrico***

Ejemplares adultos de langosta americana fueron mantenidos en cautiverio bajo condiciones controladas de salinidad, temperatura y suministro de alimento. El jugo gástrico se extrajo de los especímenes vivos y en condiciones de ayuno, utilizando una jeringa equipada con un tubo flexible que se insertó por la cavidad oral hasta la cavidad gástrica. Inmediatamente después del muestreo, el jugo gástrico se colocó en tubos Eppendorf de 2 mL y se mantuvo a 4 °C; posteriormente, los tubos fueron centrifugados por 10 min a 4 °C y 10 000g, con el fin de separar los sólidos. El sobrenadante fue almacenado a -20 °C para su posterior uso.

### ***6.2.2. Purificación de CD1***

La catepsina D1 fue purificada por cromatografía de afinidad e intercambio aniónico. Por afinidad, las aspártico peptidasas fueron separadas en una columna de cromatografía

empacada manualmente con pepstatin A-agarosa (PS032, Sigma-Aldrich), utilizando un Cromatógrafo BIO-RAD. Cuatro mL de jugo gástrico fueron concentrados a un mL en una columna de ultrafiltración Amicon (corte 10 kDa) a 4000 x g y 4 °C, para obtener un mayor rendimiento final en la cromatografía. La columna de cromatografía fue equilibrada con 15 mL del mismo amortiguador, posteriormente 1 mL de jugo gástrico concentrado fue inyectado a la columna, se lavó con 15 mL del mismo buffer. La elusión de las proteínas adsorbidas en la columna se realizó mediante cinco pasos de elusión: 1) 20 mL de amortiguador de acetatos 50 mM, pH 4.5; 2) 20 mL de amortiguador de citratos 50mM, NaCl 1 M, pH 3.5; 3) 20 mL de amortiguador de citratos 50 mM, pH 3.5; 4) 25 mL de Tris-HCl 100 mM, NaCl 1 M, pH 7.0; y 5) 5 mL de Tris-HCl 100 mM, NaCl 1 M, pH 7.5. Fracciones de 1.5 mL fueron colectadas a una velocidad de 1 mL/min y posteriormente analizadas por SDS-PAGE y zimogramas. Las fracciones donde se observó a la CD1 fueron concentradas por ultrafiltración a 4000 x g y 4 °C hasta obtener un volumen final de 1 mL.

Las fracciones que presentaron mayor pureza obtenidas de la cromatografía de afinidad fueron aplicadas a una columna de NAP<sup>TM</sup>-5 Sephadex G25 (Amersham Biociences) para intercambiar el amortiguador de Tris-HCL 100 mM, 1 M NaCl, pH 7.5 a un amortiguador de Tris-HCl 100Mm, pH 7.0. Una vez acondicionado al pH, la muestra fue aplicada a una columna UNO<sup>TM</sup> Q1 (720-0001, BIO-RAD) empleando el cromatógrafo antes mencionado. Bajo estas condiciones, la peptidasa se adsorbió en la columna y se eluyó utilizando un gradiente de NaCl (0-1 M) en amortiguador de Tris y un flujo constante de 1 mL/min. Fracciones de 1 mL fueron colectadas. Las fracciones que contenían los picos de UV mayores fueron analizadas en SDS-PAGE 12% y por zimograma, siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.1.1, así como por ensayos de actividad específica utilizando la metodología descrita en el apartado 6.1.2a. Las fracciones que contuvieron a la CD1 fueron concentradas a 0.5 mg/mL y separadas en alícuotas de 30 µL para su posterior uso.

### **6.3. Evaluación de la actividad de la CD1 de langosta americana en condiciones ambientales**

La actividad de la CD fue cuantificada a diferentes concentraciones. La CD1 purificada (0.5 mg/mL) fue llevada hasta una concentración de 0.05 µg/mL en 50 mM amortiguador de acetatos pH 4.5, la enzima fue incubada a 25 °C por 24 h y se cuantificó la actividad a 1, 2, 4, 8 y 24 h siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.1.2b. La cuantificación de la actividad a alta concentración se llevó a cabo diluyendo la enzima hasta una concentración de 5 µg/mL en 50 mM amortiguador de acetatos pH 4.5, la enzima fue incubada a 25 °C y se cuantificó la actividad diariamente por siete días siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.1.2c. La actividad de la CD1 en el tiempo fue evaluada cualitativamente mediante ensayos de actividad por zimograma. La CD1 purificada fue diluida hasta una concentración final de 0.125 mg/mL en amortiguador de acetatos 50 mM, pH 4.5. Posteriormente, la enzima fue incubada durante 7 días a 25 °C. Muestras diarias fueron llevados a cabo, en los cuales 15 µL de la muestra fueron extraídos, colocados en tubos individuales y almacenados a -20 °C, hasta su uso. Una vez finalizados los siete días, las muestras fueron descongeladas y la actividad fue evaluada por zimograma, el cual se efectuó siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.1.1.

### **6.4. Efecto de aditivos químicos en la actividad de la CD1**

#### ***6.4.1. Evaluación de la actividad de la CD1 en respuesta a la conformación por la exposición a urea***

Con el fin de identificar el efecto de la urea en la conformación y la actividad de la CD1 de langosta americana, la aspártico peptidasa fue expuesta a concentraciones de 0 a 7.5 M de urea, a pH 4.5 y 25 °C. Para los ensayos de actividad en presencia de urea, se diluyó la CD1 pura a una concentración final de 2.0 µg/mL en la concentración deseada de urea utilizando una solución stock de 8 M en 50 mM amortiguador de acetatos, pH 4.5. La reacción fue ajustada con amortiguador de acetatos pH 4.5, a un volumen final de 300 µL. Todas las muestras fueron incubadas a 25 °C por 24 h. Finalizado este tiempo, cada muestra fue

diluida nuevamente hasta una concentración de 0.02  $\mu\text{g/mL}$  utilizando la misma concentración de urea y amortiguador. Inmediatamente después se llevaron a cabo ensayos de actividad siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.1.2.b.

La evaluación de los cambios conformacionales de la CD1 por efecto de la urea se llevó a cabo por un análisis de la emisión de fluorescencia del triptófano, por triplicado. La cuantificación de la emisión de fluorescencia de la CD1 en presencia de urea fue evaluada utilizando una concentración final de 0.03  $\text{mg/mL}$  de CD1, la cual fue expuesta a la concentración de 0.5 a 7.5 M de urea, reacción que fue ajustada con amortiguador de fosfatos pH 4.5, a 220  $\mu\text{L}$  de volumen final. Las muestras fueron incubadas a 25  $^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Finalizado este tiempo, se extrajeron 100  $\mu\text{L}$  de cada mezcla y se midió la emisión de fluorescencia por duplicado como se indica en el apartado 6.1.3. La actividad y la fluorescencia de la CD1 no tratada fueron consideradas como controles experimentales y la emisión obtenida de los amortiguadores a la máxima concentración de urea fue considerada como blanco.

#### ***6.4.1.1. Curva de desnaturalización inducida por urea***

Las curvas de desnaturalización son una excelente vía para estimar la estabilidad de una proteína. Utilizando los valores obtenidos de emisión de fluorescencia a 330 nm del ensayo anterior, se evaluó la constante de equilibrio termodinámico entre el estado plegado y el estado desplegado de la CD1, así como los parámetros termodinámicos que definen la estabilidad de una proteína.

El equilibrio del estado plegado y el estado desplegado se define como:

$$F_F + F_D = 1 \quad (2)$$

Donde  $F_F$  representa la fracción de moléculas en la conformación plegada y  $F_D$  representa la fracción de moléculas en su conformación desplegada. En los estudios que evalúan el despegamiento de proteínas, el valor de desnaturalización es expresado en términos de la

fracción desplegada  $Y$ , a determinada concentración de desnaturalizante la cual se define como:

$$Y = Y_N F_N + Y_D F_D \quad (3)$$

donde  $Y_N$  y  $Y_D$  representan los valores típicos de  $Y$  del estado plegado y desplegado respectivamente. Esta ecuación puede ser ajustada para conocer el valor de  $F_U$ , obteniendo la siguiente fórmula:

$$F_D = \frac{Y_N - Y}{Y_N - Y_D} \quad (4)$$

La principal medida de estabilidad de una proteína que se obtienen de los estudios de desnaturalización es  $\Delta G$ , la energía libre requerida para pasar de un estado plegado a uno desplegado. Los valores de la constante de equilibrio,  $K_D$  y  $\Delta G$  pueden ser calculados utilizando las ecuaciones siguientes:

$$K_D = \frac{F_D}{F_N} = \frac{F_D}{1 - F_D} = \frac{Y_N - Y}{Y - Y_D} \quad (5)$$

y

$$\Delta G = -RT \ln K_D \quad (6)$$

donde  $R$  es la constante universal de los gases ( $1.987 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ) y  $T$  es la temperatura medida en grados Kelvin.

La generación de los parámetros de equilibrio ( $\Delta G(H_2O)$  y el valor de  $m$ ), fueron obtenidos utilizando el método de extrapolación lineal descrito por Greene y Pace (1973). Este método asume que el valor de  $\Delta G$  de la transición entre ambos estados, depende linealmente de la concentración del desnaturalizante, la cual se traduce en la ecuación:

$$\Delta G = \Delta G(H_2O) - m[\text{urea}] \quad (7)$$

donde  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  es la estabilidad conformacional de la proteína en unidades de  $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  y  $m$  es la dependencia del desnaturalizante en cambio en la energía libre en unidades de  $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ .

#### ***6.4.2. Efecto de surfactantes no iónicos en la actividad de la CD1***

La actividad de la CD1 fue cuantificada en presencia de distintas concentraciones de los detergentes no-iónicos Tritón-X y Tween-20 (0.0005-0.5%), así como de glicerol (0.5-30%), para evaluar el efecto de estos compuestos sobre la enzima. Para este propósito, 10  $\mu\text{L}$  de CD1 (0.5 mg/mL) fueron llevados a una concentración final de 25 ng/mL, diluyendo la enzima en 50 mM amortiguador de acetatos, pH 4.5 y 0.0005-0.5% de Tween-20, Tritón-X ó 0.5-30% de glicerol. Las muestras fueron incubadas a 25 °C por 24 h. La actividad residual fue cuantificada empleando la metodología descrita en el apartado 6.1.2c. Los ensayos de actividad en presencia de cada concentración de aditivo fueron llevados a cabo por triplicado. La actividad de CD1 no tratada a las 0 y 24 h fue considerada como control experimental.

#### ***6.4.3. Efecto del NaCl en la actividad y la conformación de la CD1***

Con el fin de cuantificar el efecto del NaCl en la actividad y la conformación de la CD1 de langosta americana, la aspártico peptidasa fue expuesta a concentraciones de 0 a 4 M de NaCl en condiciones ácidas (pH 4.5) a 25 °C. Para los ensayos de actividad, la CD1 fue incubada en concentraciones de 0-4 M de NaCl utilizando una solución stock de 4.5 M NaCl disuelta en amortiguador de acetatos pH 4.5 por 24 h a 25 °C. La reacción fue ajustada a 300  $\mu\text{L}$  con amortiguador de acetatos pH 4.5 y se midió la actividad utilizando la metodología descrita en el apartado 6.1.2b. Por otro lado, la cuantificación de la emisión de fluorescencia de la CD1 en presencia de NaCl fue evaluada utilizando una concentración final de 0.05 mg/mL de CD1, la cual fue expuesta a la concentración de 0-4.0 M de NaCl,

reacción que fue ajustada con amortiguador de fosfatos pH 4.5 a 220  $\mu$ L. Las muestras fueron incubadas a 25  $^{\circ}$ C por 24 h. Finalizado este tiempo, se extrajeron 100  $\mu$ L de cada mezcla y se midió la emisión de fluorescencia por duplicado como se indica en el apartado 6.1.3. La actividad y la fluorescencia de la CD1 no tratada fueron consideradas como controles experimentales, y la emisión obtenida de los amortiguadores a la máxima concentración de urea fue considerada como blanco.

#### ***6.4.4. Efecto de solventes orgánicos en la actividad y la conformación de la CD1***

Con el fin de cuantificar el efecto de los solventes orgánicos en la actividad y la conformación de la CD1, la enzima fue expuesta a concentraciones de 0 a 50 % de etanol, metanol, isopropanol y DMSO. Para evaluar la actividad, 10  $\mu$ L (2.5 mg/mL) de CD1 fueron expuestos a la concentración deseada del solvente, equilibrando la reacción con amortiguador 50 mM acetato de sodio, pH 4.5 y llevando a 1 mL de volumen final con agua destilada. Las muestras fueron incubadas a 25  $^{\circ}$ C por 24 h. La reacción fue ajustada a 300  $\mu$ L con amortiguador de acetatos pH 4.5 y se midió la actividad utilizando la metodología descrita en el apartado 6.1.2b. A su vez, la cuantificación de la emisión de fluorescencia de la CD1 en presencia de solventes orgánicos fue evaluada utilizando una concentración final de 0.05 mg/mL de CD1, la cual fue expuesta a la concentración de 0-50% de los solventes antes mencionados. La reacción que fue ajustada con amortiguador de fosfatos (pH 4.5) a 220  $\mu$ L. Las muestras fueron incubadas a 25  $^{\circ}$ C por 24 h. Finalizado este tiempo, se extrajeron 100  $\mu$ L de cada mezcla y se midió la emisión de fluorescencia por duplicado como se indica en el apartado 6.1.3. La actividad y la fluorescencia de la CD1 no tratada fueron consideradas como controles experimentales, y la emisión obtenida de los amortiguadores a la máxima concentración de urea fue considerada como blanco.

#### **6.5. Exposición de CD1 de langosta americana a otras peptidasas comerciales**

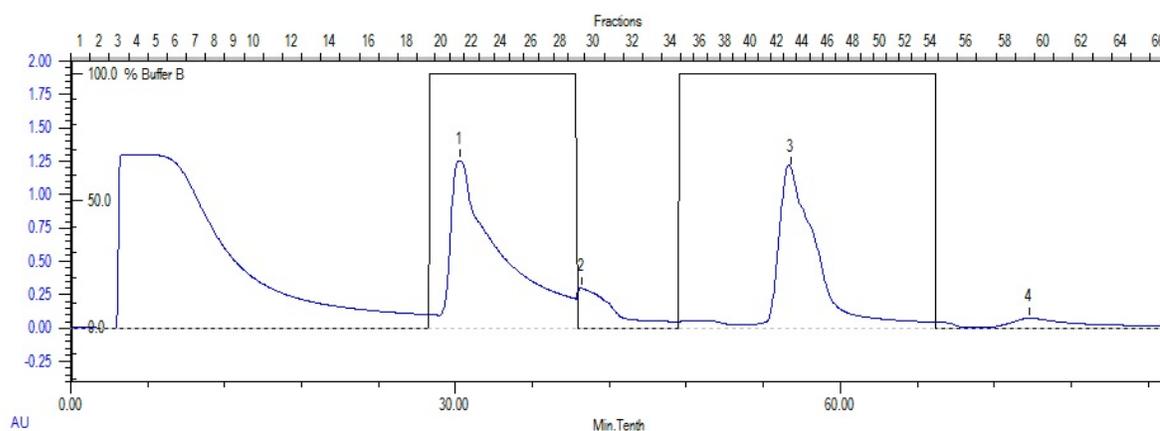
Con el fin de estudiar el potencial proteolítico y la posible resistencia a proteólisis que tiene la CD1, la peptidasa de langosta fue expuesta a dos distintas peptidasas: la papaína (P-

3125, sigma), renina (un extracto de cuajo de bovino comercial), cuya actividad fue previamente calculada empleando la técnica de Díaz-López *et al* (1993). En tubos separados, 6  $\mu\text{L}$  de renina bobina (19.89 U/mL) o 7.5  $\mu\text{L}$  de papaína (12.36 U/mL) fueron adicionados con 24  $\mu\text{L}$  de 225 mM amortiguador de acetatos, 1.5 mM DTT y 21  $\mu\text{L}$  de la CD1 (7.203 U/mL), la reacción se ajustó a 53  $\mu\text{L}$  y fue incubada durante 20 h a 25 °C. Para hacer un monitoreo de la reacción fueron muestreados 18  $\mu\text{L}$  a 1 y, 20 h después del inicio de la reacción. Como control positivo se evaluó la actividad de la renina y la papina incubándolas con la CD1 desnaturalizada por calor. Para descartar auto hidrólisis, cada peptidasa fue expuesta a las condiciones de reacción supliendo a la CD1 con agua destilada y se incubaron por 20 h. Para el análisis de hidrólisis las muestras fueron separadas en un gel de electroforesis 12% siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.1.1.

## 7. RESULTADOS

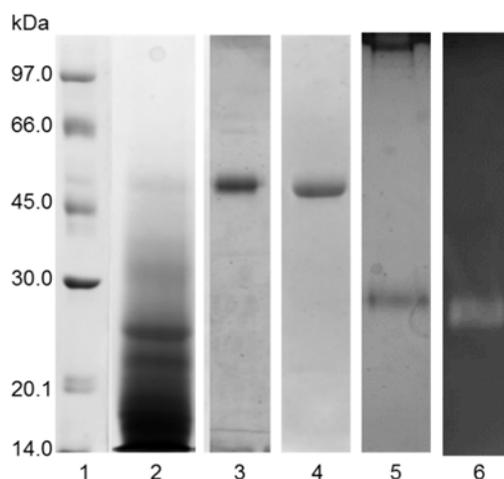
### 7.1. Purificación de la CD1 de langosta americana

Se purificó la aspártico peptidasa CD1 de la langosta americana mediante dos pasos cromatográficos: afinidad con pepstatin A-agarosa e intercambio aniónico. Por cromatografía de afinidad se identificaron cuatro fracciones de elución (Fig. 2). La CD1 se identificó en la cuarta, libre de la mayoría de las proteínas que se encuentran en el jugo gástrico, observándose únicamente dos bandas de proteína (~45 y ~66 kDa), de las cuales la banda más abundante (~45 kDa) corresponde a la enzima de interés (Fig. 3, carril 3).

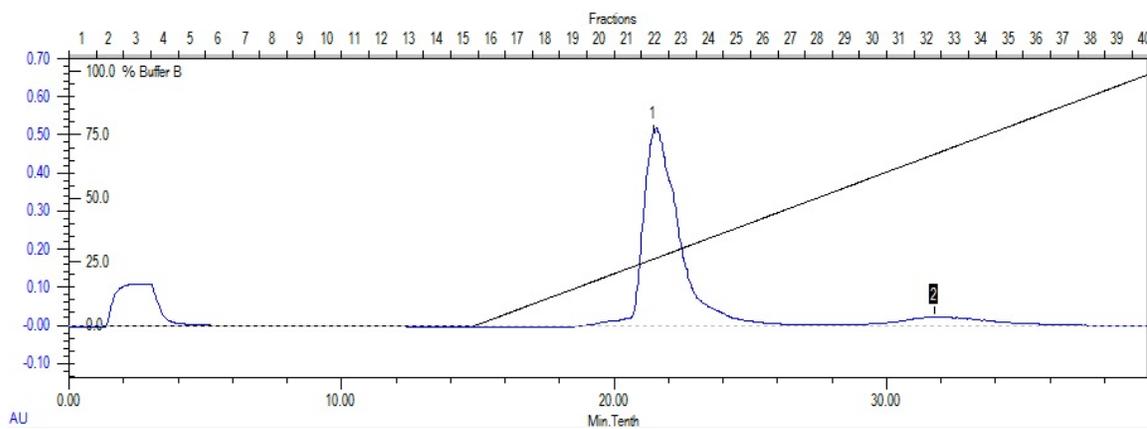


**Figura 2.** Cromatograma de la separación de la CD1 por afinidad con Pepstatin-Agarosa. La línea de tendencia azul señala la absorbancia de UV.

La fracción que contenía a la CD1 fue adsorbida en una columna de intercambio aniónico, método por el cual se obtuvieron dos fracciones principales de elución (Fig. 4), las fracciones del pico eluido a 25 ups, correspondientes al segundo pico, fueron las que presentaron máxima actividad específica y pureza a homogeneidad (Fig. 3, carril 4, 5 y 6). La actividad específica correspondió a 6254.83 U/mg, con un rendimiento de purificación de 9.27% (Tabla II). Utilizando 4 mL de jugo gástrico concentrado se recuperó 1.5 mg de CD1 pura.



**Figura 3.** Purificación de la catepsina D1 de langosta americana. 1) Marcador de peso molecular; 2) extracto crudo de jugo gástrico en condiciones desnaturalizantes; 3) tinción de plata del extracto de CD1 después de utilizar Pepstatin-agarosa 4) tinción de plata de CD1 después de la purificación de intercambio aniónico, en condiciones desnaturalizantes; 5) tinción de plata de CD1 después de la purificación de intercambio aniónico, en condiciones desnaturalizantes 6) actividad de la CD1 purificada por zimograma.



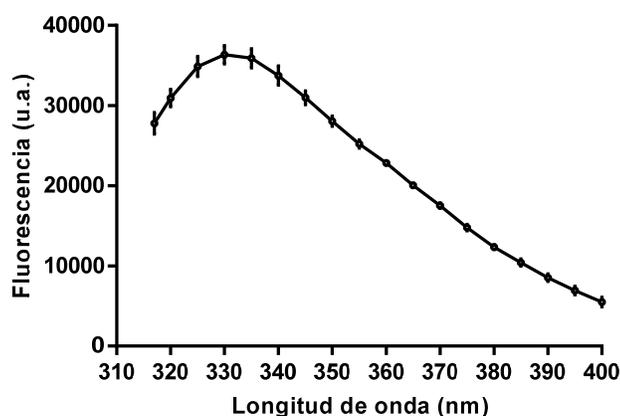
**Figura 4.** Cromatograma del aislamiento de la CD1 por intercambio aniónico. La línea de tendencia azul señala la absorbancia de UV.

**Tabla II.** Tabla de purificación de la CD1 de langosta americana.

	Volúmen (mL)	Concentración de proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Actividad (U/mL)	Actividad total	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Jugo gástrico	1	20.34	20.34	10118.12	10118.12	497.45	1.00	100.00
Precipitación	0.95	15.87	15.08	9432.15	8960.54	594.34	1.19	88.56
Pepstatin-agarosa	0.8	0.80	0.64	2476.00	1980.80	3095.00	6.22	19.58
Intercambio aniónico	0.5	0.30	0.15	1876.45	938.23	6254.83	12.57	9.27

## 7.2. Espectro de emisión de la CD1 nativa

El espectro de emisión de la CD1 en un rango de 315 a 400 nm de longitud de onda fue obtenido mediante el uso de espectrometría de fluorescencia con el fin de identificar la longitud de onda a la cual se presenta la máxima fluorescencia en la enzima. En la figura 5 se observa que la emisión máxima de fluorescencia en la CD1 se presenta a 330 nm de longitud de onda.

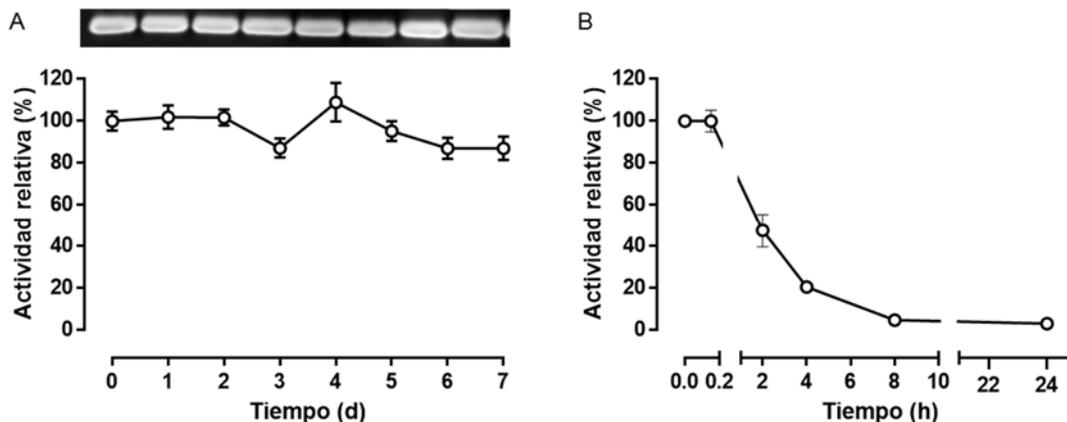


**Figura 5.** Representación a diferentes longitudes de onda del espectro de emisión de fluorescencia de la CD1 excitada a 290 nm a 25 °C y pH 4.5.

## 7.3. La actividad de la CD1 en condiciones ambientales

Mediante ensayos de actividad en tubo y zimogramas, se evaluó la actividad de la CD1 a través del tiempo, a 25 °C a pH 4.5. La enzima purificada y concentrada (0.5 µg/mL) se

mantiene activa hasta por siete días de incubación (Fig. 6A). Por otro lado, la enzima a baja concentración, 0.05 ng/mL, pierde completamente la actividad a las 8 h (Fig. 6B).

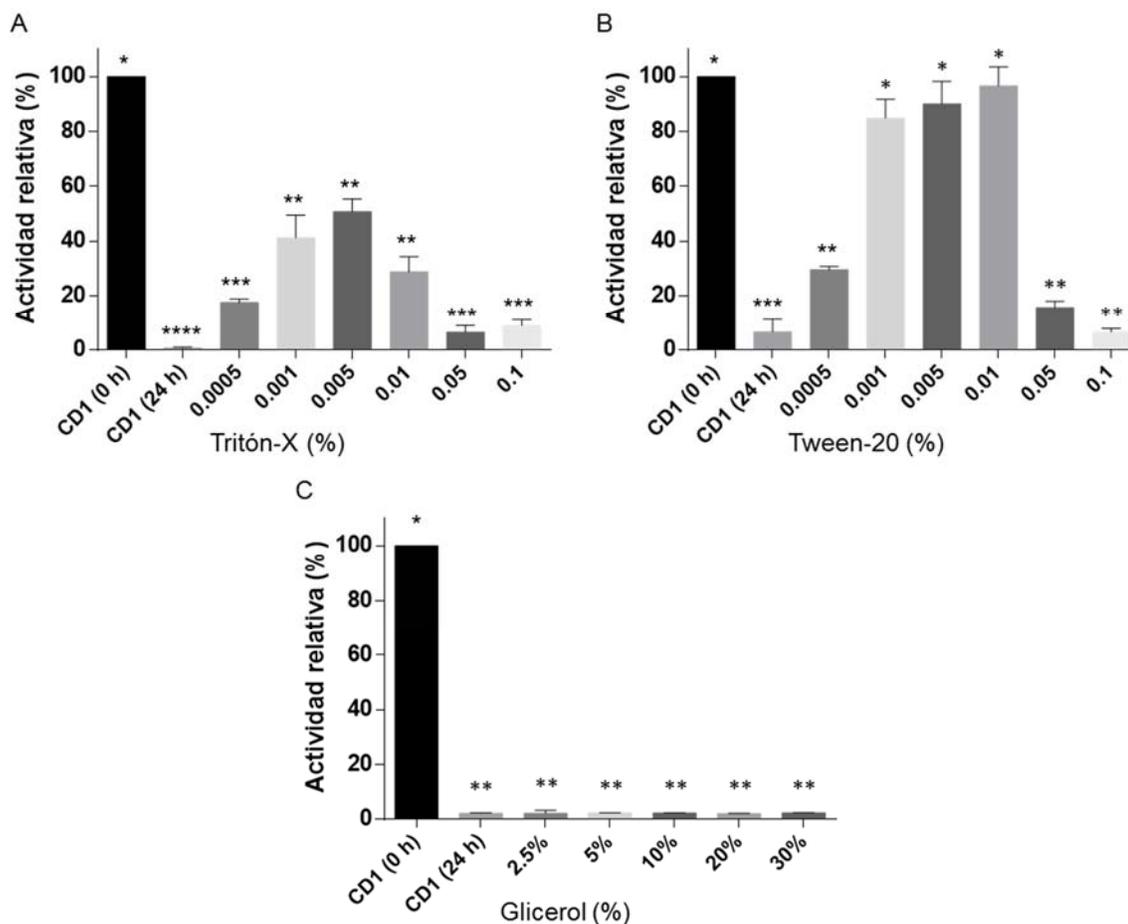


**Figura 6.** Actividad de la CD1 en el tiempo. A) Representación gráfica y zimograma de la actividad de la CD1 concentrada (0.5  $\mu\text{g/mL}$ ) durante siete días de incubación a 25° C, pH 4.5. B) Actividad de la CD1 en dilución (0.05 ng/mL) durante 24 h de incubación a 25° C, pH 4.5. El valor de actividad obtenido al tiempo 0' fue considerado como control. Todos los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado.

#### 7.4. Efecto de surfactantes no iónicos en la actividad de la CD1.

El efecto que tienen el glicerol y los surfactantes no iónicos Tween-20 y Tritón-X sobre la actividad de la CD1 a baja concentración se evaluó mediante ensayos de actividad específica de la enzima tratada con cada uno de ellos a pH 4.5 a 25 °C. En las muestras tratadas con 0.001-0.01 % Tritón-X (Fig. 7A) la actividad de la aspártico peptidasa es parcialmente estabilizada observándose valores de ~60 % de actividad residual después de 24 de incubación. Por otra parte, al ser expuesta a 0.0005, 0.05 y 0.1% del surfactante se observan valores de actividad remanente menores al 20 %. La presencia de 0.001-0.01% Tween-20 (Fig. 7B) generó una estabilización total de la enzima de langosta presentándose valores cercanos al 100 % de actividad residual en las muestras tratadas después de las 24 h de incubación, sin diferencias significativas con el control (tiempo cero). A concentraciones fuera de este rango la actividad residual observada fue menor al 30 %, sin diferencias significativas entre estas y el grupo control a las 24 h de incubación. La actividad de la

CD1 expuesta a 2.5-30 % glicerol (Fig. 7C) no mostró diferencias significativas respecto grupo control después de 24 h de incubación, ya que se observaron valores de actividad residual del 0 % en las muestras tratadas.

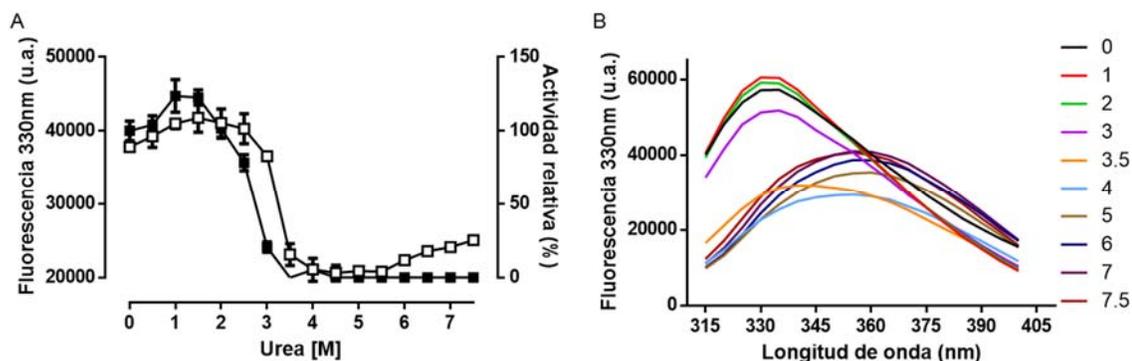


**Figura 7.** Efecto de surfactantes no iónicos en la actividad de la CD1. Actividad de la CD1 en presencia de: A) Tritón-X, B) Tween-20 y C) glicerol después de 24 horas de incubación a 25 °C, pH 4.5. CD1 (0 h), valor de actividad de la CD1 no tratada obtenido al tiempo 0; CD1 (24 h): valor de actividad de la CD1 no tratada después de 24 h de incubación. Todos los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado. Los asteriscos señalan las diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos.

### 7.5. Efecto de Urea en la actividad y la conformación de la CD1.

El efecto de la urea en actividad y conformación de la CD1 fue evaluado mediante ensayos de actividad específica y por la cuantificación de la emisión de fluorescencia intrínseca de

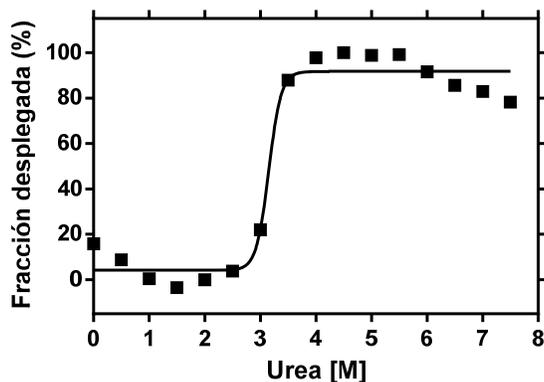
la enzima de langosta, respectivamente, después de incubar por 24 h con urea a 25 °C y pH 4.5. La actividad de la CD1 incubada con 0.5 a 1.5 M urea tiende a aumentar, no obstante, no existen diferencias significativas entre la actividad a estas concentraciones y el grupo control. La enzima se mantiene el 100 % de actividad hasta 2 M de urea y desciende a un 80% a 2.5 M y a un 20% a 3 M. A partir de 3.5 M la enzima se encuentra completamente inactiva (Fig. 8A). El análisis de la fluorescencia de la enzima de langosta a 330 nm señala que no existen diferencias significativas en la fluorescencia de la CD1 cuando es expuesta a concentraciones menores a 3 M. Así mismo, se puede observar que hay un descenso en la fluorescencia a partir de 3.5 M con un valor de intensidad mínimo a 4 M. En 6-7.5 M de urea la fluorescencia tiende a aumentar nuevamente, sin diferencias significativas entre ninguno de estos tratamientos (Fig. 8A). El análisis del espectro de fluorescencia de la CD1 en el rango de 315 a 400 nm señala que existen diferencias significativas en el pico de máxima intensidad de fluorescencia, el cual a concentraciones mayores a 5 M urea se desplaza de 330 nm a 360 nm, (Fig. 8B).



**Figura 8.** Efecto de la concentración de urea en la actividad y la fluorescencia intrínseca de la CD1 de langosta americana, después de 24 horas de incubación a 25 °C y pH 4.5. A) Efecto en la actividad (cuadros oscuros) y en la emisión de fluorescencia a 330 nm (cuadros claros) de la CD1 por la exposición a concentraciones ascendentes de urea. B) Cuantificación de la emisión de fluorescencia del triptófano de la CD1 expuesta a urea (0-7.5 M), en un intervalo de 315 a 400 nm de longitud de onda. El valor de actividad y fluorescencia obtenido de la reacción sin urea, fue considerado como control. Todos los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado.

La estabilidad conformacional de la CD1 se cuantificó mediante la generación de una curva de desnaturalización obtenida por una regresión no lineal con valores de emisión de

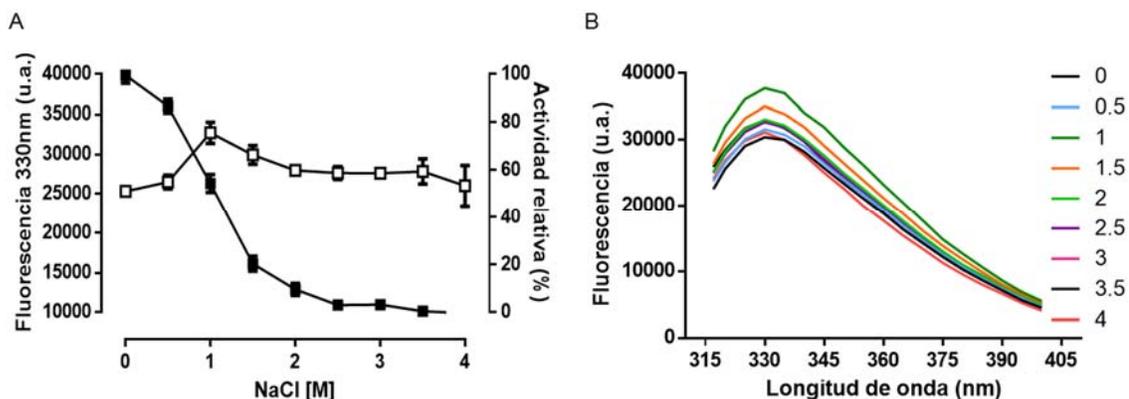
fluorescencia de la enzima a 330 nm después de 24 h de incubación con la urea a 25 °C, pH 4.5 (Fig. 9). La curva muestra que la transición entre el estado plegado y el estado desplegado ocurre entre 2.5 y 4.0 M de urea, observándose una  $C_{1/2}$  de  $3.152 \pm 0.07$ .



**Figura 9.** Curva de desnaturalización de la CD1 inducida por urea después de 24 h de incubación a 25 °C, pH 4.5. Los valores de intensidad de fluorescencia se obtuvieron excitando a 330 nm de longitud de onda.

#### 7.6. Efecto del NaCl en la actividad y la emisión de fluorescencia de la CD1.

El efecto del NaCl en actividad y conformación de la CD1 fue evaluado mediante ensayos de actividad específica y por la cuantificación de la emisión de fluorescencia intrínseca de la enzima de langosta, respectivamente, después de incubar por 24 h con urea a 25 °C y pH 4.5. La actividad de la CD1 disminuyó conforme aumenta la concentración de NaCl (Fig. 10). Al ser expuesta a 0.5 M NaCl la actividad se mantiene cercano al 100% y desciende significativamente a un 50% y un 20 % en 1 y 1.5 M, respectivamente. Al ser expuesta a concentraciones mayores a 2 M la enzima se encuentra totalmente inactiva (Fig. 10A). Por su parte, el aumento en la concentración de NaCl no tiene efecto sobre la emisión de la fluorescencia de la enzima (Fig. 10B), ya que no existen diferencias significativas entre los valores de fluorescencia obtenidos de la enzima expuesta a las diferentes concentraciones.

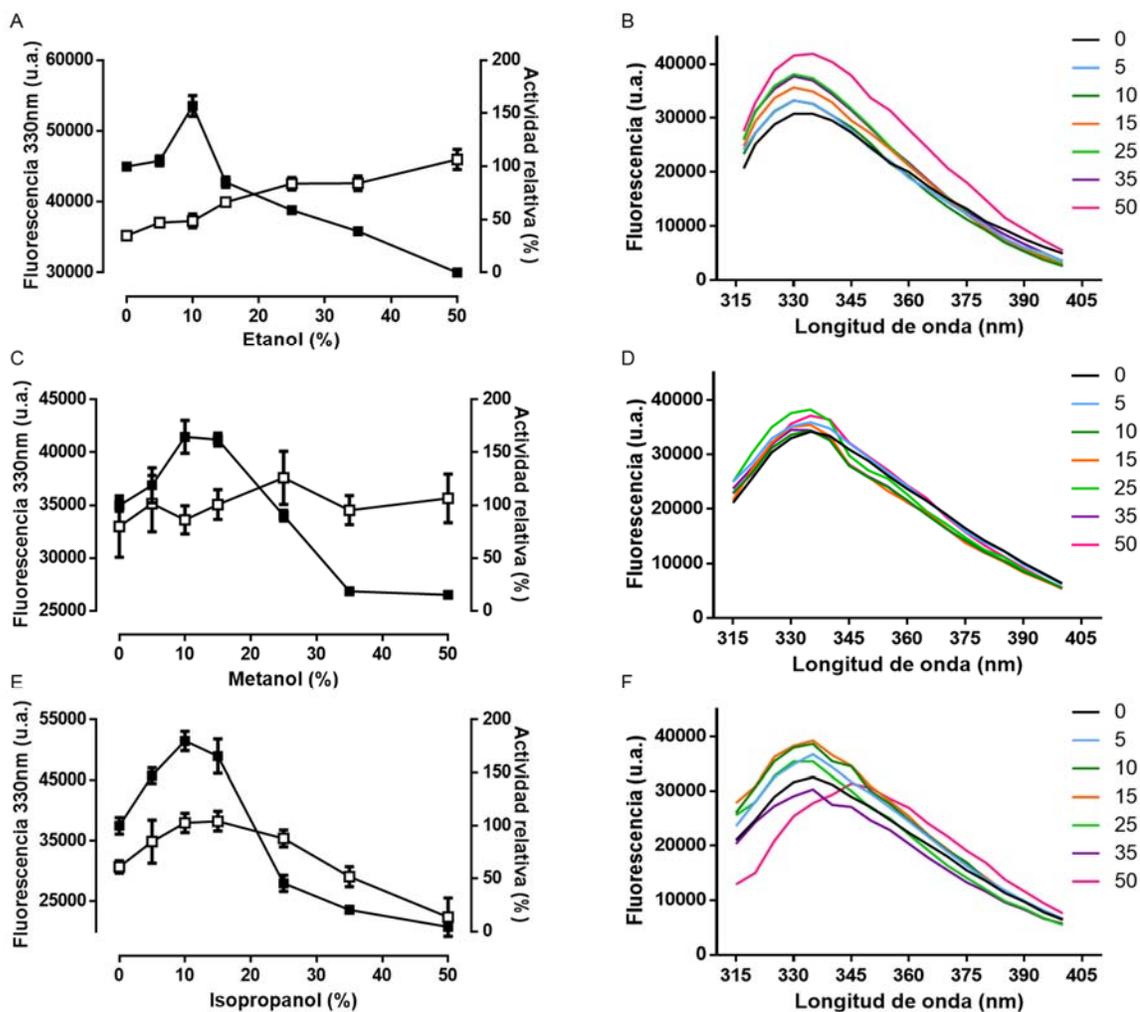


**Figura 10.** Efecto de la concentración de NaCl en la actividad y la emisión de fluorescencia de la CD1 de langosta americana, después de 24 h de incubación a 25 °C, pH 4.5. A) Efecto en la actividad (cuadros oscuros) y en la emisión de fluorescencia a 330 nm (cuadros claros) de la CD1 por la exposición a concentraciones ascendentes de NaCl. B) Cuantificación de la emisión de fluorescencia del triptófano de la CD1 expuesta a NaCl (0-4 M), en un intervalo de 315 a 400 nm de longitud de onda. El valor de actividad y fluorescencia obtenido de la reacción sin NaCl, fue considerado como control. Todos los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado a 25 °C a pH 4.5.

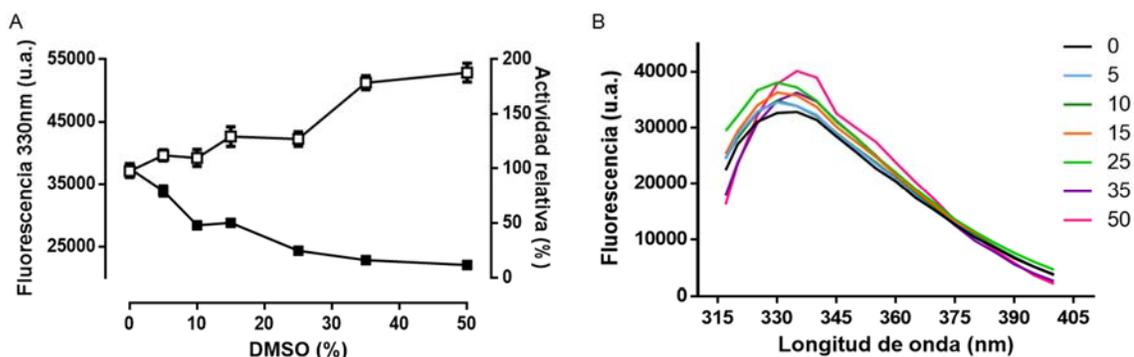
### 7.6. Efecto de solventes en la actividad y la emisión de fluorescencia de la CD1.

El efecto de solventes en la actividad y la conformación de la CD1, la peptidasa de langosta fue expuesta a concentraciones de 0 a 50% v/v de etanol, metanol, isopropanol y DMSO por 24 h a 25 °C, pH 4.5 (Figs. 11 y 12). La actividad en 10% etanol refleja un aumento significativo del 50%. A concentraciones de 5 y 15 % de etanol no hay cambios significativos en la actividad de la enzima con respecto al grupo control. La actividad de la peptidasa disminuye de un 60 a un 40% a concentraciones de 25 y 35% de etanol, respectivamente. En etanol 50% la enzima pierde completamente la actividad (Fig. 11A). En el análisis de emisión de fluorescencia se puede observar que a 5 a 15% de etanol no existen diferencias significativas en la emisión de fluorescencia de la CD1, descartando cambios conformacionales significativos en la enzima. Cambios significativos en la emisión de fluorescencia fueron observados a concentraciones superiores al 25%, mostrando una relación con la pérdida de actividad de la enzima (Fig. 11B). La exposición de la CD1 a concentraciones de 5 a 15% de metanol produce un aumento en la actividad de un 50%. En metanol 25% la enzima mantiene 100% de la actividad. Por encima de 35% de

metanol, la enzima pierde completamente la actividad (Fig. 11C). A pesar de que se observan ligeras variaciones en la fluorescencia de la enzima al ser expuesta a distintas concentraciones de metanol, no existen diferencias significativas en la intensidad de la enzima (Fig. 11D). La presencia de 15% isopropanol genera un aumento significativo del 80% en la actividad de la CD1, la cual desciende a un 50% en isopropanol 25% y se pierde completamente a 35% del solvente (Fig. 11E). La fluorescencia de peptidasa de langosta aumenta significativamente al ser expuesta a 10 y 15% de isopropanol y desciende nuevamente en isopropanol 25%, observándose un desplazamiento del pico de máxima fluorescencia de 330 a 345 nm de longitud de onda, cuando es expuesta 35 y 50% del solvente (Fig. 11F). Contrario a lo que ocurre al exponer a la CD1 a isopropanol, etanol y metanol, la CD1 al ser expuesta a DMSO muestra una disminución significativa de un 40% en 10 y 15% de DMSO. En 25% del solvente la enzima muestra únicamente un 20% de actividad residual, la cual se pierde completamente cuando se expone a la enzima a 35% DMSO (Fig. 12A). La disminución de la actividad de la CD1 en presencia de DMSO se relaciona inversamente con el aumento en la fluorescencia intrínseca. A medida que aumenta la concentración de DMSO, la fluorescencia tiende a aumentar, reflejando cambios conformacionales significativos (Fig. 12B).



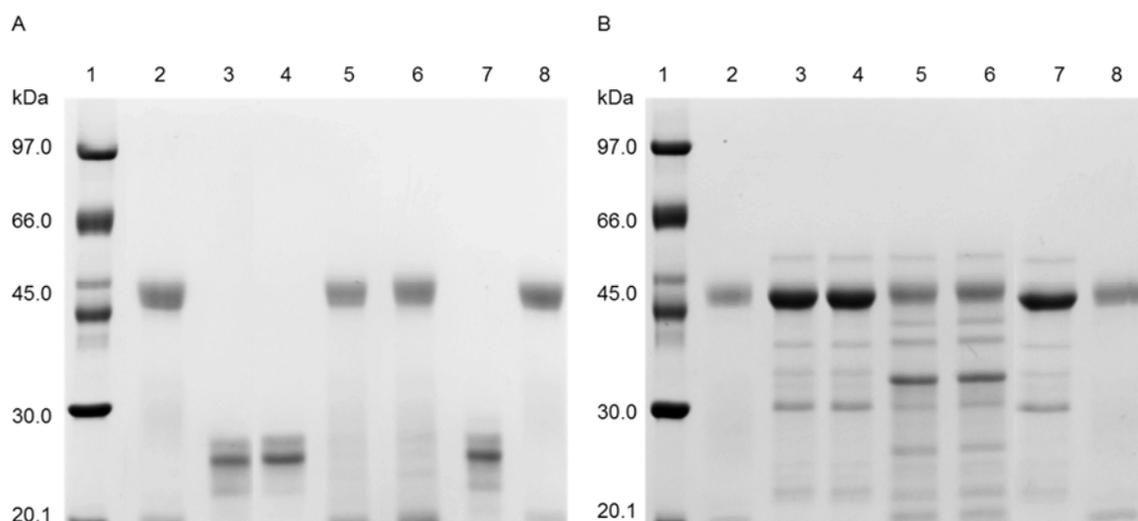
**Figura 11.** Efecto de la exposición de la CD1 a distintas concentraciones de etanol, metanol e isopropanol en la actividad y la fluorescencia intrínseca después de la incubación por 24 h, a 25 °C, pH 4.5. A, C y E) Efecto en la actividad (cuadros oscuros) y en la emisión de fluorescencia a 330 nm (cuadros claros) de la CD1 por la exposición a concentraciones ascendentes de etanol, metanol e isopropanol, respectivamente. B, D y F) Emisión de fluorescencia de la CD1, en un intervalo de 315 a 400 nm de longitud de onda, al ser expuesta a etanol, metanol e isopropanol, respectivamente. El valor de actividad y fluorescencia obtenido del grupo no tratado, fue considerado como control. Todos los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado.



**Figura 12.** Efecto de la exposición de la CD1 a distintas concentraciones de DMSO en la actividad y la fluorescencia intrínseca después de la incubación por 24 h, a 25 °C, pH 4.5. A) Efecto en la actividad (cuadros oscuros) y en la emisión de fluorescencia a 330 nm (cuadros claros) de la CD1 por la exposición a concentraciones ascendentes de DMSO. B) Emisión de fluorescencia de la CD1, en un intervalo de 315 a 400 nm de longitud de onda, al ser expuesta a DMSO. El valor de actividad y fluorescencia obtenido de la reacción sin DMSO fue considerado como control. Todos los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado.

### 7.7. Exposición de la CD1 a enzimas proteolíticas.

Se evaluó la resistencia a hidrólisis de la CD1 al ser expuesta a la renina bovina y la papaína por 20 h, a 25 °C y pH 5.0. La actividad de las dos enzimas comerciales fue confirmada mediante la incubación de cada una con la CD1 previamente desnaturizada por calor, donde se puede observar que ambas peptidasas pueden hidrolizar a la CD1 completamente después de 20 h (Figs. 13A y B, carril 4). La presencia de bandas intactas correspondientes a la enzima de langosta después de 1 y 20 h de incubación con las peptidasas señala que la CD1 es resistente a la hidrólisis por parte de la papaína (Fig. 13A, carriles 5 y 6) y la renina (Fig. 13B, carriles 5 y 6), por su parte se puede observar que la enzima de langosta es capaz de hidrolizar ambas enzimas comerciales. Mediante la incubación de cada una de las péptidasas de manera individual y en las condiciones experimentales se descartó la auto-hidrólisis ya que las bandas correspondientes a cada una permanecieron intactas después de 20 h (Fig. 13, carriles 7 y 8).



**Figura 13.** SDS-PAGE de la exposición de la CD1 a A) papaína y, B) renina. La CD1 fue expuesta de manera individual a cada una de las enzimas. La reacción se incubó durante 1 y, 20 h, a 25 °C y pH 5.0. 1) Marcador de peso molecular, 2) CD1, 3) peptidasa (papaína o renina), 4) peptidasa incubada con CD1 desnaturalizada por calor, 5) peptidasa incubada con CD1 por 1 h, 6) peptidasa incubada con CD1 por, 20 h, 7) enzima incubada por, 20 h, 8) CD1 incubada por, 20 h.

## 8. DISCUSIÓN

La estructura y la actividad de las enzimas se encuentran fuertemente influenciadas por el ambiente. Si bien, se han llevado a cabo diversos estudios para evaluar el efecto que tiene el microambiente en la actividad y la conformación de las peptidasas, la mayoría de ellos se encuentran enfocados en microorganismos, principalmente en peptidasas de la clase serino. En el presente trabajo se evaluó el efecto de urea, NaCl, glicerol, los surfactantes no iónicos: Tween-20 y Tritón-X y los solventes orgánicos: etanol, metanol, isopropanol y DMSO en la actividad y la conformación de la CD de langosta americana, evaluados mediante ensayos de actividad y espectroscopía de fluorescencia, respectivamente, así como la resistencia de la CD1 al ser expuesta a otras enzimas proteolíticas.

### 8.1. La estabilidad de la CD1

En biotecnología, cuando se trabaja con enzimas, uno de los problemas más frecuentes al que nos enfrentamos es la pérdida de actividad. Si bien la CD1 demostró mantenerse activa al menos por 7 días de incubación cuando se encuentra concentrada, debido a que los ensayos de actividad específica de catepsina D se llevan a cabo utilizando un sustrato fluorogénico altamente sensible, es necesario que la preparación enzimática sea diluida hasta 10 000 veces para obtener valores de fluorescencia dentro de la curva estándar de MCA; a esta baja concentración se observó la pérdida total de la actividad después de 8 h. Se ha sugerido que la pérdida de actividad enzimática en las condiciones experimentales se puede deber a factores como procesos oxidativos, envenenamiento de los grupos tiol por la presencia de iones metálicos, la degradación por peptidasas contaminantes e incluso por la adhesión de la proteína al recipiente de almacenamiento (Bisswanger, 2014). El análisis del proceso de la pérdida de actividad no fue elucidado en este trabajo, se recomienda ser considerado en investigaciones futuras.

Al igual que la CD1 a bajas concentraciones, muchas enzimas pueden perder fácilmente su actividad por efecto de ligeros cambios en las condiciones del microambiente, no obstante, existen mecanismos de estabilización que permiten que la enzima mantenga la actividad

aún en condiciones adversas. La estabilización de las enzimas podría lograrse de varias maneras: mediante la modificación química (Díaz-Rodríguez y Davis, 2011), por ingeniería de proteínas (Chamani y Heshmati, 2008), inmovilización (Arola *et al.*, 2012) o mediante el uso de aditivos estabilizantes (Vagenende *et al.*, 2009).

En relación al uso de aditivos, algunos surfactantes como detergentes no iónicos y polioles, como el glicerol, son algunos de los compuestos más utilizados para estabilizar proteínas (Costa *et al.*, 2002). Los detergentes son moléculas anfifílicas que presenta una cabeza polar y una cola no polar. Para estabilizarlas, estos compuestos interactúan con la proteína reduciendo al mínimo la exposición de la porción hidrófoba de la proteína hacia el medio polar, de esta forma únicamente las regiones hidrófilas se exponen al medio acuoso evitando la pérdida de la conformación nativa, la agregación y aumentando la solubilidad (Arnebrant y Wahlgren, 1995). En el presente estudio se demostró que la CD1 es completamente estabilizada cuando se expone a concentraciones de 0.001 a 0.01% de Tween-20, y parcialmente estabilizada a las mismas concentraciones de Tritón-X. Este efecto no ocurre a concentraciones inferiores y superiores de ambos surfactantes. Las propiedades estabilizantes del Tween-20 y Tritón-X han sido reportadas para otras peptidasas (Do Nascimento y Leal Martins, 2006; Ezgimen *et al.*, 2009). Un efecto estabilizante similar ha sido reportado al exponer a la pepsina porcina a surfactantes no iónicos: Tween-80 y Tritón-X, la cual mantiene 100% de su actividad por al menos 24 h de incubación a temperatura ambiente (Guzmán *et al.*, 2016). El efecto estabilizante que tienen ambos detergentes no iónicos en la actividad de otras enzimas hidrolíticas, si bien ha sido ampliamente estudiado, no ha sido completamente elucidado (Eriksson *et al.*, 2002). El efecto estabilizador se atribuye a tres diferentes causas: 1) los surfactantes estabilizan la estructura de las enzimas previniendo la desnaturalización, 2) los surfactantes afectan la estructura del sustrato haciéndolo más accesible para la hidrólisis, 3) los surfactantes afectan la interacción enzima-sustrato haciendo más efectiva la hidrólisis. Con los resultados obtenidos en este trabajo, no es posible identificar si existe una interacción entre el Tritón-X y el Tween-20 con el sustrato para hacerlo más accesible para la hidrólisis. Sin embargo, una interacción entre la peptidasa de langosta y los surfactantes pudiera estar

ocurriendo, dando lugar a la formación de interacciones hidrófobas fuertes con la proteína que resultan en un plegamiento óptimo que da rigidez a su estructura, lo cual le permite a la enzima mantener su conformación, previniendo la desnaturalización. Este mecanismo fue descrito al estudiar la unión del surfactante con diez  $\alpha$  amilasas de diferentes fuentes y que actúan en diferentes procesos y producen diferentes tipos de productos (Yoon y Robyt, 2005). En reacciones de biocatálisis en la industria, una enzima que se mantenga activa a lo largo del tiempo, como la CD1, permitiría aumentar la vida de anaquel de los productos, así como su uso en procesos que requieran enzimas activas por largos periodos de tiempo.

Además de los detergentes no iónicos, otros aditivos de bajo peso molecular como azúcares y otros polioles ejercen un efecto estabilizante mediante la inducción de la hidratación preferencial de las proteínas, que en términos termodinámicos significa que en un sistema proteína-agua-cosolvente, la proteína se encuentra preferencialmente vinculada al agua, mientras que el cosolvente presenta una vinculación negativa, de modo que aumenta la energía libre del estado nativo de la enzima haciéndola más estable (Timasheff, 2002). Sin embargo, los resultados presentados en este trabajo señalan que el glicerol no tiene ningún efecto en la actividad de la CD1, ya que no se observaron diferencias significativas entre la actividad del grupo control a ninguna concentración del aditivo (0.05 a 30%). Si bien el glicerol ha sido catalogado como un buen estabilizador de enzimas, se han reportado peptidasas cuya exposición a este compuesto ha mostrado tener poco o nulo efecto en la actividad (Nirmal y Laxman, 2014). En un estudio donde se evaluó el efecto de distintas concentraciones de glicerol en la actividad de la peptidasa alcalina de *Conidiobolus brefeldianus*, los valores de actividad en las muestras tratadas, si bien presentaron valores ligeramente superiores al grupo control perdieron la actividad con el tiempo, resultados que concuerdan con Costa *et al.* (2002), que afirma que las propiedades estabilizantes que tiene los polioles en la actividad de las enzimas son únicamente aplicables para reacciones a corto plazo.

## 8.2. Desnaturalización de la CD1 inducida por urea refleja relación estructura-función

Un método clásico para evaluar la relación estructura-función de las proteínas, resulta de la evaluación de los cambios en la actividad y la conformación mediante la desnaturalización inducida por agentes caotrópicos como la urea. La desnaturalización se refiere al proceso por el cual una enzima pierde la conformación que le permite tener actividad. La urea es un compuesto conocido por afectar la estructura de las proteínas por la ruptura de las interacciones electrostáticas en la superficie de las proteínas resultado de la formación de puentes de hidrógeno, así como del interior de la proteína por la afinidad que tiene por grupos polares y no polares (Rossky, 2008; Canchi *et al.*, 2010). La desnaturalización de la CD1 fue evaluada por los cambios en la actividad y la emisión de fluorescencia de la enzima cuando es expuesta a urea. Los resultados muestran que hay un decremento en la fluorescencia y en la actividad cuando la enzima es expuesta a concentraciones de 2.5 y 2.0 M de urea, con un punto mínimo de ambas cuando se expone a 4 M, señalando una relación entre ambos parámetros (Fig. 8B). La relación entre la estructura-función de las proteínas es uno de los temas más estudiados en enzimología. Una conformación específica es un requisito para que una proteína pueda interactuar con el sustrato y transformarlo, de esta manera la actividad se mantiene, condición que ha sido descrita en las teorías de arreglo inducido y selección conformacional (Gianni *et al.*, 2014). Existen pocos estudios donde se evalúe la estabilidad de otras aspártico peptidasas al ser expuestas a urea. En comparación con la pepsina porcina que puede mantener el 100% de la actividad hasta una concentración de 5 M de urea (Kubota *et al.*, 2010), la actividad de la CD1 de langosta se mantiene constante hasta 2 M. Por otro lado, tres aspártico peptidasas provenientes de plantas (napentesinas I, IIa y IIb) disminuyen hasta en un 50% la actividad al ser expuestas a concentraciones menores a 1 M urea (Kubota *et al.*, 2010), concentración a la cual la enzima de langosta conserva el 100% de la actividad. Esta comparación hace sugerir que si bien, la CD1 se desnaturaliza más fácilmente que la de porcino, es más estable que otras aspárticopeptidasas.

En un análisis de los cambios en la fluorescencia de la CD1 se puede observar que a medida que aumenta la concentración de urea, la máxima longitud de onda de emisión se desplaza de 330 nm a 360 nm y la fluorescencia aumenta ligeramente (Fig. 8A). Por lo general, el proceso de desnaturalización se genera siguiendo el modelo de dos estados, sin intermediarios significativos entre el estado plegado y el desplegado (Fink *et al.*, 1994). Sin embargo, las diferencias significativas que se observan entre el espectro de fluorescencia de la CD1 a distintas concentraciones de urea sugiere la presencia de un intermediario entre los dos estados de la enzima, a estas conformaciones intermedias se les conocen como glóbulos fundidos (Jennings y Wright, 1993). Estas estructuras han sido reportadas para otras aspártico peptidasas en el proceso de desnaturalización por efecto del pH y la temperatura (Chamani y Heshmati, 2008; Kulkarni *et al.*, 2008), sin embargo, es necesario llevar a cabo otros estudios estructurales como dicroísmo circular y cristalografía para desafiar este supuesto.

### **8.3. Activación de la CD1 a bajas concentraciones de solventes y pérdida de la actividad a concentraciones altas.**

Las reacciones enzimáticas en solventes orgánicos proveen numerosas ventajas industriales, como aumento de la solubilidad de sustratos no polares, la inversión del equilibrio termodinámico de las reacciones de hidrólisis, la supresión de reacciones secundarias que dependen del agua, la alternancia de la especificidad de sustrato, la enantioselectividad, y la eliminación de la contaminación microbiana. Sin embargo, la mayoría de las enzimas presentan valores bajos de actividad cuando son expuestas a solventes orgánicos, lo cual resulta predecible dado que muchas de ellas en condiciones fisiológicas se encuentran actuando principalmente en ambientes acuosos (Yang *et al.*, 2004).

Pese a la pérdida de actividad en presencia de solventes, distintas peptidasas provenientes de microorganismos han mostrado tener la capacidad de catalizar reacciones de hidrólisis en presencia de solventes orgánicos (Gupta y Khare, 2007; Badoei-Dalfard y Karami, 2013); algunas peptidasas de crustáceos poseen características similares (Teschke y

Saborowski, 2005; Bibo-Verdugo *et al.*, 2015). En estudios centrados en peptidasas solvente-tolerantes se plantea que la actividad de las enzimas en presencia de éstos se encuentra influenciada por distintos factores como la flexibilidad estructural, la polaridad de su microambiente, la conformación y la dinámica de cada enzima (Doukyu y Ogino, 2010). En el presente estudio, se reporta a la CD1 como una enzima con actividad en presencia de bajas concentraciones de los solventes orgánicos: etanol, metanol e isopropanol. La enzima mostró un aumento de entre un 35 a un 80% en la actividad cuando fue expuesta a bajas concentraciones (5-15%) de los solventes antes mencionados. A estas concentraciones no se observaron diferencias significativas en la emisión de fluorescencia de la CD1, por lo tanto, se sugiere que no hay cambios en la estructura terciaria de la enzima. Comparativamente, en un estudio de simulación molecular no se observaron cambios significativos en la estructura de la subtilisina BPN' al ser expuesta a concentraciones bajas octano (Yang *et al.*, 2004). La activación de peptidasas en presencia de solventes orgánicos se ha atribuido principalmente a la mejora de la nucleofilicidad de los grupos funcionales en el sitio activo de la enzima en presencia de disolvente orgánico (Kudryashova *et al.*, 2003).

Cuando la enzima es expuesta a concentraciones de entre un 25 y 35% de etanol, metanol e isopropanol y 10% de DMSO, se observó una disminución cercana al 50% de la actividad. Estudios donde se ha evaluado la actividad de enzimas resistentes a solventes señalan que el aumento en la concentración de los mismos, genera una competencia entre el agua y los solventes para interactuar con la enzima (Timasheff, 2002b), y esta competencia depende de la polaridad del solvente (Verma y Ghosh, 2010). Se ha demostrado que los enlaces relacionados con la actividad de los residuos que componen el hueco de oxianión del sitio activo de la subtilisina son afectados por el solvente, disminuyendo o restringiendo la unión con el sustrato que en consecuencia conduce a la pérdida de la actividad enzimática (Szabó *et al.*, 2009). Algunos solventes orgánicos a bajas concentraciones inducen una unión preferencial negativa con las proteínas, es decir, que existe una mayor preferencia por el agua que por el solvente, sin embargo, a medida que aumenta la concentración la unión preferencial se hace positiva lo que lleva a la proteína a tener mayor afinidad por el

solvente modificando la conformación de la proteína (Arakawa *et al.*, 2007). Algunos estudios han evaluado la respuesta de aspártico peptidasas en presencia de solventes orgánicos, Simon *et al.* (2007) evaluaron el efecto de distintos solventes orgánicos en la actividad de la pepsina porcina, señalando que ésta mantiene la actividad en concentraciones de hasta 70% de etanol y acetonitrilo, no obstante se ha demostrado que la actividad disminuye a través del tiempo (Bansal *et al.*, 2010), de modo que los resultados de actividad proteolítica para la pepsina porcina no pueden ser comparables con los reportados en este trabajo debido a que la pepsina fue incubada con los solventes únicamente por 20 min, mientras que aquí se presenta la actividad residual de la CD1 después de 24 horas de exposición.

La disminución en la actividad a altas concentraciones de solventes también se ha asociado a un desequilibrio con las moléculas de agua que mantienen la conformación del sitio activo, necesaria para que se lleve a cabo la actividad catalítica. En este trabajo, los resultados de fluorescencia del triptófano reportados anteriormente para la pepsina porcina concuerdan con los reportados para la CD1 de langosta. La pepsina muestra un aumento significativo en la fluorescencia en concentraciones de 70% de etanol (Simon *et al.*, 2007), atribuido a un reordenamiento de la estructura terciaria de la enzima ocasionado por el cambio en la polaridad del ambiente que restringe la exposición del Trp. Con base en lo anterior, se propone que la CD1 al exponerse a concentraciones superiores al 35% de todos los solventes presenta una interacción positiva con estos lo cual modifica su conformación, esto es soportado por la presencia de cambios significativos en la intensidad de fluorescencia, así como a la pérdida total de la actividad de la enzima.

Algunas peptidasas de crustáceos han demostrado ser estables o incluso activarse por la exposición a solventes orgánicos (Saborowski *et al.*, 2004; Bibo-Verdugo *et al.*, 2015). En 2004, se reportó un aumento de hasta un 800% en la actividad proteolítica de quimotripsina del cangrejo *C. pagurus*, al ser expuesta a concentraciones menores de 40 % propanol, etanol y acetona (Saborowski *et al.*, 2004). Por otro lado, en, 2015 se reportó la presencia de una serino peptidasa solvente-tolerante en la langosta *P. interruptus*, que presentó

aumento en la actividad proteolítica al ser expuesta a concentraciones bajas y moderadas de etanol, DMSO, acetona (Bibo-Verdugo *et al.*, 2015). La tolerancia a solventes orgánicos de la CD1 y de otras peptidasas de crustáceos hace notar la capacidad de las peptidasas de estos organismos de poder catalizar reacciones en presencia de solventes diferentes del agua y por consiguiente la factibilidad de éstos de ser utilizados como biocatalizadores industriales en procesos que requieran de estas condiciones.

#### **8.4. La CD1 una enzima resistente a proteólisis**

La resistencia de la aspártico peptidasa de langosta a la presencia de las peptidasas renina y papaina en condiciones ácidas resulta de gran importancia en biotecnología ya que la hidrólisis por enzimas proteolíticas se encuentra relacionada con la pérdida de actividad en diversos procesos industriales. La presencia de bandas intactas en SDS-PAGE correspondientes a la CD1 cuando es expuesta a la papaina y la renina, así como a la desaparición de las bandas correspondientes a éstas dos enzimas. El presente trabajo se reporta a la CD1 como una enzima resistente a proteólisis, lo cual ha sido asociado a enzimas cinéticamente estables (Daniel *et al.*, 1982). Las proteínas cinéticamente estables tienen una superficie exterior que le confiere esta resistencia a la proteólisis (Grzelczak y Lane, 1984), si bien existen un sinnúmero de enlaces peptídicos expuestos en una proteína globular, por lo general los sitios de corte se presentan en regiones de la cadena altamente flexible o no estructurada (Fontana *et al.*, 1986; 1997). La CD1, al ser una peptidasa con la capacidad de catalizar a bajas temperaturas, ha sido asociada como una enzima con un sitio activo flexible, lo cual contrasta con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que la peptidasa de langosta es resistente a la presencia de otras peptidasas, cualidad que se atribuye a enzimas de estructuras rígidas, por lo tanto surge el supuesto que la CD1 es una enzima que posee un sitio activo flexible y al mismo tiempo, una estructura rígida que le impide a otras peptidasas hidrolizarla. Para confirmar este hecho se recomienda llevar a cabo estudios de cristalografía, mutagénesis o análisis bioinformáticos.

### 8.5. Observaciones importantes

La actividad de las proteínas se encuentra fuertemente relacionada con la flexibilidad, fluctuaciones intermoleculares y otros procesos dinámicos. La CD1, es una aspártico peptidasa con la capacidad de catalizar reacciones en un amplio espectro de pH y temperatura en comparación con otras enzimas homólogas. Además ha sido catalogada como una enzima adaptada al frío (Rojo *et al.*, 2013), esta capacidad ha sido relacionada con enzimas caracterizadas por presentar alta flexibilidad (D'Amico *et al.*, 2003). En el presente trabajo se reporta que la peptidasa de langosta es una enzima capaz de catalizar reacciones en una amplia gama de ambientes que incluyen la presencia de solventes orgánicos, surfactantes no iónicos, NaCl y urea, lo que no concuerda con la baja estabilidad que caracteriza a las enzimas adaptadas al frío (D'Amico *et al.*, 2003). Las diferencias observadas entre la CD1 y otras enzimas adaptadas al frío, no resultan sorprendentes, ya que se ha demostrado que la peptidasa de langosta presenta características poco convencionales de enzimas adaptadas al frío. Por ejemplo, los valores de la  $K_{cat}$  no solo no disminuyen a temperaturas moderadas, aumentan, comportándose también como una enzima mesofílica (Bibo-Verdugo *et al.*, 2016). La capacidad que tiene la CD1 de langosta americana de catalizar reacciones a un amplio espectro de temperatura, pH, la presencia de caotrópicos, NaCl, surfactantes no iónicos, solventes orgánicos, además de mantenerse estable por largos periodos y ser resistente a proteólisis, posiciona a esta aspártico peptidasa, como una enzima con gran potencial de ser utilizada en procesos aplicados en la industria.

## 9. CONCLUSIONES

La CD1 de langosta americana es capaz de mantener la actividad hasta por siete días de incubación cuando se encuentra concentrada, por el contrario, la pierde a baja concentración.

Existe una relación estructura-función de la CD1 cuando es expuesta a concentraciones ascendentes de urea. Cuando es expuesta a 2.5 M de urea se observa un decremento en la actividad, así como en la emisión de fluorescencia presentando un valor mínimo de ambas a 4 M.

La CD1 es estabilizada por la presencia de Tween-20 y Tritón-X a concentraciones de 0.001 a 0.01%, los cuales concuerdan con la concentración crítica de formación de micelas reportado para ambos detergentes.

La CD1 es una enzima-solvente-tolerante con la capacidad de catalizar e incluso activarse significativamente a concentraciones bajas (<15%) de etanol, metanol, isopropanol y DMSO.

La CD1 tiene la capacidad de hidrolizar otras enzimas proteolíticas que catalizan a pH ácido, al mismo tiempo es una enzima resistente a proteólisis, ya que ninguna de las enzimas a las que se expuso fue capaz de hidrolizarla.

Con base en lo anterior, la hipótesis propuesta se confirma debido a que la CD1 de langosta americana se mantiene activa en función de la conformación cuando es expuesta a distintos agentes químicos desnaturizantes y, a su vez, es resistente a proteólisis. Estas características resultan de gran importancia ya que se corrobora el potencial de las peptidasas de crustáceos de ser aplicadas en la industria de los biocatalizadores.

## 10. LITERATURA CITADA

- Alsafadi, D., F. Paradisi. 2013. Effect of organic solvents on the activity and stability of halophilic alcohol dehydrogenase (ADH2) from *Haloferax volcanii*. *Extremophiles*.17:115–122.
- Andreeva, N.S., L.D. Rumsh. 2008. Analysis of crystal structures of aspartic proteinases: On the role of amino acid residues adjacent to the catalytic site of pepsin-like enzymes. *Protein Sci.* 10:2439–2450.
- Arakawa, T., Y. Kita, S.N. Timasheff. 2007. Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide. *Biophys. Chem.* 131:62–70.
- Arnebrant, T., M.C. Wahlgren. 1995. Protein-Surfactant Interactions at Solid Surfaces. *Proteins Interfaces II*. En: Horbett, T.A., L. John (eds). *Brush Proteins Interfaces II: Fundamentals and Applications*. American Chemical Society. Lund, Sweden. pp 239–254.
- Arola, S., T. Tammelin, H. Setälä, A. Tullila, M.B. Linder. 2012. Immobilization-stabilization of proteins on nanofibrillated cellulose derivatives and their bioactive film formation. *Biomacromolecules* 13:594–603.
- Aspmo, S.I., S.J. Horn, V.G. H. Eijsink. 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochem.* 40:1957–1966.
- Badoei-Dalfard, A., Z. Karami. 2013. Screening and isolation of an organic solvent tolerant-protease from *Bacillus* sp. JER02: Activity optimization by response surface methodology. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 89:15–23.
- Bansal, V., Y. Delgado, E. Fasoli, A. Ferrer, K. Griebenow, F. Secundo, G.L. Barletta. 2010. Effect of prolonged exposure to organic solvents on the active site environment of subtilisin Carlsberg. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 64:38–44.
- Beadle, B.M., B.K. Shoichet. 2002. Structural bases of stability-function tradeoffs in enzymes. *J. Mol. Biol.* 321:285–296.
- Benes, P., V. Vetvicka, M. Fusek. 2008. Cathepsin D-Many functions of one aspartic protease. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 68(1):12-28.
- Bernard, D., B. Méhul, A Thomas-Collignon, C. Delattre, M. Donovan, R. Schmidt. 2005. Identification and characterization of a novel retroviral-like aspartic protease specifically expressed in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 125:278–287.
- Bibo-Verdugo, B., A.J. O'Donoghue, L. Rojo-Arreola, C.S. Craik, F. García-Carreño. 2016. Complementary proteomic and biochemical analysis of peptidases in lobster gastric

juice uncovers the functional role of individual enzymes in food digestion. *Mar. Biotechnol.* 18:201–214.

Bibo-Verdugo, B., L. Rojo-Arreola, M.A. Navarrete-del-Toro, F. García-Carreño. 2015. A chymotrypsin from the digestive tract of california spiny lobster, *Panulirus interruptus*: Purification and Biochemical Characterization. *Mar. Biotechnol.* 17:416–427.

Bisswanger, H. 2014. Enzyme assays. *Perspect. Sci.* 1:41–55.

Canchi, D.R., D. Paschek, A.E. García. 2010. Equilibrium study of protein denaturation by urea. *J. Am. Chem. Soc.* 132:2338–2344.

Chamani, J., M. Heshmati. 2008. Mechanism for stabilization of the molten globule state of papain by sodium n-alkyl sulfates: Spectroscopic and calorimetric approaches. *J. Colloid Interface Sci.* 322:119–127.

Chi, E.Y., S. Krishnan, T.W. Randolph, J.F. Carpenter. 2003. Physical stability of proteins in aqueous solution: Mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm. Res.* 20(9):1325-1336.

Collins, T., M.A. Meuwis, C. Gerday, G. Feller. 2003. Activity, stability and flexibility in glycosidases adapted to extreme thermal environments. *J. Mol. Biol.* 328:419–428.

Copley, S.D. 2012. Toward a systems biology perspective on enzyme evolution. *J. Biol. Chem.* 287(1):3-10

Costa, S.A., T. Tzanov, A. Filipa, A. Paar, G.M. Gu. 2002. Studies of stabilization of native catalase using additives 30:387–391.

Csermely, P., R. Palotai, R. Nussinov. 2010. Induced fit, conformational selection and independent dynamic segments: An extended view of binding events. *Trends Biochem. Sci.* 35:539–546.

D’Amico, S., P. Claverie, T. Collins, D. Georlette, E. Gratia, A. Hoyoux, M.-A. Meuwis, et al. 2002. Molecular basis of cold adaptation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 357:917–25.

D’Amico, S., J.C. Marx, C. Gerday, G. Feller. 2003. Activity-stability relationships in extremophilic enzymes. *J. Biol. Chem.* 278:7891–7896.

Daniel, R.M., D. a Cowan, H.W. Morgan, M.P. Curran. 1982. A correlation between protein thermostability and resistance to proteolysis. *Biochem. J.* 207:641–644.

Demirjian, D.C., F. Moris-Varas, C.S. Cassidy. 2001. Enzymes from extremophiles. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5(2):144-151.

- Díaz-Rodríguez, A., B.G. Davis. 2011. Chemical modification in the creation of novel biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15(2):211-219.
- Do Nascimento, W.C.A., M.L. Leal Martins. 2006. Studies on the stability of protease from *Bacillus* sp. and its compatibility with commercial detergent. *Brazilian J. Microbiol.* 37:307–311.
- Doukyu, N., H. Ogino. 2010. Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochem. Eng. J.* 48(3):270-282.
- Dubey, V.K., M. V Jagannadham. 2003. Differences in the unfolding of procerain induced by pH, guanidine hydrochloride, urea, and temperature. *Biochemistry.US*, 42(42):12287-12297.
- Dufrechou, M., C. Poncet-Legrand, F.X. Sauvage, A. Vernhet. 2012. Stability of white wine proteins: Combined effect of pH, ionic strength, temperature on their aggregation. *J. Agric. Food Chem.* 60:1308–1319.
- Dunn, B.M., M.M. Goodenow, A. Gustchina, and A. Wlodawer. 2002. Retroviral proteases. *Genome Biol.* 3(4).
- Eriksson, T., J. Börjesson, F. Tjerneld. 2002. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme Microb. Technol.* 31:353–364.
- Espósito, T.S., I.P.G. Amaral, D.S. Buarque, G.B. Oliveira, L.B. Carvalho, R.S. Bezerra. 2009. Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. *Food Chem.* 112:125–130.
- Ezgimen, M.D., N.H. Mueller, T. Teramoto, R. Padmanabhan. 2009. Effects of detergents on the West Nile virus protease activity. *Bioorg. Med. Chem.* 17:3278–82.
- Ezquerria, J.M., F.L. García-Carreño, R. Civera, N.F. Haard. 1997. pH-stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 157(3):251-262.
- Fersht, A.R. 2008. From the first protein structures to our current knowledge of protein folding: delights and scepticisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:650–654.
- Fields, P.A. 2001. Review: Protein function at thermal extremes: Balancing stability and flexibility. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 129(2):417-431.
- Fink, A.L., L.J. Calciano, Y. Goto, T. Kurotsu, D.R. Palleros. 1994. Classification of acid denaturation of proteins: intermediates and unfolded states. *Biochemistry-US* 33:12504–12511.

- Fontana, A., G. Fassina, C. Vita, D. Dalzoppo, M. Zamai, M. Zambonin. 1986. Correlation between sites of limited proteolysis and segmental mobility in thermolysin. *Biochemistry-US*. 25:1847–51.
- Fontana, A., P. Polverino de Laureto, V. De Filippis, E. Scaramella, M. Zambonin. 1997. Probing the partly folded states of proteins by limited proteolysis. *Fold. Des.* 2:R17–R26.
- Gamboa-Delgado, J., C. Molina-Poveda, C. Cahu. 2003. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquac. Res.* 34:1403–1411.
- García-Carreño, F.L., L.E. Dimes, N.F. Haard. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214(1):65-69.
- Georlette, D., V. Blaise, T. Collins, S. D’Amico, E. Gratia, A. Hoyoux, J.C. Marx, et al. 2004. Some like it cold: Biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiol. Rev.* 28(1):25-42.
- Gianni, S., J. Dogan, P. Jemth. 2014. Distinguishing induced fit from conformational selection. *Biophys. Chem.* 189:33–39.
- Gomes-Malaquias, C. S., I. I. Gonçalves-Simões, C. J. Fialho Costa. 2016. Use of plant aspartic proteases for treating skin conditions. US 14/777,848. 19 march 2014.
- González-Zamorano, M., M.A. Navarrete del Toro, F.L. García-Carreño. 2013. Exogenous proteinases as feed supplement for shrimp: In vitro evaluation. *Aquac. Nutr.* 19:731–740.
- Guerard, F., L. Guimas, A. Binet. 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 19:489–498.
- Gupta, A., S.K. Khare. 2007. Enhanced production and characterization of a solvent stable protease from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Enzyme Microb. Technol.* 42:11–16.
- Held, P. 2003. Quantitation of peptides and amino acids with a Synergy™MHT using UV fluorescence. Biotek.
- Horikoshi, T., S. Igarashi, H. Uchiwa, H. Brysk, M.M. Brysk. 1999. Role of endogenous cathepsin D-like and chymotrypsin-like proteolysis in human epidermal desquamation. *Br. J. Dermatol.* 141:453–459.

- Hurley, M.J., L.B. Larsen, A.L. Kelly, P.L.H. McSweeney. 2000. The milk acid proteinase cathepsin D: A review. *Int. Dairy J.* 10(10):673-681.
- Iyer, P. V., L. Ananthanarayan. 2008. Enzyme stability and stabilization-aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochem.* 43(10):1019-1032.
- Jennings, P.A., P.E. Wright. 1993. Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin. *Science.* 262:892-896.
- Karan, R., M.D. Capes, S. Dassarma. 2012. Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. *Aquat. Biosyst.* 8:4.
- Kokkinidis, M., N.M. Glykos, V.E. Fadouloglou. 2012. Protein flexibility and enzymatic catalysis. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 87:181-218.
- Kubota, K., Y. Metoki, S.B.P. Athauda, C. Shibata, K. Takahashi. 2010. Stability profiles of nepenthesin in urea and guanidine hydrochloride: comparison with porcine pepsin A. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74:2323-2326.
- Kudryashova, E. V, T.M. Artemova, A. a Vinogradov, A.K. Gladilin, V. V Mozhaev, A. V Levashov. 2003. Stabilization and activation of alpha-chymotrypsin in water-organic solvent systems by complex formation with oligoamines. *Protein Eng.* 16:303-309.
- Kulkarni, A., S. Gaikwad, M. Rao. 2008. pH induced structural alterations in an aspartic protease from *Vigna radiata* indicating an alkali induced molten globule state. *Int. J. Biol. Macromol.* 43:373-376.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Landbo, A.K.R., M. Pinelo, A.F. Vikbjerg, M.B. Let, A.S. Meyer. 2006. Protease-assisted clarification of black currant juice: Synergy with other clarifying agents and effects on the phenol content. *J. Agric. Food Chem.* 54:6554-6563.
- Laycock, M. V., R.M. MacKay, M. Di Fruscio, J.W. Gallant. 1991. Molecular cloning of three cDNAs that encode cysteine proteinases in the digestive gland of the American lobster (*Homarus americanus*). *FEBS Lett.* 292:115-120.
- Laycock, M. V, T. Hirama, S. Hasnain, D. Watson, A.C. Storer. 1989. Purification and characterization of a digestive cysteine proteinase from the American lobster (*Homarus americanus*). *Biochem. J.* 263:439-44.
- Lemos, D., F.L. Garcia-Carreño, P. Hernández, A. Navarrete del Toro. 2002. Ontogenetic variation in digestive proteinase activity, RNA and DNA content of larval and postlarval white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Aquaculture.* 214:363-380.

- Müller, M., A. Denicola. 2002. Protein tryptophan accessibility studied by fluorescence quenching. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 30(3):175-178.
- Macouzet, M., B.K. Simpson, B.H. Lee. 1999. Cloning of fish enzymes and other fish protein genes. *Crit. Rev. Biotechnol.* 19:179–96.
- Marangon, M., F.X. Sauvage, E.J. Waters, A. Vernhet. 2011. Effects of ionic strength and sulfate upon thermal aggregation of grape chitinases and thaumatin-like proteins in a model system. *J. Agric. Food Chem.* 59:2652–2662.
- Mesquita, P.R., M.A. Piçarra-Pereira, S. Monteiro, V.B. Loureiro, A.R. Teixeira, R.B. Ferreira. 2001. Effect of wine composition on protein stability. *Am. J. Enol. Vitic.* 52:324–330.
- Navarrete Del Toro, M.D.L.A., F. García-Carreño, M.D. López, L. Celis-Guerrero, R. Saborowski. 2006. Aspartic proteinases in the digestive tract of marine decapod crustaceans. *J. Exp. Zool. Part A Comp. Exp. Biol.* 305:645–654.
- Neelakantan, S., A.K. Mohanty, J.K. Kaushik. 1999. Production and use of microbial enzymes for dairy processing. *Curr. Sci.* 77:143–148.
- Niehaus, F., F. Niehaus, C. Bertoldo, C. Bertoldo, M. Kähler, M. Kähler, G. Antranikian, et al. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:711–729.
- Nirmal, N.P., R.S. Laxman. 2014. Enhanced thermostability of a fungal alkaline protease by different additives. *Enzyme Res.* 2014.
- Nguyen, L.T., J.M. Wiencek, L.E. Kirsch. 2003. Characterization methods for the physical stability of biopharmaceuticals. *PDA J Pharm Sci Technol.* 57(6): 429-445.
- Pace, C.N. 1990. Conformational stability of globular proteins. *Trends Biochem. Sci.* 15:14–17.
- Pace, C.N., B.A. Shirley, M. McNutt, K. Gajiwala. 1996. Forces contributing to the conformational stability of proteins. *FASEB J.* 10:75–83.
- Parravicini, F., S. Brocca, M. Lotti. 2016. Evaluation of the conformational stability of recombinant desulfurizing enzymes from a newly isolated *Rhodococcus* sp. *Mol. Biotechnol.* 58:1–11.
- Pearl, L., T. Blundell. 1984. The active site of aspartic proteinases. *FEBS Lett.* 174:96–101.

- Pinelo, M., B. Zeuner, A.S. Meyer. 2010. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. *Food Bioprod. Process.* 88:259–265.
- Pocock, K.F., P.B. Høj, K.S. Adams, M.J. Kwiatkowski, E.J. Waters. 2003. Combined heat and proteolytic enzyme treatment of white wines reduces haze forming protein content without detrimental effect. *Aust. J. Grape Wine Res.* 9:56–63.
- Prakash, O., N. Jaiswal. 2010. Alfa-Amylase: An ideal representative of thermostable enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160(8):2401-2414.
- Rawlings, N.D., A.J. Barrett. 2013. *Handbook of proteolytic enzymes. Volume 1.* Elsevier. Tercera edición. Amsterdam.
- Rojo, L., F. García-Carreño, M. de los Angeles Navarrete del Toro. 2013a. Cold-adapted digestive aspartic protease of the clawed lobsters *Homarus americanus* and *Homarus gammarus*: biochemical characterization. *Mar. Biotechnol.* 15:87–96.
- Rojo, L., A. Muhlia-Almazan, R. Saborowski, F. García-Carreño. 2010a. Aspartic cathepsin d endopeptidase contributes to extracellular digestion in clawed lobsters *Homarus americanus* and *Homarus gammarus*. *Mar. Biotechnol.* 12:696–707.
- Rojo, L., R. Sotelo-Mundo, F. García-Carreño, L. Gráf. 2010b. Isolation, biochemical characterization, and molecular modeling of American lobster digestive cathepsin D1. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 157:394–400.
- Rosky, P.J. 2008. Protein denaturation by urea: slash and bond. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:16825–16826.
- Royer, C.A. 2006. Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence. *Chem. Rev.* 106(5):1769-1784.
- Royer, C. a, C.J. Mann, C.R. Matthews. 1993. Resolution of the fluorescence equilibrium unfolding profile of trp aporepressor using single tryptophan mutants. *Protein Sci.* 2:1844–1852.
- Saborowski, R., G. Sahling, M., Navarrete del Toro, I. Walter, F.. García-Carreño. 2004. Stability and effects of organic solvents on endopeptidases from the gastric fluid of the marine crab *Cancer pagurus*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 30:109–118.
- Sainz, J.C., F.L. García-Carreño, P. Hernández-Cortés. 2004. *Penaeus vannamei* isotrypsins: Purification and characterization. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 138:155–162.

Scarff, C. A., K. Thalassinou, G.R. Hilton, J.H. Scrivens. 2008. Travelling wave ion mobility mass spectrometry studies of protein structure: biological significance and comparison with X-ray crystallography and nuclear magnetic resonance spectroscopy measurements. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22(20):3297-3304.

Simon, L.M., M. Kotormán, A. Szabó, J. Nemcsók, I. Laczkó 2007. The effects of organic solvent/water mixtures on the structure and catalytic activity of porcine pepsin. *Process Biochem.* 42:909–912.

Sumantha, A., C. Larroche, A. Pandey. 2006. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: A perspective. *Food Technol. Biotechnol.* 44(2):211.

Szabó, A., M. Kotormán, I. Laczkó, L.M. Simon. 2009. Improved stability and catalytic activity of chemically modified papain in aqueous organic solvents. *Process Biochem.* 44:199–204.

Tavano, O.L. 2013. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 90:1-11.

Teschke, M., R. Saborowski. 2005. Cysteine proteinases substitute for serine proteinases in the midgut glands of *Crangon crangon* and *Crangon allmani* (Decapoda: Caridea). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 316:213–229.

Timasheff, S.N. 2002a. Protein hydration, thermodynamic binding, preferential hydration. *Biochemistry-US.* 41:13473–13482.

Timasheff, S.N. 2002b. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, the modulation of biochemical reactions by solvent components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:9721–6.

Vagenende, V., M.G.S. Yap, B.L. Trout. 2009. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry-US.* 48:11084–11096.

Venkatesh, R., S. Srimathi, A. Yamuna, G. Jayaraman. 2005. Enhanced catalytic and conformational stability of Atlantic cod trypsin upon neoglycosylation. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1722:113–115.

Verma, S.K., K.K. Ghosh. 2010. Catalytic activity of enzyme in water/organic cosolvent mixtures for the hydrolysis of p-nitrophenyl acetate and p-nitrophenyl benzoate. *Indian J. Chem. - Sect. A Inorganic, Phys. Theor. Anal. Chem.* 49:1041–1046.

Yang, L., J.S. Dordick, S. Garde. 2004. Hydration of enzyme in nonaqueous media is consistent with solvent dependence of its activity. *Biophys. J.* 87:812–821.

Yasuda, Y., T. Kageyama, A. Akamine, M. Shibata, E. Kominami, Y. Uchiyama, K. Yamamoto. 1999. Characterization of new fluorogenic substrates for the rapid and sensitive assay of cathepsin E and cathepsin D. *J. Biochem.* 125:1137–43.

Yoon, S.H., J.F. Robyt. 2005. Activation and stabilization of 10 starch-degrading enzymes by Triton X-100, polyethylene glycols, and polyvinyl alcohols. *Enzyme Microb. Technol.* 37:556–562.

Watkms, J.A., D.C. Hayyvard. 1999. Composition containing protease separate from glycosidase for removing nits in treating lice infestation. U.S. 5,935,572. Jan, 1997. Appl 08/781,643. 7p.