



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos
Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Especialidad en Conservación y Procesamiento de Productos Marinos

Purificación y Caracterización de la Tripsina del Intestino
de la Lisa (*Mugil cephalus*) y Evaluación de su Capacidad
Hidrolítica sobre el Gluten de Trigo Duro (*Triticum durum*)

TESIS

que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Hermenegildo Olivas Burrola

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



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

CONTENIDO

	Página
DEL AUTOR.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
CONTENIDO.....	v
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	4
ANTECEDENTES.....	5
Producción Pesquera.....	5
Características de la Lisa (<i>Mugil cephalus</i>).....	5
Tecnología Enzimática.....	7
→ Generalidades de Enzimas.....	7
## ^{rep} Caracterización de una Enzima.....	8
Ensayos con Inhibidores.....	12
→ Importancia de las Enzimas en la Industria Alimentaria.....	13
→ Fuentes de Enzimas.....	16
→ Proteasas de Origen Acuático.....	18

CONTENIDO (Continuación)

→ Tripsina.....	18
→ Aplicaciones de la Tripsina de Origen Marino.....	20
→ Trigo.....	21
Generalidades del Trigo.....	21
Producción de Trigo.....	22
Clasificación del Trigo.....	22
→ Trigo Duro.....	23
→ Aprovechamiento del Trigo Duro.....	24
Composición Química del Trigo.....	24
Proteínas del Gluten del Trigo.....	25
Composición de Aminoácidos de las Proteínas del Gluten.....	26
Uso de Proteasas en Productos Horneados.....	26
HIPÓTESIS.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
Parte I. Ensayos de Purificación.....	29
Materia Prima.....	29
Metodología.....	30
Obtención del Extracto Crudo y Purificación de la Tripsina.....	30
Preparación de la Columna de Cromatografía de Afinidad.....	31

CONTENIDO (Continuación)

Cromatografía de Afinidad.....	32
Actividad de Tripsina.....	32
Electroforésis en Gel de SDS-Poliacrilamida.....	33
Pruebas de Inhibición.....	33
Efecto del pH sobre la Actividad y Estabilidad de la Tripsina.....	34
Efecto de la Temperatura sobre la Actividad y Estabilidad de la Tripsina.....	34
Parte II. Evaluación de la Capacidad Hidrolítica de la Enzima Tipo Tripsina de la Lisa (<i>Mugil cephalus</i>) sobre el Gluten de Trigo.....	35
Materia Prima.....	35
Obtención de la Harina.....	35
Obtención del Gluten de Trigo.....	36
Hidrólisis del Gluten.....	36
Tinción con Nitrato de Plata (Protocolo).....	37
Determinación de Proteína.....	38
Diseño de Experimentos y Análisis Estadístico.....	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
Características Físicas de la Lisa.....	39
Cromatografía de Afinidad.....	39

CONTENIDO (Continuación)

Electroforésis en Gel de SDS-Poliacrilamida.....	43
Efecto de Inhibidores.....	48
Efecto del pH sobre la Actividad y Estabilidad de la Enzima Tipo Tripsina.....	50
Efecto de la Temperatura sobre la Actividad y Estabilidad de la Enzima Tipo Tripsina.....	53
Prueba de Hidrólisis.....	57
Hidrólisis del Gluten.....	57
CONCLUSIONES.....	66
RECOMENDACIONES.....	67
BIBLIOGRAFÍA.....	68

LISTA DE TABLAS

TABLA	Página
1. Esquema de la purificación de la tripsina del intestino de la lisa (<i>Mugil cephalus</i>) del Golfo de California.....	42
2. Porcentaje de proteína hidrolizada estimada del gluten utilizando la proteasa comercial y la enzima tipo tripsina de la lisa (<i>Mugil cephalus</i>) del Golfo de California.....	59

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1. Cromatograma de purificación de la tripsina del intestino de la lisa (<i>Mugil cephalus</i>) del Golfo de California.....	41
2. Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida al 12% de la enzima Tipo tripsina del intestino de la lisa (<i>Mugil cephalus</i>).....	44
3. Zimograma de actividad en gel de SDS-Poliacrilamida de la enzima tipo tripsina de la lisa (<i>Mugil cephalus</i>)	46
4. Efecto de inhibidores sobre la actividad de la enzima tipo tripsina del intestino de la lisa (<i>Mugil cephalus</i>), empleando BAPNA como substrato a 25°C, pH 7.8.....	49
5. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima tipo tripsina empleando BAPNA como substrato a 25°C, en solución amortiguadora universal.....	51
6. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima tipo tripsina empleando BAPNA como substrato, en solución amortiguadora Tris-HCl a pH de 7.8.....	54
7. Hidrólisis del gluten de los trigos duros (variedad Aconchi y Altar) y del trigo panadero (variedad Rayón) empleando la enzima tipo tripsina y la proteasa comercial.....	58

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

FIGURA	Página
8. Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida de la hidrólisis del trigo duro variedad Aconchi.....	61
9. Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida de la hidrólisis del trigo duro variedad Altar.....	62
10. Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida de la hidrólisis del trigo panadero variedad Rayón.....	63

RESUMEN

En el presente estudio se purificó y caracterizó a la enzima tipo tripsina del intestino de la lisa (*Mugil cephalus*). La enzima fue purificada por cromatografía de afinidad y se caracterizó en sus parámetros fisicoquímicos de peso molecular por electroforesis en SDS-Poliacrilamida, pH y temperatura, además se realizaron pruebas de inhibición en gel de SDS-Poliacrilamida y en tubo, para confirmar la presencia de la enzima tipo tripsina. La actividad específica detectada para la enzima tipo tripsina fue de 0.24 U/mg de proteína del intestino; en el gel de SDS-Poliacrilamida se observaron 3 bandas con pesos moleculares de 27 kDa, 72 kDa y 75 kDa, siendo la banda de 27 kDa la que posee un peso molecular al reportado para tripsina. Se observó en gel que la actividad de la enzima tipo tripsina fue inhibida por el SBTI, Inhibidor de tripsina y quimotripsina de soya, TLCK y PMSF. En las pruebas en tubo se detectó que la enzima fue inhibida por PMSF (64%), SBTI (97%), , TLCK (86%) y EDTA (59%). La enzima tipo tripsina presentó un pH óptimo entre 8-10, fue estable a pH de 4, 7 y 9 por 30 min, mientras que en la temperatura , la enzima presentó dos picos de máxima actividad, a 40°C y 60°C y fue más estable a 0°C, que a 40°C y 70°C por 30 min.

El porcentaje de proteína que la enzima tipo tripsina de la lisa (ETL), hidrolizó del gluten de trigo duro (Aconchi y Altar) y panadero (Rayón), fue de 24.3%, 24% y 22.6%, respectivamente; resultados menores al compararse contra una proteasa comercial (PC) (27.33% para Aconchi, 27.76% para Altar y 28.9 para Rayón). La ETL

hidrolizó mejor los trigos duros que los panaderos y en base a las propiedades físicas presentadas por la ETL esta posee potencial de aplicarse en la elaboración de productos horneados a partir de trigos duros.

INTRODUCCIÓN

Sonora se ha caracterizado por ser uno de los principales estados con mayor producción pesquera en los últimos años, ocupando en el 2000 el primer lugar nacional en este renglón con 362,495 toneladas. Dentro de las principales especies que se capturan están el camarón, la sardina, calamar y también especies de escama, entre las cuales se encuentra la lisa (SAGARPA, 2001).

En el 2000, la captura de la lisa fue de 156 toneladas, correspondiendo 101 al sector social y 55 al sector privado (SAGARPA 2001). La lisa se puede capturar todo el año y su principal forma de comercialización es fresca-enhielada, aunque también se consume seca-salada o ahumada (Vasconcelos *et al.*, 1992).

Durante estos procesos, tradicionalmente se eliminan sus vísceras, las cuales pueden generar una gran fuente de contaminación. Sin embargo, estas vísceras representan una buena fuente de enzimas digestivas, que podrían ser aprovechadas dentro de la industria alimentaria y de esta manera ofrecer alternativas de manejo para estos desechos (Reece, 1988).

Las principales proteasas marinas purificadas y que han sido aplicadas en la industria de alimentos, son las pepsinas, tripsinas, quimosinas y quimotripsinas; las cuales se han aislado y purificado de diferentes organismos marinos (Haard, 1990; 1992; Haard y Simpson, 1994; De Vecchi y Coppes, 1996). De las enzimas anteriores, las que han sido más estudiadas e investigadas para su aplicación en procesos industriales, han

sido las tripsinas (Haard y Simpson, 1994). Hay que hacer incapie que estos estudios se han realizado en especies de agua fría, teniéndose poca información en organismos de climas templados o cálidos.

Las enzimas de origen marino se han empleado dentro de la industria de productos marinos en la obtención de hidrolizados de proteína de pescado, salsa de pescado o los curados de arenque, y recientemente en la remoción selectiva de la piel de ciertos peces, hidrólisis de membranas y tejidos de soporte que envuelven a las huevas y otros tejidos, remoción de escamas, recuperación de pigmentos y extractos de sabor (Haard, 1990; 1992; Haard y Simpson, 1994). Otras aplicaciones de éstas enzimas son en la prevención de la formación del sabor a oxidado en la leche, inactivación de la enzima pectin metil esterasa en jugos cítricos y en la elaboración de quesos (Simpson y Haard, 1987; Haard, 1990; 1992; Haard y Simpson, 1994). Otro uso potencial de estas enzimas podría ser su aplicación durante la elaboración de productos horneados a partir de trigo.

En la industria de la panificación, el trigo que se utiliza debe poseer ciertas características como gluten de medio fuerte a fuerte y elástico (Serna Saldívar, 1996). México desafortunadamente tiene baja producción de trigo panadero, por lo que se requiere de buscar alternativas de manejo para los otros tipos de trigo que se producen en el país, como es el caso de los trigos cristalinos, para que puedan ser aprovechados también en la industria panadera.

Con respecto al estado de Sonora, también se caracteriza por ser el principal productor de trigo en el país, con una producción de 1,532,850 toneladas (SAGARPA,

2001), de las cuales 1162,792 toneladas corresponden al denominado trigo duro, el cual se destina principalmente a la elaboración de pastas (INEGI, 1997). Significando esto, que dicho trigo posee poco mercado en el país, haciéndose necesario buscar alternativas de manejo y aprovechamiento en la elaboración de otros productos alimenticios.

Por todo lo anterior, el objetivo general que se plantea en este trabajo es extraer, purificar y caracterizar la tripsina del intestino de la lisa (*Mugil cephalus*) y evaluar su capacidad hidrolítica sobre el gluten de trigo duro (*T. durum*). Estos estudios permitirán determinar la viabilidad de la utilización de la tripsina del intestino de la lisa en la elaboración de productos horneados a partir de trigo, ya sea cristalino o bien panadero.

OBJETIVO GENERAL

Purificar y caracterizar la tripsina del intestino de la lisa (*Mugil cephalus*) y evaluar su capacidad hidrolítica sobre las proteínas del gluten del trigo duro (*Triticum durum*), variedades Aconchi y Altar.

OBJETIVOS PARTICULARES

Establecer las condiciones para extraer y purificar la tripsina a partir del intestino de la lisa (*Mugil cephalus*).

Caracterizar parcialmente la tripsina en base a pH, temperatura y peso molecular.

→ Evaluar la capacidad hidrolítica de la tripsina sobre las proteínas del gluten de trigo duro, variedades Aconchi y Altar.

ANTECEDENTES

Producción Pesquera

El estado de Sonora se ha caracterizado por ser de los principales estados con mayor producción pesquera. En el 2000 ocupó el primer lugar a nivel nacional en esta actividad con una producción de 362,495 toneladas (SAGARPA, 2001). Las principales especies que se capturan en el Golfo de California por parte de Sonora son la sardina, camarón y calamar (SAGARPA, 2001). Además se cuenta con especies que son capturadas por pescadores ribereños como las de escama, entre las cuales se encuentra la lisa.

La lisa, es una especie tropical, que tiene importancia social y económica para los habitantes de la zonas de litorales y lagunas costeras, ya que esta especie se destina para abasto popular y carnada (Vasconcelos *et al.*, 1992). En el 2000, la captura de la lisa fue de 156 toneladas, correspondiendo 101 al sector social y 55 al sector privado (SAGARPA 2001).

Características de la Lisa (*Mugil cephalus*)

La pesquería de lisa en México esta soportada por dos especies: *Mugil cephalus* y *Mugil curema*. Ambas presentan características morfológicas semejantes, habitan

ecosistemas comunes y sus hábitos alimenticios y de reproducción son también similares (Vasconcelos *et al.*, 1992).

La lisa es un especie cosmopolita de mares tropicales y templados, habita en aguas turbias de fondo limoso en los trópicos; también frecuenta aguas claras sobre fondos arenosos de coral y acantilados rocosos. En el pacífico la lisa se encuentra madura en los meses correspondientes a otoño e invierno, con un período de madurez y desove (Vasconcelos *et al.*, 1992).

En la época de reproducción, las lisas se concentran formando cardúmenes que migran de las lagunas costeras hacia el mar, en donde se lleva a cabo el desove. Para los habitantes de las zonas litorales y lagunas costeras, este recurso adquiere importancia social y económica, porque se destina para abasto popular y carnada. En la temporada de reproducción, se comercializa la hueva de la lisa (gónada), que alcanza un valor elevado y tiene gran demanda en el mercado exterior (Vasconcelos *et al.*, 1992).

La lisa se captura durante todo el año; sin embargo, la mayor abundancia se obtiene cuando se concentran en grandes cardúmenes superficiales cerca de la costa, durante su migración reproductiva, que es cuando se denomina lisa gorda. En Sonora se captura en los meses de Febrero y Marzo, también en Septiembre y Octubre. La talla mínima de captura para la lisa es de 31 cm (Vasconcelos *et al.*, 1992).

La principal comercialización de la lisa es fresca-enhielada, aunque también se comercializa en forma seca-salada o ahumada. Desafortunadamente el precio de la lisa es bajo. Por esto y con el objeto de no agregarle ningún valor en la comercialización, la presentación más general es fresca-enhielada (Vasconcelos *et al.*, 1992).

Con la pesca y comercialización de la lisa y otras especies, se generan problemas de contaminación en las playas, debido a los desechos originados durante la evisceración de los peces (comunicación personal). Estos desechos pueden ser una buena fuente de enzimas y considerando que hay pocos trabajos en especies tropicales, como es el caso de la lisa, resulta de gran interés realizar su estudio.

Tecnología Enzimática

Se considera que ésta es una era de oro para el aprovechamiento de oportunidades en cuanto al desarrollo de nuevas técnicas de transformación y aplicación en cualquier área del conocimiento, principalmente en la ciencia de los alimentos. Uno puede visualizar una revolución en cuanto a la tecnología enzimática (obtención y aprovechamiento de enzimas) encaminada hacia la preparación y procesado de alimentos.

Generalidades de Enzimas

Las enzimas son compuestos presentes en el material biológico y la vida en si depende de un complejo trabajo de reacciones químicas controladas por enzimas específicas, y cualquier alteración en el patrón normal de una enzima en un organismo, puede ocasionar serios trastornos biológicos. Se manejan varios conceptos de la definición de enzima, como que es “una proteína con propiedades catalíticas debido a su poder específico de activación” (Whitaker, 1994). Otro concepto es que una enzima es

un tipo de proteína presente y esencial en todos los organismos vivos. Las enzimas tienen numerosas funciones en la célula, una de ellas es ayudar a convertir al alimento en energía y nuevo material para el crecimiento y reparación de los órganos en los cuales ellas funcionan (Mathewson, 1998). Sin embargo, el concepto de enzima se ha modificado debido al conocimiento que actualmente se tiene, de que algunas moléculas del ácido ribonucleico (RNA) pueden actuar como enzimas (Whitaker, 1994).

Las enzimas como catalizadores, están involucradas en la modificación de proteínas durante los procesos orgánicos como la digestión y mecanismos post-mortem del ablandamiento (enzimas endógenas) y deterioro (enzimas endógenas y exógenas) de la carne (Haard, 1995). Como proteínas las enzimas son susceptibles a la pérdida de su poder catalítico por condiciones que desnaturalicen a la proteína, son inactivadas por proteinasas y son fáciles de modificar aplicando la ingeniería de proteínas y técnicas de recombinación de DNA (Haard, 1995).

Caracterización de una Enzima

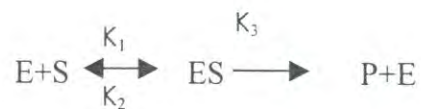
Factores que afectan la velocidad de reacción de una enzima. La velocidad a la cual la reacción enzimática procede es dependiente de muchos factores, pero los más importantes son el pH del medio de reacción (generalmente una solución acuosa), temperatura, especificidad de sustrato, y la cantidad de sustrato disponible para reaccionar comparado con la cantidad de enzima presente.

a) Especificidad de Sustrato. Una propiedad importante de las enzimas es la alta especificidad que tienen para catalizar reacciones. La especificidad de las enzimas

incluye la naturaleza química del sustrato, así como también el tipo de transformación química (Haard, 1995), pequeños cambios en la estructura de una molécula de sustrato pueden incapacitar a la enzima para convertir el compuesto a producto (Whitaker, 1994).

La actividad de algunas enzimas depende solamente de su estructura como proteínas, mientras que otras necesitan de cofactores, que pueden ser un ion metálico o una molécula orgánica llamada coenzima. El complejo enzima cofactor catalíticamente activo recibe el nombre de holoenzima. Cuando se separa el cofactor, la proteína restante es por sí misma catalíticamente inactiva, y se designa con el nombre de apoenzima (Lehninger, 1995).

La velocidad de una enzima al catalizar la formación de un producto (P) es también dependiente de la cantidad de sustrato (S) y enzima (E), de acuerdo a la siguiente relación:



en donde la velocidad de formación del complejo enzima-sustrato (ES) esta determinado por la [S] y la afinidad E y S. La afinidad, está experimentalmente medida por la constante de Michaelis (Km) (Haard, 1995). La Km es igual a la concentración de sustrato a la cual la reacción se desarrolla exactamente a la mitad de su velocidad máxima (Haard, 1995; Lehninger, 1995).

b) pH. Las fuerzas que mantienen a la proteína en su forma particular son el resultados de numerosas interacciones, teniendo entre estas fuerzas al enlace peptídico (α -hélice y hoja plegada) y a las formadas por las cadenas laterales (grupos R) de los aminoácidos que constituyen a la proteína. Las cadenas laterales de los aminoácidos pueden ser cargadas, positiva o negativamente dependiendo del pH de la solución. La habilidad de los aminoácidos presentes en el sitio activo de una enzima para interactuar con el sustrato, depende de su estado electrostático, es decir, si estos aminoácidos están adecuadamente cargados o sin carga, así como también su orientación espacial. Si el pH no es correcto, la carga sobre uno o todos los aminoácidos requeridos es tal que el sustrato nunca se une y por lo tanto no reacciona para producir productos. Muchas enzimas, tienen un amplio rango de pH en el cual catalizan una reacción eficientemente (Mathewson, 1998). La mayoría de las enzimas poseen un pH característico al cual su actividad es máxima; por encima o por debajo de ese pH la actividad disminuye (Berk, 1980; Lehninger, 1995). El pH óptimo de una enzima depende de varios factores como: tiempo de reacción, temperatura, naturaleza y concentración del sustrato, naturaleza y concentración de la solución amortiguadora, fuerza iónica del medio y pureza de la preparación de la enzima, entre otras (Whitaker, 1994).

Cuando la actividad de una enzima es medida a diferentes pH, sus curvas de actividad son generalmente acampanadas, observándose un pH óptimo de actividad entre 5 a 9 (Lehninger, 1995); sin embargo, hay enzimas que poseen un pH de actividad más bajos, por ejemplo las pepsinas (pH 2) (Whitaker, 1994). La influencia

del pH sobre la actividad enzimática se aprovecha a menudo en tecnología de alimentos para retardar reacciones enzimáticas perjudiciales o acelerar las deseables, por medio del control del pH del medio (Berk, 1980).

- c) **Temperatura.** El efecto de la temperatura es similar al efecto del pH. Algunas veces el calor puede ayudar a una enzima, pero también puede inactivarla. Al aplicar mucho calor al sistema, esto ayuda a superar la barrera de energía. Esto sucede por dos razones; primero, en una solución caliente las moléculas se mueven más rápido. Además, los reactantes colisionan más seguido y con mayor energía. En general, las reacciones químicas, incluyendo las reacciones enzimáticas, obedecen lo que es conocido como la regla Q_{10} . La velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas se incrementa en general con la temperatura dentro del intervalo en que la enzima es estable y permanece totalmente activa. La velocidad de muchas reacciones enzimáticas, se duplica, aproximadamente por cada 10°C de aumento de la temperatura ($Q_{10}=2,0$) (Lehninger, 1995).

A altas temperaturas, la desnaturalización de las enzimas es más rápida, debido a que hay un gran número de moléculas que tienen la suficiente energía para pasar al estado de desnaturalización, propiciada por el rompimiento de los enlaces secundarios que mantienen la estructura nativa de una enzima, perdiéndose por consecuencia la estructura terciaria y con ello la actividad catalítica (Whitaker, 1994)

- d) **Efecto de la concentración de sustrato.** La enzima trabaja más eficientemente cuando está disponible un exceso de sustrato. Si la concentración de sustrato es baja comparada con la de la enzima, las colisiones exitosas son pocas. Cuando la

concentración de sustrato es muy alta comparada con la de la enzima, las colisiones exitosas se obtienen más rápidamente, asegurando que muchas de las enzimas están unidas en un complejo llamado enzima-sustrato y el producto se obtiene a su máxima velocidad. Cuando la concentración de sustrato es baja, se produce poco producto y la actividad de la enzima está en su mínimo (Mathewson, 1998).

Ensayos con Inhibidores.

Cualquier compuesto que reduce la velocidad de una reacción catalizada por una enzima es un inhibidor (Stauffer, 1989; Whitaker, 1994). El inhibidor de proteasas tiene una estructura parecida al sustrato protéico, por lo cual se une al sitio activo de la proteasa. En general, los inhibidores de proteasas son específicos para el sitio activo de una clase de proteasa en particular. Los agentes quelantes, que atrapan cationes de proteasas dependientes de metales y alteran el sitio catalítico son conocidos como inactivadores en vez de inhibidores (García-Carreño, 1996).

A partir del estudio de los inhibidores de las enzimas se ha obtenido información importante sobre el mecanismo y los caminos de la catálisis enzimática, la especificidad del sustrato de las enzimas, la naturaleza de los grupos funcionales en el sitio activo y la participación de ciertos grupos funcionales en el mantenimiento de la conformación activa de la molécula de la enzima (Whitaker, 1994; Lenhinger, 1995).

Los inhibidores se pueden clasificar en inhibidores irreversibles y reversibles. Los inhibidores irreversibles son generalmente compuestos de bajo peso molecular que se unen covalentemente al sitio activo de la enzima; las principales enzimas inactivadas

por estos inhibidores son las serina y cisteina proteasas. Siendo los más utilizados para la caracterización de serina proteasas los siguientes: Fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF), inhibidor de tripsina de soya (SBTI), Tosil-lisin-clorometilcetona (TLCK) y Tosil-fenilalanina-clorometilcetona (TPCK); y para cisteina proteasa: Iodoacetamida (IA), Ácidop-hidroxi-mercuribenzoico (PHMB) y N-Etil-maleimida (NEM). Por otra parte, los inhibidores reversibles son generalmente, proteínas que se encuentran presentes en el alimento y agentes quelantes, estos inhibidores no forman enlaces covalentes con la enzima. Las enzimas que pueden inactivar son las aspartil proteasas por el inhibidor Pepstatin y las metaloproteasas por el Ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) y EGTA (García-Carreño, 1992; 1996).

Importancia de las Enzimas en la Industria Alimentaria

Las enzimas han sido utilizadas en el procesamiento de alimentos desde tiempos ancestrales. El uso de la renina de ternero en la elaboración de queso ha sido practicada antes del desarrollo de la enzimología como ciencia. La fermentación del vino, igualmente, es una práctica antigua que utiliza enzimas naturales presentes en el material crudo (Wong, 1995). Otros ejemplos, sería el uso de las levaduras para cocinar pan por los egipcios; el uso de la bacteria del ácido láctico en la elaboración de fermentados de leche y quesos, también ha sido empleada desde tiempos inmemorables. Otro ejemplo sería el empleo de mohos, que han sido utilizados por los orientales para la elaboración de diversos alimentos fermentados, desde tiempos remotos (Simpson y Haard, 1987).

Las enzimas se usan en un gran número de sectores industriales, de los cuales el más grande es la industria alimentaria. Otras áreas son los detergentes, productos médico-farmacéuticos y textiles. Las enzimas presentan muchas ventajas sobre los catalizadores tradicionales, como:

- Alto poder catalítico; se logra un aumento de hasta 10^9 a 10^{12} en la rapidez sobre la actividad no enzimática.
- Las reacciones se pueden realizar en condiciones moderadas de pH, temperatura y presión.

A pesar de estas ventajas y de un conocimiento bastante detallado de un gran número de enzimas, solamente 14 de ellas se utilizan a escala comercial mayor; siendo éstas:

Carbohidrasas: α y β -amilasas, glucoamilasas, invertasa.

Proteasas: proteasas en general (obtenidas de hongos y bacterias), pancreatina, renina, pepsina, papaína.

Lipasas: lipasa

Otras: glucosa isomerasa, glucosa oxidasa, pectinasa.

La mayoría de las enzimas utilizadas industrialmente son hidrolasas (alrededor del 85% del total); el 15% restante se divide entre oxidoreductasas e isomerasas. De las hidrolasas, el 70% hidrolizan proteínas (Fowler, 1996); aunque otros autores manejan que es el 60% (Haard, 1990); 26% hidrolizan carbohidratos y el 4% hidrolizan lípidos (Fowler, 1996).

Aplicaciones en la Industria Alimentaria.

Por lo general, las enzimas se usan en la industria alimentaria como auxiliares de proceso. Se utilizan de esta manera en el horneado (amilasas y proteasas), elaboración de cerveza (amilasas, amiloglicosidasas y proteasas), productos lácteos (renina y galactosidasa), saborizantes. De todos ellos, posiblemente el uso más importante de las enzimas es en la hidrólisis de carbohidratos y proteínas (Fowler, 1996).

Aplicaciones de Enzimas Proteolíticas.

Como se mencionó anteriormente, alrededor del 60% al 70% de las enzimas utilizadas en la industria alimentaria son proteasas. En las industrias de alimentos, las proteasas son utilizadas como auxiliares en el procesamiento de muchos productos, entre los que se tienen productos horneados, cerveza y vino, cereales, leche y productos lácteos como queso, chocolate, huevo y productos derivados, carne y productos del pescado, legumbres y para la producción de hidrolizados de proteína y extractos de sabor (Simpson y Haard, 1987; Haard, 1990; 1992; 1993; Haard y Simpson, 1994;).

Las aplicaciones tradicionales de las proteasas dentro de la industria de productos marinos ha estado limitada a muy pocas aplicaciones, por ejemplo, en la reducción de viscosidad del concentrado de proteína, preparación de hidrolizados de proteína de pescado para alimento o alimentación animal y procesos de fermentación dependiendo de las proteasas endógenas.

En años recientes, las aplicaciones de proteasas en la industria de productos marinos ha resurgido. Entre éstas aplicaciones se tienen la remoción selectiva de la piel,

hidrólisis de membranas y otros tejidos de soporte que envuelven a las huevas, sacos de huevas y otros tejidos, y la recuperación de pigmentos y extractos de sabor (Haard, 1990, 1992; Haard y Simpson, 1994).

Fuentes de Enzimas

En la actualidad hay tres fuentes de enzimas: células animales, vegetales y microbianas (Fowler, 1996). En un principio las fuentes tradicionales de enzimas fueron las plantas y animales (Fowler, 1996; Mathewson, 1998). Las plantas o el músculo eran picadas y maceradas en un líquido apropiado y después agitadas para extraer las enzimas solubles. El material sólido era después removido por filtración, permitiendo la salida del líquido que contenía la actividad enzimática. Éste podía después ser concentrado por evaporación. Todo este proceso cambió al tener conocimiento del auge de la aplicación de las enzimas en muchos procesos industriales, incrementándose la demanda de éstas. Como resultado de esto, la fermentación microbiana reemplazó los extractos de las plantas y animales como la mayor fuente de enzimas industriales.

La producción de enzimas de la fermentación microbiana es un método más eficiente de manufactura, pero es un proceso complicado que esta constantemente evolucionando. Las fuentes microbianas pueden ser de bacterias, hongos o levaduras. Algunos microorganismos utilizados para producir enzimas que se emplean en alimento son los hongos *Aspergillus niger* y *A. oryzae*, las bacterias *Bacillus subtilis* y

Streptomyces griseus, y las levaduras *Kluyveromyces fragilis* y *Saccharomyces cerevisiae* (Mathewson, 1998).

A pesar del gran potencial que representan las enzimas microbianas, muy pocas especies de microorganismos son utilizados para producir enzimas industriales. El costo de conseguir un microorganismo aprobado por las autoridades regulatorias es considerable y muy pocos de estos microorganismos han sido estrictamente evaluados y aceptados como seguros (GRAS) (Simpson y Haard, 1987; Haard, 1995). Las enzimas proteolíticas obtenidas del estómago del ganado no son conocidas adecuadamente y la disponibilidad de ésta fuente de enzimas es dependiente de la política y las reglamentaciones agrícolas que controlan la producción de ganado para matanza (Godfrey y Reichelt, 1983). Además, las fuentes tradicionales de enzimas de origen animal han sido restringidas a pocas partes del animal como el estómago de bovino y porcino (Simpson y Haard, 1987). Sin embargo con la llegada de las técnicas de recombinación de DNA, la industria enzimática es capaz de emplear microorganismos GRAS para producir enzimas tradicionalmente obtenidas de otros microorganismos, animales o plantas (Haard, 1995).

Recientemente, las enzimas aisladas de organismos acuáticos han sido consideradas para uso industrial. Se tienen reportes de enzimas purificadas de pescado y moluscos en Japón. Mientras que en Noruega las proteasas digestivas y otras enzimas de los desechos de la pesca empiezan a comercializarse. También en países como Islandia, Gran Bretaña y Dinamarca, se está empezando a desarrollar la explotación comercial de algunas enzimas purificadas de organismos acuáticos (Haard, 1993).

Proteasas de Origen Acuático.

El interés sobre las enzimas de origen marino esta justificado, en base al hecho de que el medio marino ofrece una amplia diversidad biológica de organismos adaptados a las condiciones únicas de su hábitat y por lo cual estas enzimas cuentan con propiedades únicas como: presentan actividad en un amplio rango de temperatura, alta actividad a bajas temperaturas, alta habilidad para actuar sobre proteínas nativas y mayor especificidad de acción que las obtenidas de plantas, animales y microorganismos (Simpson y Haard, 1987; Haard, 1992; De Vecchi y Coppes, 1996).

En el pez, el tracto digestivo es la fuente más rica de enzimas hidrolíticas. Las preparaciones crudas o parcialmente purificadas son utilizadas en la producción de productos pesqueros como caviar, eliminación de la piel de los filetes y en la maduración de varios productos delicados de pez (Gildberg *et al.*, 2000). Las investigaciones sobre la enzimas de origen marino empezaron hace alrededor de 30 años, sin embargo, su aplicación en la industria alimentaria es reciente y se ha dado principalmente en países como Dinamarca, Gran Bretaña, Islandia, Japón y Noruega. Las principales enzimas utilizadas son las tripsinas, pepsinas, quimosinas y colagenasas (Haard y Simpson, 1994)

Tripsina. La tripsina es la principal enzima de la familia serina proteasas. La cual consiste de una cadena peptídica sencilla con un peso molecular típicamente de 24 kDa. La tripsina es sintetizada en el páncreas y secretada como un precursor inactivo, tripsinógeno, desde las células pancreáticas junto con el quimotripsinógeno y

proelastasa. Esta evidencia se ha observado y demostrado no sólo en mamíferos, sino también en algunos peces como *Oncorhynchus keta*, *Parasilurus asotus* y *Anguilla japonicus*. El tripsinógeno es activado por una enteropeptidasa en el intestino delgado, por uniones específicas en un enlace peptídico entre un residuo cargado positivamente, por lo general lisina e isoleucina. El N-terminal del péptido de 6 a 8 residuos, dependiendo de la especie, es removido y el residuo de isoleucina con el nuevo N-terminal se dobla hacia adentro para hacer diferentes contactos internos formando con esto el sitio catalítico de la tripsina. Las pequeñas cantidades de tripsina activan más tripsinógeno y a los demás zimógenos pancreáticos: quimotripsinógeno, procarboxipeptidasa y proelastasa (Rungruansak y Male, 2000).

Las principales proteasas activas a pH alcalino son tripsina y quimotripsina; mientras que a pH ácido es la pepsina. Las proteínas son hidrolizadas por estas proteasas en polipéptidos, los cuales a su vez son hidrolizados a péptidos y aminoácidos de bajo peso molecular por peptidasas intestinales y carboxipeptidasas pancreáticas. Las enzimas proteolíticas intervienen en la digestión del alimento y proveen de aminoácidos precursores para la síntesis de proteína. Debido a que la tripsina es la enzima clave para activar a los demás zimógenos pancreáticos, puede tener un papel importante en la regulación de la digestión de proteínas e influir en la disponibilidad de nutrientes para la síntesis y crecimiento (Rungruansak y Male, 2000).

Aplicaciones de la tripsina de Origen Marino. Numerosos experimentos han demostrado el beneficio de utilizar la tripsina de peces para explotar su alta actividad molecular a bajas temperaturas de reacción y relativamente su baja estabilidad al calor (Simpson y Haard, 1984). Al adicionar en la fermentación de “matjes” de arenques cantidades equivalentes de tripsina de bovina pura y tripsina del bacalao de Groenlandia, se obtuvo un incremento en la solubilización de la proteína y en la formación de aminoácidos libres (Simpson y Haard, 1984; citado por Haard y Simpson, 1994). La velocidad inicial de la solubilización de proteína con la tripsina del bacalao fue casi el doble que la obtenida con la tripsina de bovino. Otros resultados similares se observaron cuando el calamar se fermentó a 4°C, adicionada la tripsina de bacalao.

La tripsina de bacalao también se ha utilizado para evitar el sabor a oxidado en la leche. En un experimento utilizando tripsina de bovino y de bacalao en cantidades iguales, se observó que ambas tripsinas previenen la oxidación de los lípidos. Sin embargo, la tripsina de bacalao fue inactivada completamente por el proceso de pasteurización, lo cual es bueno, porque con esto se evita la hidrólisis excesiva de las proteínas de la leche (Simpson y Haard, 1984; citado por Haard y Simpson, 1994). También la tripsina de bacalao ha sido utilizada en la extracción de carotenoproteínas de los desperdicios del camarón (Cano-López, *et al.*, 1987).

De igual manera, la habilidad de la tripsina de peces sin estómago, para hidrolizar las proteínas nativas, pueden encontrar aplicación en la industria alimentaria así como también en otras áreas. Por ejemplo se ha investigado que la tripsina de la lisa (*Mugil cephalus*) es efectiva en la inactivación de la pectin metil esterasa en jugos de

cítricos (Marshall, 1990; citado por Haard, 1992). Ésta causa problemas en la estabilidad del jugo al separar el suero de la materia particulada. Otro ejemplo de una posible aplicación es en el tratamiento de la cutícula de productos crudos de crustáceos como el camarón al inactivar a la polifenol oxidasa para prevenir la decoloración postcaptura (Haard y Simpson, 1994).

Sin embargo, en base a lo encontrado hasta hoy, faltan otros campos donde la tripsina provenientes de origen marino pueden ser aplicadas, como la industria de panificación.

TRIGO

Generalidades del Trigo.

Los cereales en general, y el trigo en particular, son los principales alimentos en el mundo que proveen más nutrientes que cualquier otra fuente de alimentos (Bushuk, 1986; Qarooni et al., 1992; Serna-Saldívar, 1996). Es por esto que los cereales han sido, son y seguirán siendo el principal sustento del hombre (CIMMYT, 1991; Serna-Saldívar, 1996). Entre los principales granos de cereales se tiene el trigo, cebada, avena, centeno, arroz, sorgo y algunos mijos (Kent, 1984).

El trigo es el cereal que se produce en forma más extensa en el mundo. La mayor parte de este cereal se destina para consumo humano; siendo su aporte a la ingesta calórica significativa, particularmente en América y Medio Oriente (Kent, 1984).

Producción de Trigo.

El trigo es un componente esencial en la dieta de la población mexicana y es un producto básico que contribuye en el desarrollo de la economía mexicana, ya que se encuentra dentro de los diez cultivos más importantes del ciclo anual (INEGI, 1988). El trigo en México ocupa el cuarto lugar en relación a la superficie cosechada, después del maíz, sorgo y frijol, y el tercer lugar, considerando el volumen de la producción obtenida, después del maíz y sorgo (INEGI, 1988; SAGAR, 1997)

México cuenta con dos regiones principales de producción, la región noroeste, Sonora y norte de Sinaloa, en donde se siembran preferentemente los trigos panaderos y cristalinos. Mientras que los trigos suaves se cultivan más en la región del bajo (Guanajuato) y en el estado de Chihuahua (Serna-Saldívar, 1996).

Es importante destacar que Sonora es el primer productor de trigo del país, en el ciclo 2000-2001 se produjeron 1,532.850 toneladas; de las cuales 1,162,792 fueron de trigo duro (SAGARPA, 2001). Del trigo duro, 47,139 toneladas fueron de Aconchí y 817,092 de Altar.

Clasificación del Trigo.

El trigo es el cereal que tiene más sistemas de clasificación por su alta versatilidad y los distintos usos terminales. En México, los trigos se clasifican de acuerdo a su funcionalidad en cinco grupos (Carvajal y Peña, 1982; Serna-Saldívar, 1996):

Grupo 1: trigos fuertes

Grupo 2: trigos medios-fuertes

Grupo 3: trigos suaves

Grupo 4: trigos tenaces

Grupo 5: trigos duros cristalinos

Los trigos fuertes se usan generalmente para pan de caja. Los trigos medio fuertes se usan para bolillo y pan dulce. Los trigos suaves se usan para galletas. Los trigos tenaces se usan para repostería y los trigos duros para pastas (Carvajal y Peña, 1982).

Trigo Duro.

El cultivo de los granos pertenecientes al denominado grupo 5 conocido como trigo cristalino muestra mayor resistencia a los cambios climatológicos y registra rendimientos más elevados por hectárea (INEGI, 1988). Los trigos duros difieren de los trigos comunes por varias razones. Primero, los trigos duros pertenecen a la familia de los tetraploides mientras que los trigos comunes son hexaploides. Los trigos duros por lo regular son trigos de primavera, aunque también existen trigos duros de invierno (Zielke, 1991).

Los trigos duros tienen alto contenido de pigmentos carotenoides, los cuales le dan el color amarillo a las pastas. En general, el trigo duro no es apto para la elaboración de pan debido a que su gluten es más débil que el gluten del trigo común. La característica más destacada del trigo duro es su dureza (Zielke, 1991), la cual se debe a

la mayor continuidad de la matriz de proteínas dentro de la célula y los enlaces más firmes de los gránulos de almidón con esta matriz (Charley, 1988).

Aprovechamiento del Trigo Duro.

El trigo duro por lo general se aprovecha para la elaboración de pasta, consumo animal y como semilla para siembra (Hernández, 2000). sin embargo, en la actualidad la producción de este trigo, se ha destinado únicamente para la elaboración de piensos alimenticios para cerdos y ganado vacuno (Peña, 2000). Por lo cual sería interesante buscar otras alternativas de manejo del trigo, con la finalidad de diversificar su uso, como por ejemplo en la elaboración de productos de panificación.

Composición Química del Trigo

Los cereales como se mencionó anteriormente, constituyen la fuente más importante de alimentación para el hombre, y se consideran como la principal fuente de calorías, debido a que poseen aproximadamente 75% de carbohidratos (Charley, 1987), aunque también contienen proteínas, grasas, vitaminas y minerales (Pomeranz, 1988).

Tanto la composición química, como el valor nutritivo de los cereales, varían dependiendo de las condiciones ambientales de su cultivo y de la cosecha, país de origen y variedad de la semilla (Potter, 1978).

Debido a la facilidad del trigo para adaptarse a varias condiciones climatológicas y de suelos, éste no posee una composición química uniforme; por lo cual es muy común encontrar diferencias en composición entre las diferentes variedades. Por lo general, el

trigo tiene una composición química aproximada de 10-14% de agua, 50-72% de carbohidratos, 8-13% de proteína y 2-11% de fibra no digerible (Pomeranz, 1988).

Proteínas del Gluten del Trigo. El gluten se puede definir como el material viscoelástico que permanece después de lavar la masa con agua o soluciones salinas diluidas para remover el almidón y los componentes solubles. El material final está compuesto principalmente por proteínas (70-80% en base seca), pero también contiene almidón residual y lípidos (Pomeranz, 1990).

Se puede decir que las proteínas del gluten son fáciles de aislar en forma casi pura, esto se debe a que son insolubles en agua. En base a la solubilidad en alcohol acuoso (alcohol etílico al 70%) se pueden dividir en dos grupos o fracciones: gliadinas (soluble en alcohol al 70%) y gluteninas (insolubles en alcohol al 70%) (Pomeranz, 1990; Hosney, 1992; Beasley *et al.*, 2001). Los polímeros de glutenina están formados de polipéptidos sencillos (subunidades de glutenina) unidos a través de enlaces disulfuro intermoleculares. Las subunidades de glutenina se clasifican en dos grupos, las de alto peso molecular (80,000 a 120,000) y las de bajo peso molecular (30,000 a 50,000) (Beasley *et al.*, 2001).

Por otra parte, la fracción gliadina tiene un arreglo monomérico de polipéptidos de tamaño medio, con un rango de peso molecular de 30, 000 a 50, 000 daltons (Wrigley and Bekes, 1999). Todas las gliadinas son monómeros, unas con enlaces disulfuro intramolecular (α , β y γ gliadinas) y otras sin enlaces disulfuro (ω gliadinas) (Pomeranz, 1990).

Las gliadinas y gluteninas interactúan con enlaces no covalentes (principalmente puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas) además con enlaces disulfuro. La combinación de estas interacciones puede determinar las propiedades del gluten. Las gluteninas parecen ser las responsables de la elasticidad, mientras que las gliadinas son probablemente responsables de la extensibilidad (viscosidad) (Pomeranz, 1990).

Composición de aminoácidos de las proteínas del gluten. Las proteínas del gluten son altas en aminoácidos como ácido glutámico y prolina. Alrededor del 35% (1 de cada 3 aminoácidos) y entre 14-16% (1 de cada 7 aminoácidos) del total de los aminoácidos de la proteína son glutámico y prolina, respectivamente. Otro punto que caracteriza a las proteínas del gluten es su bajo contenido de aminoácidos básicos, como la lisina (1.3 %) (Pomeranz, 1990; Hosney, 1992).

También entre las fracciones del gluten existen diferencias marcadas en la composición de aminoácidos, por ejemplo las gliadinas son más ricas en ácido glutámico (36.1 comparado con 29.1) y las gluteninas son más ricas en prolina (20.5 contra 17.7) y glicina (5.3 contra 2.4) (Pomeranz, 1990).

Uso de Proteasas en Productos Horneados.

La utilización de enzimas en la industria alimentaria ha aumentado en los últimos años, sin embargo, en la tecnología de la producción del pan y de los productos horneados el empleo de enzimas es reciente (Quaglia, 1991).

Las proteasas fúngicas empleadas en la obtención de productos horneados a partir de harina de trigo, se obtienen de *Aspergillus oryzae* y *A. niger* (van Dam and Hille, 1992), éstas proteasas rompen los enlaces peptídicos de las proteínas provocando una modificación parcial de las proteínas de la harina, haciendo que la masa se vuelva más blanda y por lo tanto más fácil de manejar (Quaglia, 1991; Mathewson, 1998), reduciendo con esto el tiempo de mezclado debido a que la masa se hace menos resistente y adquiere características de fluido (Haard y Simpson, 1994; Mathewson, 2000). En la elaboración de pan la red de gluten no debe ofrecer mucha resistencia al gas que se libera durante la fermentación, por lo que si se utiliza una harina demasiado fuerte, es necesario añadir proteasas para obtener un producto de buena calidad (Quaglia, 1991).

Las proteasas, también influyen en las propiedades organolépticas del producto final (Quaglia, 1991), ya que al hidrolizar las cadenas peptídicas, liberan aminoácidos los cuales durante la cocción reaccionan con los azúcares formando sustancias aromáticas que confieren características organolépticas al producto (Quaglia, 1991; Mathewson, 1998; Poldermans and Schoppink, 1999).

Hasta la fecha las proteasas empleadas han sido de origen fúngico, sin embargo, éstas no han sido evaluadas sobre los trigos duros. Como ya se mencionó las enzimas de origen marino no han sido evaluadas en la elaboración de productos a partir de trigo, y mucho menos de trigo duro.

HIPÓTESIS

La enzima tripsina proveniente del intestino de la lisa es capaz de hidrolizar a las proteínas del gluten de trigo duro, haciéndola susceptible a una futura aplicación en la industria panadera.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se dividió en dos partes, en la primera se establecieron las condiciones para extraer y purificar la enzima tipo tripsina a partir del intestino de la lisa (*Mugil cephalus*), así como establecer el efecto del pH y temperatura. En la segunda parte se evaluó la capacidad hidrolítica de la enzima tipo tripsina sobre el gluten de tres variedades de trigo.

Parte I. Ensayos de Purificación

Materia Prima

Se trabajó con 140 ejemplares de lisa (*Mugil cephalus*), los cuales se capturaron en el área de Empalme, Sonora; en el mes de Febrero del 2001. Las lisas se mantuvieron en hielo hasta su traslado a Hermosillo. Una vez en el laboratorio, las lisas se pesaron, se les extrajo el intestino y se peso para obtener el rendimiento. Los intestinos se juntaron para realizar la purificación de la tripsina.

Metodología

Obtención del Extracto Crudo y Purificación de la Tripsina.

Para la obtención del extracto crudo del intestino y purificación de la tripsina de la lisa, se siguió la metodología descrita por Simpson y Haard (1984), la cual consistió en lo siguiente: los intestinos fueron congelados a -20°C y después se liofilizaron, posteriormente se procedió a molerlos en un molino licuadora marca EKCO. De estos intestinos se pesaron 50 g y se les adicionó 10 volúmenes de solución amortiguadora de extracción Tris-HCl 0.05 M, pH de 7.8, conteniendo 0.02 M de CaCl_2 (a 4°C) (1:10 p/v). La mezcla obtenida se agitó por 4 h a 4°C y se centrifugó a $3000 \times g$ por 30 min a 4°C ; el residuo se descartó y al sobrenadante (S1) se le adicionó solución Brij 35 (polioxietilen lauril eter) hasta obtener una concentración final de 0.2%. El sobrenadante se mantuvo por 8 h a 4°C , después se centrifugó a $10,000 \times g$ por 30 min a 4°C . El residuo se descartó y el sobrenadante (S2), se fraccionó con sulfato de amonio a 0°C (entre 40-60% de saturación). Posteriormente se centrifugó a $6000 \times g$ por 30 min a 4°C . El líquido se descartó y el precipitado se disolvió en 100 mL de solución amortiguadora de extracción (S3). La solución obtenida se dializó en 16 volúmenes de solución amortiguadora de extracción por 16 h, con tres recambios de solución amortiguadora, obteniéndose la fracción (S4). La fracción S4 se hizo pasar por una columna de afinidad.

Preparación de la Columna de Cromatografía de Afinidad.

La columna de afinidad se preparó de acuerdo a Pharmacia Fine Chemicals (1979). Se pesaron 2 g de Sepharose® 4B a los cuales se les adicionó 20 mL de HCl 1 mM, se dejó incubar por 15 min a temperatura ambiente. Después se adicionaron 200 mL del mismo ácido, se dejó sedimentar por 10 min. Se centrifugó a 180 g por 2 min en una centrifuga Beckman GS-15R, el sobrenadante se descartó. Este último paso se realizó dos veces. Al gel sedimentado se le adicionaron 10 mL de NaHCO₃ 0.1 M, pH 8.3 y se dejó agitando por 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 180 g por un min y el sobrenadante se descartó. Se adicionaron 10 mL más de NaHCO₃, se agitó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 180 g por un min, el sobrenadante se descartó y el gel se mezcló con la solución que contenía al ligando (inhibidor de trispina de soya).

La preparación del ligando se realizó de la siguiente manera: se pesaron 38.5 mg de SBTI, los cuales se suspendieron en 7 mL de NaHCO₃ 0.1 M, pH de 8.3, esta solución se mezcló con el gel de Sheparose anteriormente preparado, se dejó incubar por 2 h a 25°C con agitación suave, después se centrifugó a 180 g por 2 min y el sobrenadante se descartó. El bloqueo de los grupos activos de la matriz se realizó utilizando glicina 0.2 M a pH de 8.0 incubándose por 48 h en refrigeración. Después el gel se lavó con NaHCO₃ 0.1 M, pH 8.3 y se mantuvo en refrigeración hasta su utilización.

Cromatografía de Afinidad.

El gel y las soluciones fueron desaireadas utilizando una bomba de vacío.

En la cromatografía de afinidad se usó una columna de 22.5 cm de altura y 2.5 cm de diámetro. Se empacaron 8 mL de gel. La columna se equilibró con 5 volúmenes de Tris-HCl 50 mM, pH 7.8 usándose un flujo de 0.2 mL/min y se usó una bomba ECONO-PUMP (Bio-Rad). A esta columna se aplicaron 10 mL de muestra. El material o proteína no unida se lavó con 3 volúmenes de Tris-HCl 50 mM, pH 7.8. La proteína unida se eluyó con 25 mL de HCl 5 mM. Se colectaron fracciones de 1.5 mL, a cada fracción se le midió concentración de proteína y actividad tripsina.

Actividad de Tripsina.

La actividad de tripsina se midió en cada una de las fracciones (S1, S2, S3 y S4) y en el extracto conteniendo la tripsina. Se utilizó el substrato sintético Benzoil-Arg-p-nitroanilida (BAPNA) de acuerdo a Erlanger *et al.* (1961). El BAPNA se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO) para obtener una solución 1 mM. Después se ajustó el volumen con la solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM, pH de 7.8. La determinación se realizó 25°C. En tubos de ensaye se adicionaron 1.25 mL de la solución amortiguadora conteniendo el BAPNA y 0.25 mL de cada sobrenadante y de la enzima tripsina purificada. La reacción se detuvo a los 10 min. al adicionar 0.25 mL de ácido acético al 30%, la absorbancia se leyó a 410 nm. La actividad de tripsina se obtuvo de la siguiente fórmula:

$$[(\text{Abs}_{410\text{nm}}/\text{min} \times 1000 \times \text{mL reacción}) / (8800 \times \text{mg proteína})]$$

donde: 8800 es el coeficiente de extinción de la p-nitroanilida.

Electroforésis en Gel de SDS-Poliacrilamida.

El peso molecular de la tripsina se obtuvo empleando un gel de SDS-Poliacrilamida (Laemmli 1970) al 12%, las fracciones se utilizaron 1:1 en una solución amortiguadora Tris-HCl, pH 7.5, 25 μ L de la muestra se aplicaron en la placa de electroforésis. El gel se corrió a 50 volts por 20 min y el ensayo se realizó a 70 volts, 30 mAmperes. Los geles se tiñeron con plata. Los zimogramas de las actividades de las fracciones de las proteasas separadas se realizaron de acuerdo a García-Carreño *et al.* (1993). El ensayo consistió en incubar el gel en una solución de caseína al 3%, primero a 4°C por 30 min y después a 37°C por 90 min., posteriormente los geles se tiñeron con azul de Coomasie R-250. Los marcadores de pesos moleculares que se emplearon fueron albúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), deshidrogenasa gliceraldeído-3-fosfato (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y tripsinógeno (24 kDa) .

Pruebas de Inhibición.

Para confirmar que la proteasa obtenida era del tipo tripsina se utilizaron las pruebas de inhibición, que consisten en inhibir la actividad tripsina sobre el substrato sintético BAPNA, empleando para ello inhibidores. El ensayo se realizó de la siguiente manera: el SBTI (200 mM) disuelto en agua, TLCK (10 mM) disuelto en HCl 1 mM y EDTA (10 mM) disuelto en Tris-HCl 50 mM, pH 7.8. La relación tripsina-inhibidor fue 2:1 para SBTI, 4:1 para TLCK y 1:1 para EDTA, incubándose a 30°C por 30 min (García-Carreño, 1992). Para PMSF (100 mM) disuelto en 2-propanol, la relación fue de 4:1, incubándose la mezcla a 30°C por 60 min (García-Carreño, 1992). Después del

periodo de incubación, la actividad de tripsina se determinó de acuerdo a Erlanger *et al.* (1961).

Efecto del pH Sobre la Actividad y Estabilidad de la Tripsina.

Se evaluó el efecto del pH sobre la actividad proteolítica de la tripsina, utilizando el substrato sintético BAPNA en solución amortiguadora universal, la cual contiene ácido bórico, ácido cítrico, fosfato de sodio monobásico e hidróxido de sodio. La reacción se realizó a 25°C en el rango de pH de 4-10. Para evaluar la estabilidad de la tripsina, ésta se incubó a pH de 4, 7 y 9, por 30 min a 25 °C, después la actividad residual se midió utilizando el substrato BAPNA (Stauffer, 1989).

Efecto de la Temperatura Sobre la Actividad y Estabilidad de la Tripsina.

El efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica de la tripsina se realizó utilizando el substrato sintético BAPNA en solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM, pH de 7.8, y temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60 y 70°C. La termoestabilidad de la tripsina a 0°C, 40°C y 70°C, se determinó incubando la enzima por 30 min en las temperaturas anteriores, empleando Tris-HCl 50 mM, pH 7.8. La mezcla se enfrió en baño de hielo por 5 min y después se midió la actividad residual sobre el substrato BAPNA (Satuffer, 1989).

**Parte II. Evaluación de la Capacidad Hidrolítica
de la Enzima Tipo Tripsina de lisa (*Mugil cephalus*)
sobre el Gluten de Trigo.**

Materia Prima

Las materias primas para esta evaluación fueron las variedades de trigo duro (Aconchi y Altar) y trigo panadero (Rayón). Estas se obtuvieron de los campos agrícolas de la Costa de Hermosillo, proporcionadas por la Asociación Agrícola Hermosillense.

Obtención de la Harina

La harina del trigo duro y panadero fue proporcionada por el p.Q.B. Vicente Félix Avila, quien las obtuvo de la siguiente manera: para las variedades de trigo duro (Aconchi y Altar), el trigo se acondicionó al 17% de humedad, después de esto se dejó en reposo por 48 h y posteriormente se sometió a molienda utilizando el molino experimental Quadrumat Senior marca Brabender.

Para la obtención de la harina del trigo panadero (variedad Rayón), el trigo se acondicionó al 15% de humedad y se dejó reposar por 24 h. Posteriormente se sometió a molienda utilizando el molino experimental Quadrumat Senior marca Brabender.

La fórmula utilizada para el acondicionamiento de humedad del grano fue la siguiente:

$$\text{mL de agua} = \frac{(\text{gramos de muestra})(a-b)}{(c-a)}$$

(c-a)

donde:

- a) humedad de acondicionamiento
- b) humedad de la muestra
- c) 100% de la muestra

Obtención del Gluten de Trigo.

Se utilizó el método 38-10 de la AACC (1991). Se pesaron 25 g de cada harina, a las cuales se les adicionaron aproximadamente 30 mL de agua para formar la masa, se dejó en reposo por una hora en agua a temperatura ambiente. Después se lavó la masa bajo el chorro de agua de la llave, hasta obtener el gluten. El gluten se congeló, liofilizó y molió, para realizar la hidrólisis.

Hidrólisis del Gluten.

Para la evaluación de la capacidad hidrolítica de la tripsina sobre las proteínas del gluten de trigo duro variedades Aconchi y Altar y trigo panadero variedad Rayón, se tomó como referencia la técnica de Hsu *et al.*, (1977). Se disolvió 1 g de cada muestra de gluten en 100 mL de agua alcalinizada con 200 μ L de NaOH 1 N y después se ajustó el pH a 8 con HCl 0.1 N. Se adicionó un mililitro de la tripsina con una actividad de 0.05 U/ml y un mililitro de la proteasa comercial con una actividad de 3.6 U/ml. El tiempo de hidrólisis fue de 15 min, además se tomaron alicuotas de 1 mL a tiempo 0, 5, 10 y 15 min, parando la reacción de estas alicuotas al añadir 0.5 mL de TCA al 20%. Como control positivo de la hidrólisis se usó una proteasa comercial (Tipo XXIII de

Sigma). La hidrólisis se monitoreó mediante la caída del pH. El porcentaje de proteína hidrolizada se estimó usando las ecuaciones desarrolladas por Dimes y Haard (1994). La evaluación de los productos de hidrólisis también se realizó utilizando geles de poliacrilamida.

Tinción de Geles con Nitrato de Plata (Protocolo)

El gel se sumergió por 30 min en una solución fijadora (40% etanol, 10% ácido acético), después se descartó la solución fijadora y se adicionó la solución incubadora (30% etanol, 6.8 % acetato de sodio trihidratado, 0.2% tiosulfato de sodio pentahidratado, 0.52% glutaraldehído), dejándose en incubación por 12 h. El gel se lavó con agua deionizada tres veces por 5 min. Después se adicionó la solución de plata (0.1% nitrato de plata, 0.02% formolaldehído 20% etanol) sobre el gel y se dejó reaccionar por 20 min con agitación suave. El gel se reveló con solución reveladora (2.5% carbonato de sodio, 20% etanol, 0.01% formaldehído) precalentada a 40°C, hasta que se definieron las bandas en el gel. Se descartó la solución reveladora y la reacción de revelado se detuvo adicionando una solución que contenía 1.46% EDTA dihidratado, 20% etanol, dejándose el gel por 10 min con agitación suave. La solución anterior se descartó y el gel se lavó por 10 min con agua deionizada. El agua se descartó y el gel se dejó en solución preservante (3% glicerol, 5% etanol).

Determinación de Proteína.

Para determinar la concentración de proteína soluble total en el extracto enzimático, se utilizó el método de Bradford (1976) y el método Microkjeldahl (AACC, 1991. método 44-13) para medir la concentración de proteína del gluten de trigo duro.

Diseño de Experimentos y Análisis Estadístico.

Para la fase de la obtención de la tripsina, los ensayos se realizaron por triplicado para asegurar la confiabilidad de los resultados.

En la parte de evaluación de la capacidad hidrolítica se aplicó un diseño bifactorial, uno de los factores es el tipo de enzima con dos niveles (fracción tripsina de la lisa y proteasa comercial), y el otro factor es la variedad de trigo, con tres niveles (Aconchi, Altar y Rayón).

Las medias se compararon aplicando un análisis de varianza multivariado con una posterior prueba de Tukey, con un nivel de significancia del 0.05. Para esto se utilizó el paquete estadístico STATISTICA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características Físicas de la Lisa

Los especímenes de lisa (*Mugil cephalus*) presentaron una talla promedio de 204 g y 26.2 cm de longitud, el rendimiento de los intestinos fue de 7.1%, con respecto al peso de la lisa. Es decir, por cada 100 g de lisa se obtienen 7.1 g de intestinos. Si se considera el volumen de captura de la lisa (156 ton), la cantidad de biomasa de desechos que se genera por esta especie es de 11.076 ton. Si se toma en cuenta lo anterior, se podría pensar en aprovechar las vísceras de los pescados capturados en nuestra localidad a sabiendas que pueden representar una buena fuente de proteasas (Reece, 1988). Como ya se ha dicho hay diversos países donde la industria de enzimas de origen marino ya esta desarrollada como Dinamarca, Gran Bretaña, Islandia, Noruega y Japón, en donde estas enzimas ya estan siendo utilizadas en la industria de alimentos (Simpson y Haard, 1987; Haard, 1993).

Cromatografía de Afinidad.

Para determinar la capacidad de retener proteasas tipo tripsina de la columna preparada, se realizaron ensayos previos empleando una enzima tripsina comercial de bovino, aplicando a la columna 2 mL de solución conteniendo 2 mg de tripsina, la cual se recolectó después de lavar la columna con Tris-HCl y eluir la tripsina con HCl 5 mM.

En la Figura 1, se observa el cromatograma de purificación de la tripsina del intestino de la lisa, apreciándose que en las primeras 10 alícuotas se detectó la proteína

que no se unió a la columna, en estas alicuotas, la actividad específica de la enzima fue baja debido a la alta concentración de proteína que se tenía. De las alicuotas 11 a la 28 no se detectó proteína, por lo tanto, no se hizo determinación de actividad. De la alicuota 29 a la 31, se detectó una disminución de proteína y la actividad de la tripsina fue alta, comparada con las primeras alicuotas. Por cada 10 mL de muestra que se aplicaban a la columna (3.6 mg de proteína/mL), se obtenían 3 alicuotas (4.5 mL) que contenían actividad de la enzima tripsina.

Los resultados de la purificación de la tripsina se presentan en la Tabla 1, en donde se observa que la actividad específica de la tripsina purificada fue 72.7 veces más grande que la del extracto crudo, obteniéndose un rendimiento del 12%. Este rendimiento es aceptable, ya que en otros estudios realizados en otros organismos varía de un 5.8% hasta un 11%, pero hay investigadores que reportan rendimientos muy altos como Simpson y Haard (1984) con 46.6% y Kristjánsson (1991) con 48.7%. En este trabajo la actividad específica de la tripsina purificada fue de 0.24 U/mg proteína. Al comparar este valor con los reportados para otras tripsinas de peces se encontró que es más bajo, por ejemplo, Simpson y Haard (1984) reportaron una actividad específica para la tripsina de bacalao (*Gadus ogac*) de 0.780 U/mg proteína y Simpson y Haard (1985) reportaron 0.58 U/mg proteína para cunner (*Tautogolabrus adspersus*); Guizani *et al.*, (1991) reportaron 1.356 U/mg proteína para lisa (*Mugil cephalus*); Pavlisko *et al.*, (1997 a, b) reportaron 5.22 U/mg proteína para roncacho (*Micropogonias furnieri*) y 1.02 U/mg proteína para palometa (*Parona signata*); Pavlisko *et al.*, (1999) reportaron 6.20 y 6.00 U/mg proteína para menhaden (*Brevoortia spp*) y lisa (*Mugil spp*), respectivamente.

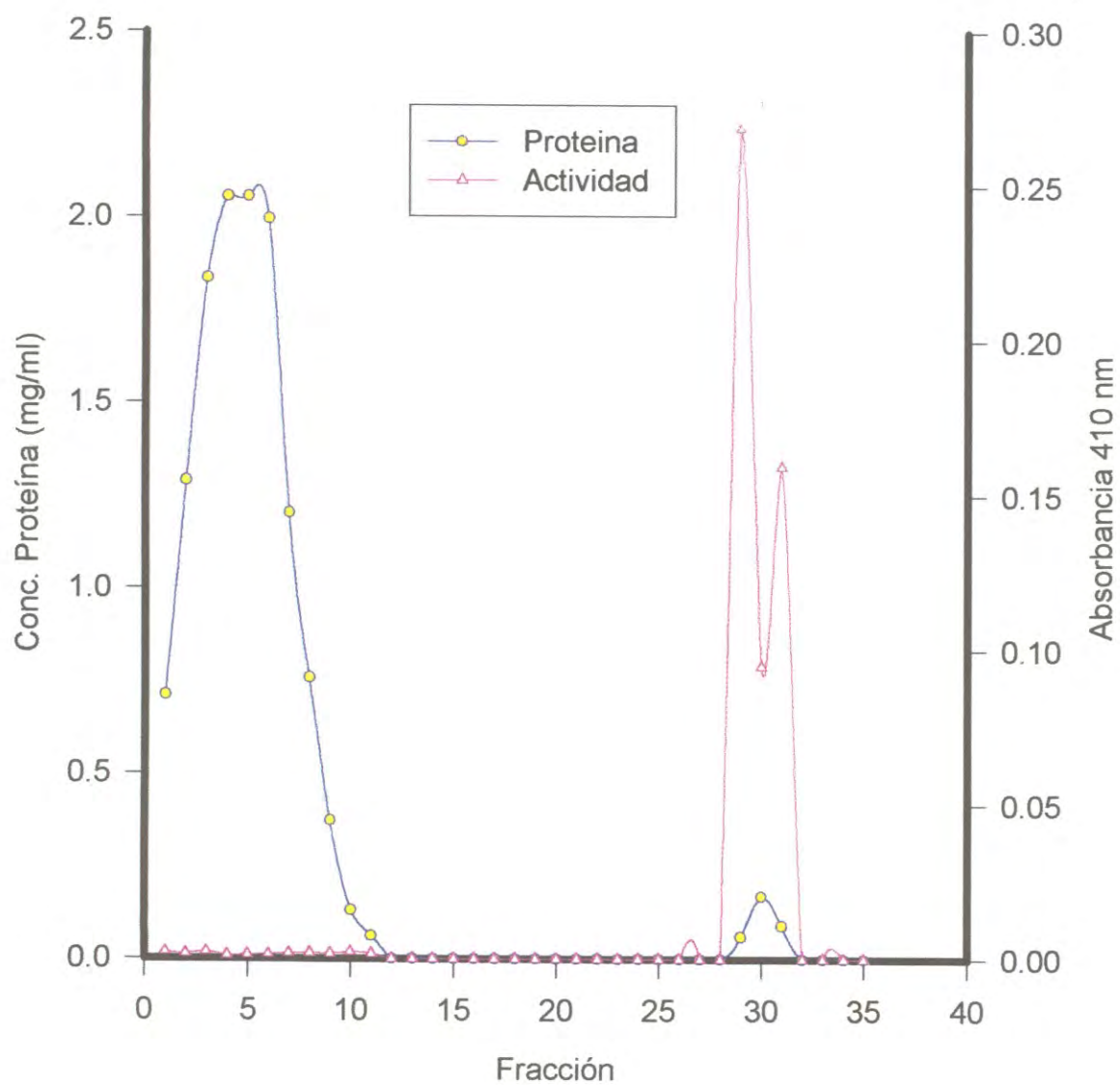


Figura 1. Cromatograma de purificación de la tripsina del intestino de la lisa (*Mugil cephalus*) del Golfo de California.

Tabla 1. Esquema de la purificación de la tripsina del intestino de la lisa (*Mugil cephalus*) del Golfo de California.

Etapa	Volumen Total (mL)	Proteína (mg)	Actividad (U)	Actividad Específica* (U/mg)	Rendimiento (%)	Purificación
E. Crudo	450	6219	20.77	0.0033	100	1
Sol. Brij	425	3124	20.62	0.0066	99	2
Sulfato de Amonio (40-50%)	120	1672	5.47	0.0033	26	1
Dialisis	90	330	4.5	0.0135	22	4.9
Afinidad	50	11	2.53	0.24	12	72.7

*Una unidad cataliza la hidrólisis de una μmol de BAPNA a 25°C , pH de 7.8.

Cabe mencionar que la mayoría de los investigadores citados han purificado a la tripsina a partir del saco pilórico, el cual de acuerdo a los reportes es el órgano que secreta a la tripsina en los peces, tal vez este factor sea el que influyó para que las actividades reportadas sean mayores a la obtenida en este trabajo. Hay que resaltar que en este estudio se trabajó con los intestinos debido a la dificultad técnica presentada para detectar y extraer el saco pilórico de la lisa del Golfo.

Electroforesis en Gel de SDS-Poliacrilamida

En la Figura 2, se observan las tres bandas obtenidas después de la cromatografía de afinidad. Estas bandas tienen un peso molecular aproximado de 27 kDa, 72 kDa y 75 kDa, respectivamente. Al parecer la banda de 27 kDa, corresponde a la enzima tipo tripsina; mientras las otras dos bandas posiblemente sean agregados de proteasas que fueron retenidas en la columna.

Kiel (1971) (citado por Pavlisko *et al.*, 1999), señala que el peso molecular para tripsina es de 20 kDa a 25 kDa. Heu *et al.*, (1995), señala que los pesos moleculares de la tripsina y quimotripsina de organismos marinos, en muchos casos tienen un rango de peso molecular de 22 kDa a 30 kDa. El peso molecular de la enzima tipo tripsina obtenido en este trabajo, coincide con lo reportado para tripsinas de peces. Entre los investigadores que han reportado un peso molecular para tripsina dentro del rango de 22 kDa a 28 kDa, se encuentran: Hjelmeland y Raa (1982); Simpson y Haard, (1984); Simpson y Haard, (1985); Guizani *et al.*, (1991); Kristjánsson (1991); Heu *et al.*, (1995); Pavlisko *et al.*, (1997 a, b); Pavlisko *et al.*, (1999).

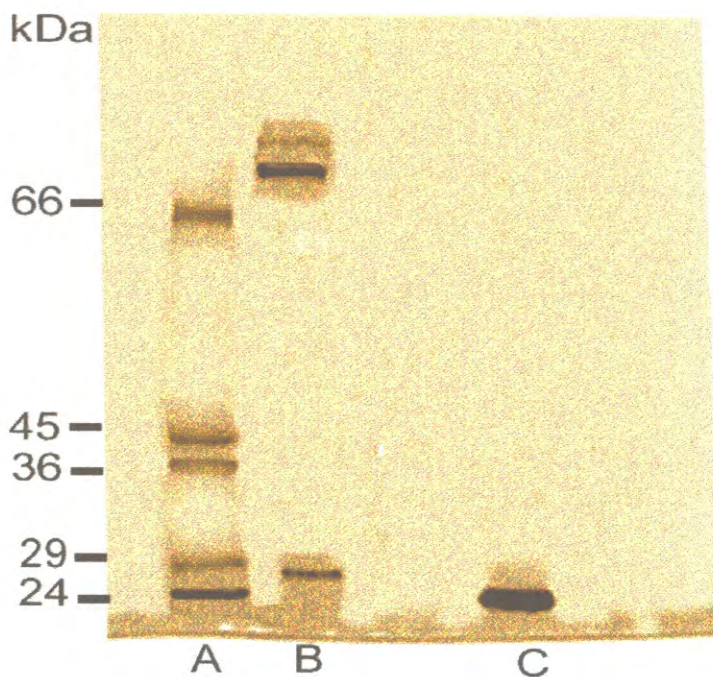


Figura 2. Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida al 12% de la enzima tipo tripsina del intestino de la lisa (*Mugil cephalus*).

Carril A: marcadores de peso molecular; Carril B: enzima tipo tripsina; Carril C: tripsinógeno

En el gel de actividad (Figura 3) se observan las zonas de actividad de las tres bandas (carril B). La banda con un peso molecular de 27 kDa se confirmó que es una enzima tipo tripsina, ya que en los carriles siguientes (C, D, E y F), los cuales contenían inhibidores específicos para tripsina, como inhibidor de tripsina de soya (C), inhibidor de tripsina y quimotripsina de soya (D), Tosil-Lisina-Clorometil cetona (E) y Fenil-Metil-Sulfonil fluoruro (F), la intensidad de la banda disminuye o desaparece totalmente indicando la inhibición de la enzima. También se observa que las bandas con peso molecular de 72 kDa y 75 kDa, se inhiben parcialmente con los mismos inhibidores.

El SBTI (carril C) inhibió completamente la banda de 75 kDa, mientras que la banda de 72 kDa sólo se inhibió parcialmente. El inhibidor de tripsina y quimotripsina de soya (carril D), inhibió la banda de 72 kDa y la de 75 kDa se inhibió parcialmente. TLCK (carril E) inhibió parcialmente las dos bandas; PMSF (carril F) inhibió las dos bandas. TPCK es un inhibidor de quimotripsina y no tuvo efecto sobre las bandas (carril G).

Como las bandas de actividad se ven inhibidas por PMSF, se puede decir que estas dos bandas son enzimas de la familia serina proteasas (Fahrney y Gold, 1963). Por otro lado, el SBTI presenta mayor afinidad por la enzima de 75 kDa y el inhibidor de tripsina y quimotripsina de soya por la banda de 72 kDa. Para TLCK, las dos bandas se vieron parcialmente inhibidas, lo cual puede indicar que estas bandas tienen característica de enzimas tipo tripsina.

Olivas-Burrola (1999), realizó actividad en gel de un extracto crudo de la sierra (*Scomberomorus concolor*), utilizando SBTI como inhibidor y observó una banda

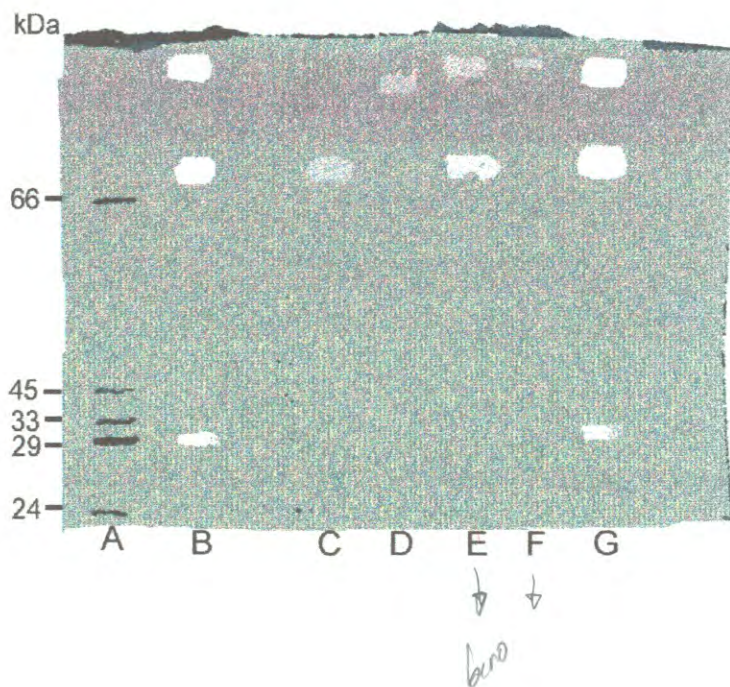


Figura 3. Zimograma de actividad en gel de SDS-Poliacrilamida de la enzima tipo tripsina de la lisa (*Mugil cephalus*).
 Carril A: marcadores de peso molecular, Carril B: enzima tipo tripsina, Carril C: SBTI, Carril D: Inhibidor de tripsina y quimotripsina de soya, Carril E: TLCK, Carril F: PMSF, Carril G: TPCK

inhibida entre los 21 kDa y 26 kDa, confirmando con esto la presencia de una enzima tipo tripsina. Hjelmeland y Raa (1982) reportaron actividad en gel, pero no utilizaron inhibidores, realizaron ensayos de autólisis de las dos enzimas tripsinas que obtuvieron y después observaron si aún presentaban actividad.

Por otra parte, en cuanto a las tres bandas que se observan en el gel, Simpson y Haard (1985) reportaron la presencia de dos bandas en la fracción tripsina obtenida del páncreas de cunner (*Tautoglabrus adspersus*), una con peso molecular de 24 kDa a la cual llamaron tripsina y otra de 14 kDa a la cual nombraron tipo tripsina, ambas enzimas presentaron actividad en tubo sobre el substrato BAPNA. Hjelmeland y Raa (1982) obtuvieron dos enzimas tripsinas del capelin (*Mallotus villosus*), ambas con una sola banda y con peso de 28 kDa. Cohen *et al.* (1981), obtuvieron a partir de la carpa (*Cyprinus carpio*) 4 bandas que presentaron actividad tripsina.

En los resultados obtenidos en este trabajo se observaron 3 bandas, todas con actividad sobre el substrato caseína. Una de ellas (carril B) con peso de 27 kDa, la cual posiblemente es una proteasa tipo tripsina por lo discutido anteriormente; las otras dos bandas al parecer son también tipo tripsina por el comportamiento que se observó con los inhibidores. Sin embargo no hay reportes de enzimas tipo tripsina de peces con peso molecular mayor a 30 kDa. Para crustáceos se tiene reporte de una enzima tipo tripsina de crayfish (*Procambarus clarkii*) con peso molecular de 33.6 kDa (Guizani *et al.*, 1992); pero este valor es más bajo comparado con el peso molecular de las dos bandas detectadas en este ensayo.

Efecto de Inhibidores.

En la Figura 4 se observa la inhibición de la actividad de la enzima tipo tripsina por diferentes inhibidores. El inhibidor Fenilmetil sulfonil fluoruro (PMSF) inhibió la actividad de la enzima tipo tripsina en un 64%. Este inhibidor ha sido descrito por varios investigadores como un inhibidor de proteasas tipo serina. Fahrney y Gold (1963) demostraron la inhibición de ciertas proteasas tipo serina por PMSF, entre las cuales se encuentra la tripsina. Otros investigadores que han demostrado la inhibición de la tripsina de peces por PMSF son: Hjelmeland y Raa (1982) para capelin (*Mallotus villosus*); Simpson y Haard, (1984) para bacalao (*Gadus ogac*); Kristjánsson (1991) para trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*); Guizani *et al.*, (1991) para lisa (*Mugil cephalus*); Pavlisko *et al.*, (1997 a, b) para roncacho (*Micropogonias furnieri*) y palometa (*Parona signata*); Pavlisko *et al.*, (1999) para menhaden (*Brevoortia spp*) y lisa (*Mugil spp*).

El inhibidor de tripsina de soya (SBTI) y Tosil-lisina-clorometil cetona (TLCK) son específicos para tripsina, en este trabajo la actividad tripsina se vió disminuida por estos inhibidores en 97% y 86%, respectivamente. Los mismos investigadores citados anteriormente, han observado diferentes porcentajes de inhibición de la actividad tripsina al emplear estos inhibidores. Se sabe que la tripsina en presencia de TLCK forma un enlace covalente con histidina en el centro catalítico y bloquea el sitio de union del substrato a el centro activo de la molécula (Severin y Tomasek, 1965; citado por Heu *et al.*, 1995).

Blow *et al.*, (1974) mostraron que los SBTI son proteínas, que se unen fuertemente a la tripsina, bloqueando su sitio activo en el proceso. La inhibición de la

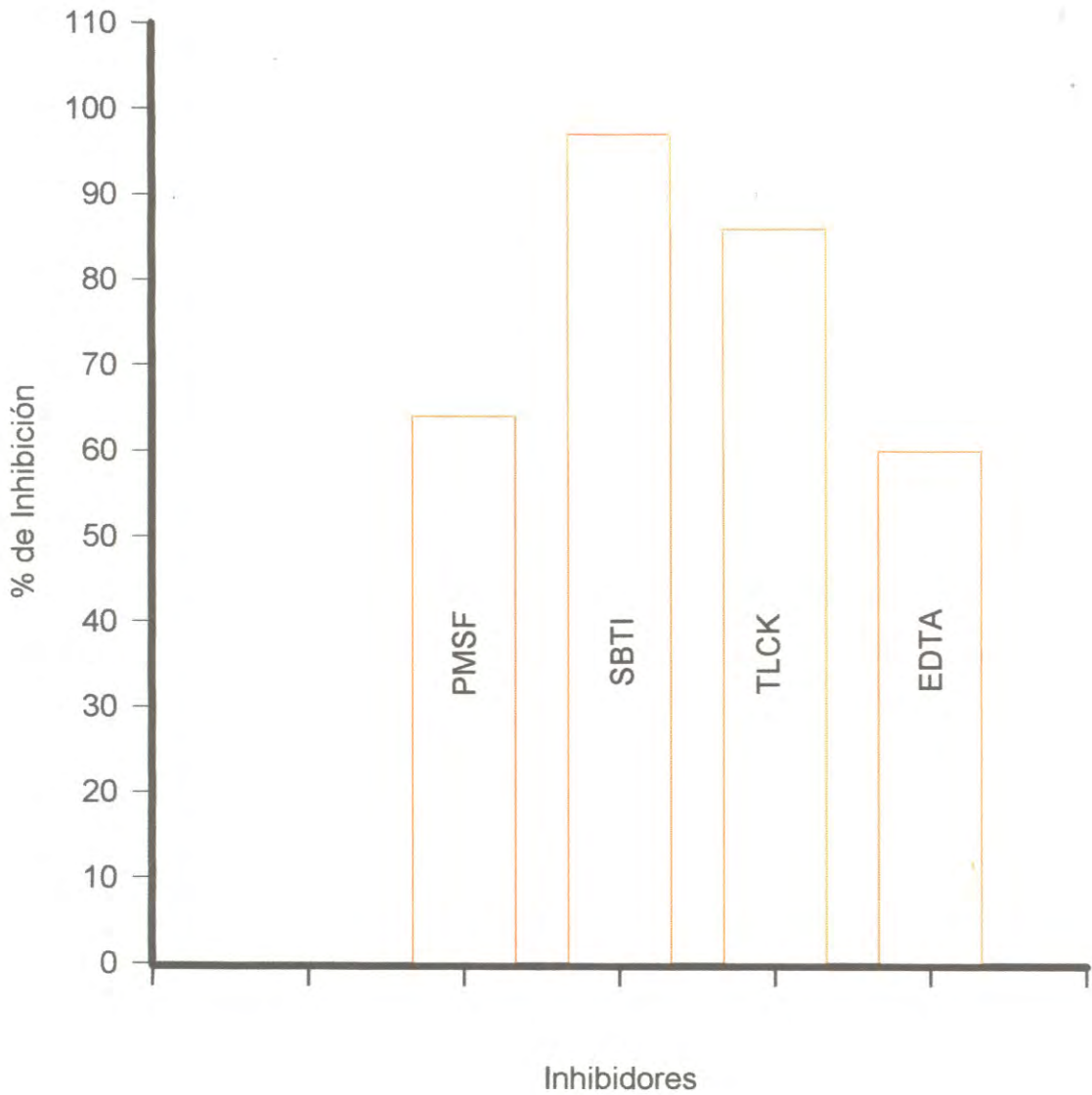


Figura 4. Efecto de inhibidores sobre la actividad de la enzima tipo tripsina del intestino de la lisa (*Mugil cephalus*), empleando BAPNA como sustrato a 25°C, pH 7.8.

fracción tripsina de la lisa (*Mugil cephalus*) por el SBTI, sugiere que, como otras tripsinas de peces, tiene un mecanismo similar para unir el sustrato en su sitio activo (Gates y Travis, 1969; Bundy y Gustafson, 1973; citados por Simpson y Haard, 1984).

La sal de EDTA inhibió la actividad tipo tripsina de la lisa en un 59%, solo Heu *et al.*, (1995), utilizó la sal de EDTA para inhibir a la tripsina de anchoveta (*Engraulis japonica*), pero no observó inhibición. Sin embargo, supone que el grado de inhibición por EDTA varía dependiendo de la fuente de la tripsina y la concentración del EDTA, por ejemplo dos tripsinas de la víscera de menhaden fueron completamente inactivadas por EDTA (Pyeun *et al.*, 1990) y dos tripsinas de anchoveta (Martinez *et al.*, 1988) fueron inactivadas parcialmente por EDTA (citados por Heu *et al.*, 1995). La tripsina puede o no requerir iones metales como cofactores para su actividad (Heu *et al.*, 1995). En este caso, la enzima tipo tripsina al parecer requiere iones calcio para su actividad, ya que al adicionar EDTA, disminuye su actividad.

Efecto del pH sobre la Actividad y Estabilidad de la Enzima Tipo Tripsina.

En la Figura 5 se observa el efecto del pH sobre la actividad de la enzima tipo tripsina. A pH de 4 no hubo actividad, mientras que a pH de 5 la actividad fue mínima (2.8), a partir del pH de 6, la actividad se incrementa hasta permanecer constante en el rango de pH de 8 a 10. Varios investigadores han reportado la actividad óptima de la tripsina en un rango de pH que va de 7.5 a 10. Simpson y Haard (1984) reportaron un pH óptimo para el bacalao de Groenlandia (*Gadus ogac*) de 7.5; Simpson *et al.*, (1990) reportaron para bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) un pH óptimo de 7.5; Guizani *et*

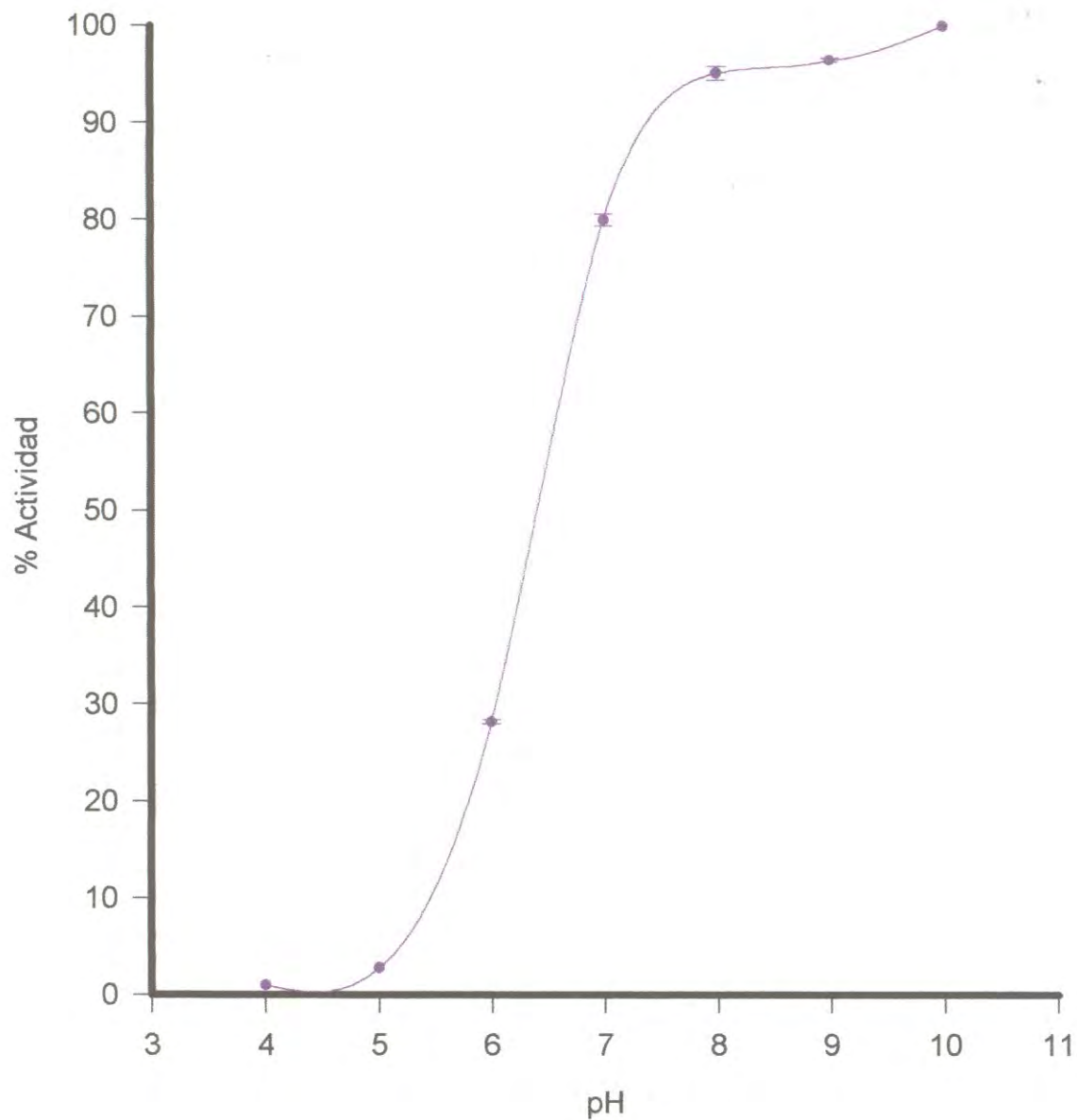


Figura 5. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima tipo tripsina empleando BAPNA como substrato a 25°C, en solución amortiguadora universal.

al., (1991) reportaron pH de 8 para lisa (*Mugil cephalus*); Heu *et al.*, (1995) reportaron pH óptimo de 8 a 9 para la tripsina de anchoveta (*Engraulis japonica*); Pavlisko *et al.*, (1997 a, b) reportaron 9.5 para roncacho (*Micropogonias furnieri*) y 8.5 para palometa (*Parona singnata*), respectivamente; Pavlisko *et al.*, (1999) reportaron pH óptimo para tripsina de menhaden (*Brevoortia spp*) de 9.5 y de 7.8 para lisa (*Mugil spp*).

En la valoración de la estabilidad de la enzima tipo tripsina a pH de 4, 7 y 9, se encontró que a pH de 4 la enzima tipo tripsina mantuvo el 65% de su actividad, a pH de 7 el 61% y a pH de 9 el 90 %. La actividad presentada a pH de 4, no coincide con lo reportado para tripsina de peces, ya que esta tripsina es inestable a pH ácidos; pero sí coincide para la tripsina de mamíferos como la de bovino, oveja y cerdo, las cuales son estables a pH ácidos (Simpson y Haard, 1984; Simpson *et al.*, 1990). Simpson y Haard (1985), caracterizaron la fracción tripsina del cunner (*Tautoglabrus adspersus*) encontrando dos enzimas, dicha fracción tuvo dos pH óptimos de actividad (7 y 8.5) y presentó una estabilidad óptima a pH de 2-4 y la estabilidad mínima se presentó a pH de 7. Simpson y Haard, no discuten el porque de la estabilidad a pH de 2-4.

La fracción tripsina mantuvo el 90% de su actividad a pH de 9, esto coincide con los investigadores de que la tripsina es una enzima que es estable a pH alcalino (Simpson y Haard, 1984; Simpson *et al.*, 1990; Kristjánsson 1991; Pavlisko *et al.*, 1999). Simpson *et al.*, (1990), señalan que la tripsina del bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) y bacalao de Groenlandia (*Gadus ogac*) son más estables a pH alcalinos que las tripsinas de bovino, ovino y porcino, debido a que poseen una relación de residuos de

aminoácidos ácidos/básicos más alta que la de vertebrados superiores (5.18 para bacalao del Atlántico, 5.24 para bacalao de Groenlandia y 4.65 para bovino).

Al relacionar la actividad de la enzima tipo tripsina a diferentes pH, con el proceso de panificación, principalmente amasado y fermentación, se puede decir que el efecto de la enzima sobre las proteínas del gluten sería mínimo debido a que el pH de la masa para panificación es de 5.2 (Onno, 1994) y a este valor de pH la enzima presentó baja actividad (2.8%).

Efecto de la Temperatura sobre la Actividad y Estabilidad de la Enzima Tipo Tripsina

En la Figura 6, se observa el efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima tipo tripsina, en donde pueden verse dos picos máximos de actividad, uno a 40°C y otro a 60°C, sin embargo, entre estas dos temperaturas (50°C) se ve disminución de la actividad. A 70°C se observa que la actividad empieza a declinar. Para la tripsina de peces de clima templado se han reportado por lo general temperaturas óptimas de 60°C a 65°C; 55°C para lisa (*Mugil cephalus*) (Guizani *et al.*, 1991); 60°C para roncacho (*Micropogonias furnieri*) (Pavlisko *et al.*, 1997 a); 65°C para palometa (*Parona signata*) (Pavlisko *et al.*, 1997 b); 63°C para menhaden (*Brevoortia spp*) y 60°C para lisa (*Mugil spp*) (Pavlisko *et al.*, 1999). La temperatura promedio del habitat de las especies anteriores es de 15°C a 17°C.

Muchas de las tripsinas que se han purificado provienen de peces de aguas frías y tienen por lo general una temperatura optima de 40°C (Simpson y Haard, 1994; De

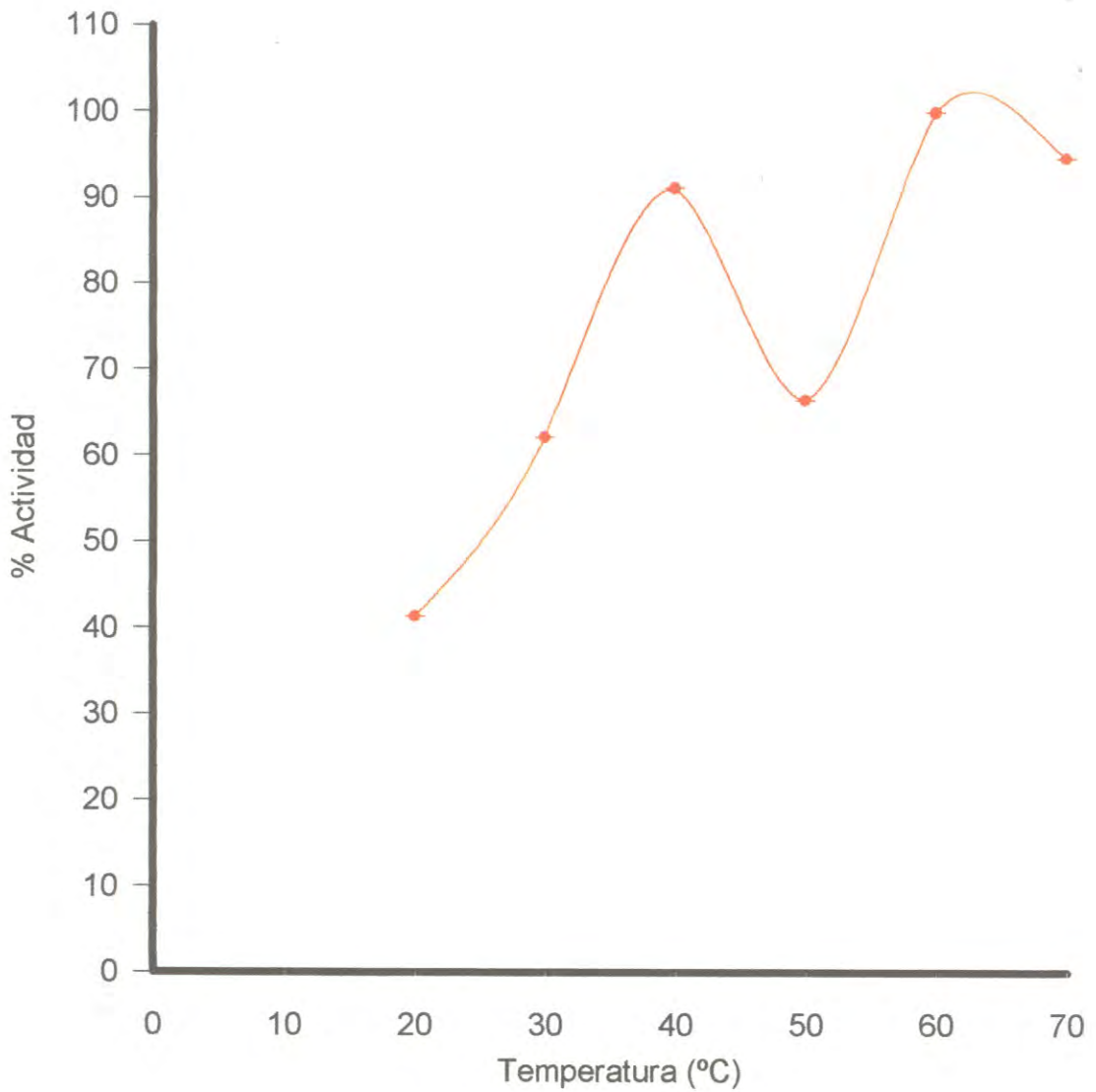


Figura 6. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima tipo tripsina empleando BAPNA como substrato, en solución amortiguadora Tris-HCl a pH de 7.8.

Vecchi y Coppes, 1996); dos tripsinas de capelin (*Mallotus villosus*) tuvieron una temperatura optima de 42°C (Hjelmeland y Raa, 1982); para la fracción tripsina de cunner (*Tautogolabrus adspersus*) la temperatura optima fue de 45°C (Simpson y Haard, 1985); para la tripsina del bacalao de Groenlandia (*Gadus ogac*) la temperatura fue de 30°C (Simpson *et al.*, 1989); la tripsina de bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) tuvo una temperatura optima de 40°C (Simpson *et al.*, 1990).

La estabilidad de la enzima tipo tripsina a las temperaturas de 0°C, 40°C y 70°C, fue de 100%, 83% y 76%, respectivamente. La estabilidad a altas temperaturas concuerdan con lo obtenido por Pavlisko *et al.*; (1997 a; 1997 b; 1999), quienes encontraron que la tripsina es estable en un rango de temperatura de 50°C a 60°C por 30 minutos de incubación. Sin embargo, para las tripsinas de peces de agua fría la temperatura óptima de estabilidad es alrededor de los 40°C (Simpson *et al.*, 1990; Simpson y Haard, 1995).

Simpson y Haard, (1995), señalan que la estabilidad a 60°C por una hora de la fracción tripsina de cunner, puede deberse a la interrelación que se presenta entre las dos enzimas presentes. Guizani *et al.*, (1991) señala que las condiciones del medio ambiente de los hábitats naturales puede ser una explicación acerca de las diferencias en la temperatura óptima para la actividad enzimática. Heu *et al.*, (1995) señalan que las enzimas son inactivadas a medida que la temperatura aumenta, debido al desdoblamiento parcial de la molécula. También señala que el aumento de la estabilidad térmica de la proteína se debe a un incremento de sus interacciones hidrofóbicas y de sus enlaces disulfuro en el interior de la molécula. Whitaker (1994), por otra parte señala

que las enzimas de bajo peso molecular compuestas por cadenas polipeptídicas sencillas y que poseen enlaces disulfuros, son más estables a la temperatura que las de alto peso molecular. Simpson *et al.*, (1989) señalan que los enlaces disulfuro presentes en la tripsina de bacalao del Atlántico y la tripsina de bovino, pueden contribuir a las diferencias que se observan entre estas enzimas.

De acuerdo con Simpson y Haard (1985), en este trabajo se puede decir que los dos picos máximos de actividad óptima y de igual manera la alta estabilidad presentada a 70°C (mantuvo el 76% de actividad), se debe a la interacción que se pudiera presentar con las tres enzimas presentes en la fracción tripsina de la lisa y también por lo señalado por Guizani *et al.*, (1991). Por otra parte, Segel (1976) y Simpson *et al.*, (1989), mencionan que es necesario llegar hasta la completa purificación de la enzima y conocer la composición de aminoácidos, principalmente cisteína, y relacionarlos con la estabilidad a diferentes temperaturas.

La temperatura óptima y la estabilidad de la enzima a 40°C, indica que ésta enzima es viable para utilizarla en el proceso de amasado y fermentación, ya que en este último proceso la temperatura a la cual la masa se fermenta es de 40°C.

En base a los parámetros de pH y temperatura, se puede indicar que la enzima tipo tripsina muy probablemente sea viable para utilizarse en el proceso de panificación, debido a que presenta baja actividad al pH de la masa, lo cual es bueno, ya que se evitaría una hidrólisis excesiva de las proteínas del gluten; además que a la temperatura que se emplea en el proceso de fermentación, la enzima presentó su máxima actividad y

también fue estable; sin embargo lo mejor sería aplicar la enzima en un proceso real de panificación y observar los resultados que se obtengan.

Prueba de Hidrólisis

Hidrólisis del Gluten

En la Figura 7, puede observarse la caída del pH de las muestras de gluten de trigo, de las variedades Aconchi, Altar y Rayón; al ser hidrolizados por la enzima tipo tripsina de la lisa y la proteasa comercial. En general se observó una mayor caída del pH al emplear la proteasa comercial, indicando esto una mayor hidrólisis. Se pudo apreciar que el gluten de la variedad Rayón fue más susceptible a la hidrólisis que la variedad Aconchi y Altar, cuando se empleó la proteasa comercial ($P < 0.05$). Sin embargo, cuando se utilizó la enzima tipo tripsina de la lisa, las variedades Aconchi y Altar fueron más susceptibles a la hidrólisis que la variedad Rayón ($P < 0.05$).

En la Tabla 2, pueden observarse los resultados del porcentaje de proteína hidrolizada estimada, de la proteasa comercial y la enzima tipo tripsina de la lisa sobre el gluten de trigo duro variedad Aconchi y Altar y sobre el trigo panadero variedad Rayón. El porcentaje de proteína hidrolizada fue mayor para Rayón (28.9) que para Aconchi y Altar (27.33 y 27.76, respectivamente) cuando se empleó la proteasa comercial ($P < 0.05$); mientras que con la enzima tipo tripsina de la lisa, el porcentaje de proteína

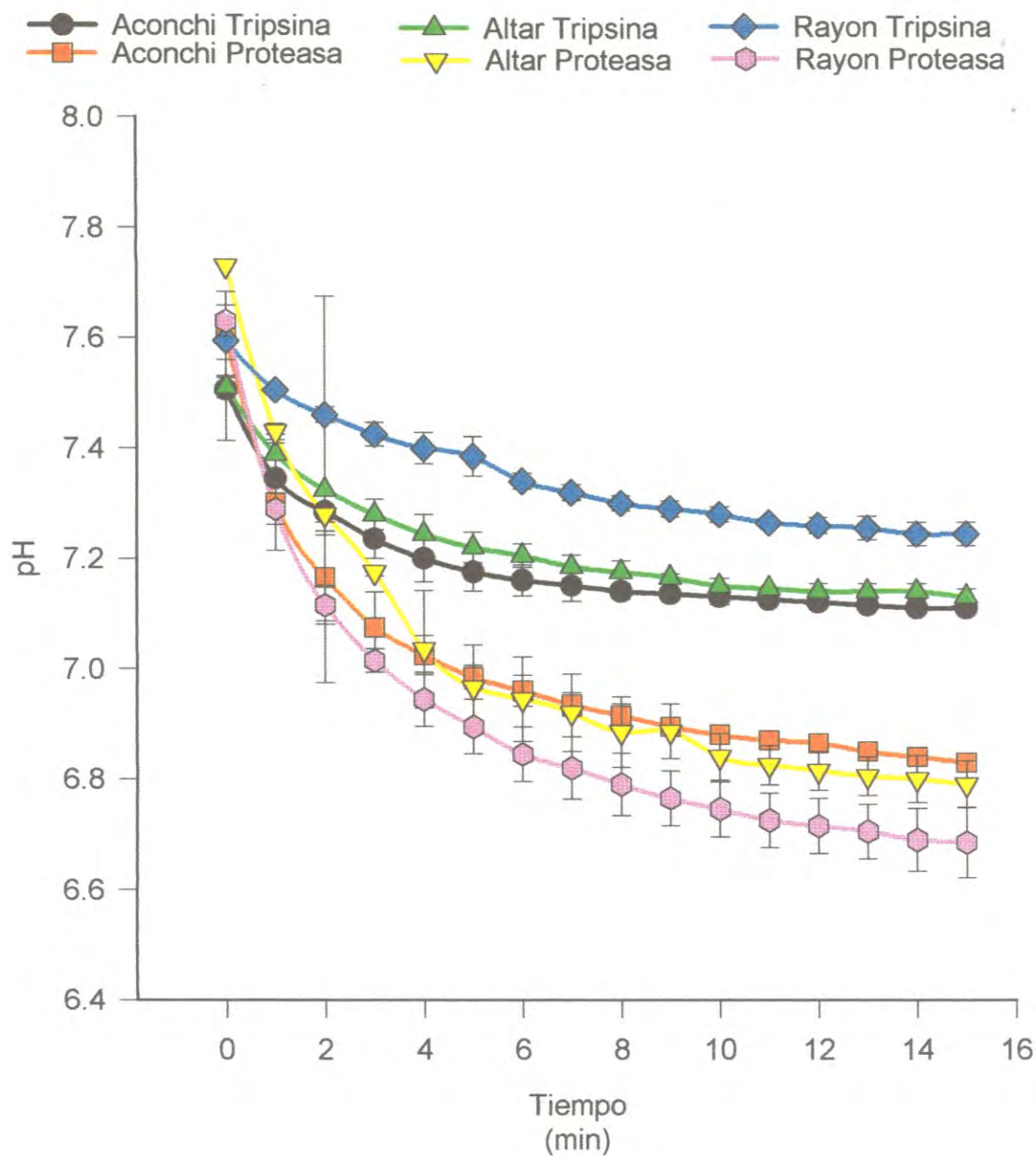


Figura 7. Hidrólisis del gluten de los trigos duros (variedades Aconchi y Altar) y del trigo panadero (variedad Rayón) empleando la enzima tipo tripsina y la proteasa comercial.

Tabla 2. Porcentaje de proteína hidrolizada estimada, del gluten utilizando la proteasa comercial y la enzima tipo tripsina de lisa (*Mugil cephalus*) del Golfo de California.

Porcentaje de proteína hidrolizada estimada*		
Gluten	Proteasa comercial (%)	Tripsina de Lisa (%)
Aconchí	27.33±0.0 ^a	24.29±0.0 ^a
Altar	27.76±0.459 ^a	24.01±0.148 ^a
Rayón	28.91±0.693 ^b	22.64±0.021 ^b

*Estimada en base a Dimes y Haard (1994).

% Digestibilidad= 210.46 – 18.10(X), donde X= pH a los 15 min.

Y= 3.51 – 3.32(X), donde X= % digestibilidad

Letras diferentes indican diferencia significativa ($P<0.05$)

hidrolizada fue mayor para Aconchi y Altar (24.29 y 24, respectivamente) que para Rayón (22.64) ($P < 0.05$).

Los resultados anteriores, indican que la enzima tipo tripsina tiene potencial para aplicarse en el proceso de panificación.

En la Figura 8 se puede observar la desaparición de bandas del gluten de la variedad Aconchí por la enzima tipo tripsina de la lisa (carriles B, C y D) y la proteasa comercial (carriles E, F y G). La enzima tipo tripsina fue capaz de hidrolizar a las proteínas con peso molecular de 45 kDa a 66 kDa, notándose la desaparición de dichas proteínas a los 15 minutos de la hidrólisis (carril D), lo mismo paso con la proteasa comercial, que también hidrolizó a las mismas proteínas. Por otra parte, el gluten de la variedad Altar (Figura 9) también fue hidrolizado por ambas enzimas, observándose la desaparición de proteínas con un peso de 45 kDa a 84 kDa; mientras que el gluten de la variedad Rayón (Figura 10), aunque fue hidrolizado por la enzima tipo tripsina, no hubo desaparición de bandas pero la banda con peso molecular de 36 kDa se observa que desaparece (carriles B, C y D); con la proteasa comercial también desaparece dicha banda y una banda con peso molecular de 97 kDa aproximadamente carriles (E, F y G).

Por el peso molecular que presentan estas proteínas, es probable que sean subunidades de glutenina de bajo peso molecular (30,000 a 50,000 daltons) (Beasley *et al.*, 2001) y gliadinas (30,000 a 50,000 daltons) (Wrigley and Bekes, 1999), ambas proteínas al formar el gluten, le confieren las características de elasticidad y extensibilidad (Pomeranz, 1990); por lo cual el efecto de la enzima tipo tripsina sobre

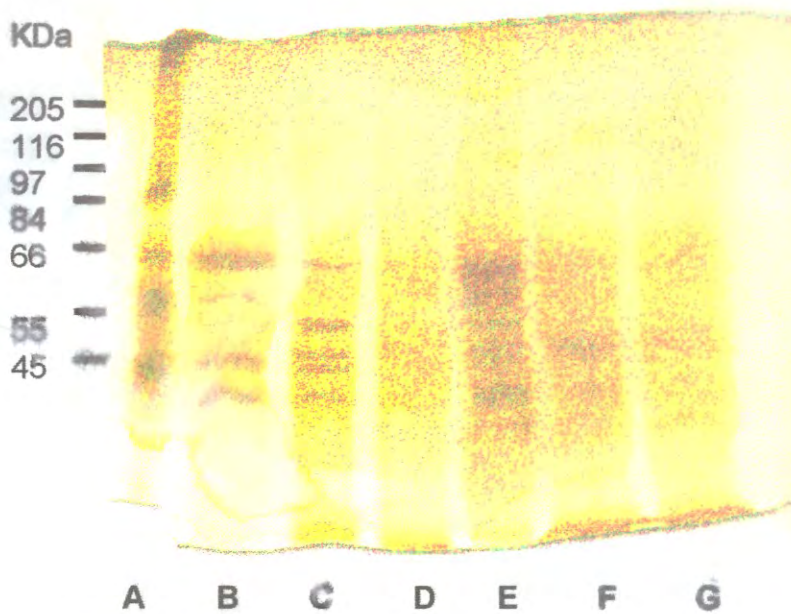


Figura 8. Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida de la hidrólisis del trigo duro variedad Aconchi. Carril A: marcadores de peso molecular; Carril B: Gluten+Tripsina 0 min; Carril C: Gluten+Tripsina 10 min; Carril D: Gluten+Tripsina 15 min; Carril E: Gluten+Proteasa 0 min; Carril F: Gluten +Proteasa 10 min; Carril G: Gluten+Proteasa 15 min.

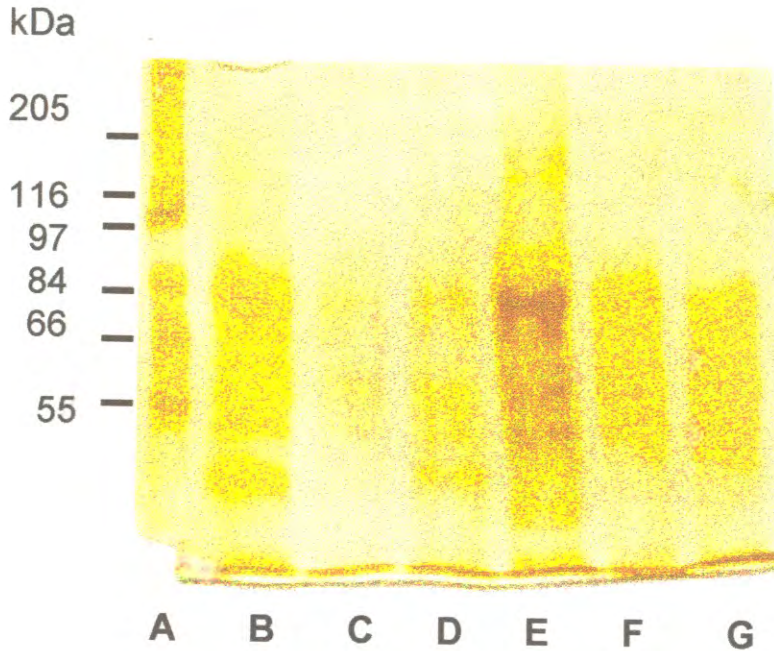


Figura 9. Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida de la hidrólisis del trigo duro variedad Altar. Carril A: marcadores de peso molecular; Carril B: Gluten+Tripsina 0 min; Carril C: Gluten+Tripsina 10 min; Carril D: Gluten+Tripsina 15 min; Carril E: Gluten+Proteasa 0 min; Carril F: Gluten +Proteasa 10 min; Carril G: Gluten+Proteasa 15 min.

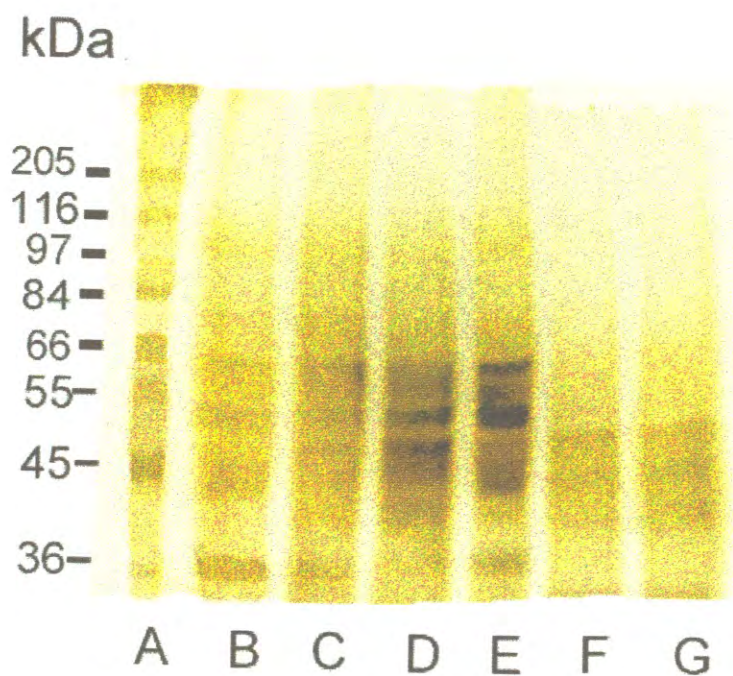


Figura 10. Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida de la hidrólisis del trigo panadero variedad Rayón. Carril A: marcadores de peso molecular; Carril B: Gluten+Tripsina 0 min; Carril C: Gluten+Tripsina 10 min; Carril D: Gluten+Tripsina 15 min; Carril E: Gluten+Proteasa 0 min; Carril F: Gluten +Proteasa 10 min; Carril G: Gluten+Proteasa 15 min.

dichas proteínas del trigo duro, pueda ser benéfico para que dicho trigo se utilice en panificación.

Posiblemente el mayor efecto hidrolítico de la proteasa comercial se deba a que se tuvieron más unidades de esta enzima (3.6 U/mL) que la enzima tipo tripsina (0.05 U/mL), lo cual puede verse reflejado en la hidrólisis de más enlaces peptídicos, sin especificar sobre que aminoácidos se lleva a cabo dicha hidrólisis. Por otra parte, la tripsina hidroliza enlaces peptídicos en donde se encuentren los aminoácidos lisina y arginina, sin embargo, el tipo de aminoácidos y la cantidad en que se encuentran en las proteínas del gluten, probablemente no influyó en la hidrólisis de los diferentes glutenes, ya que ésta es muy similar tanto en trigo duro como en trigo panadero (Feillet, 1988).

Probablemente, la característica genética y el arreglo de las proteínas del gluten sean los factores que más afectan en la hidrólisis del gluten; se sabe que genéticamente los trigos duros son tetraploides (genomas AABB) y los trigos panaderos hexaploides (AABBDD) (Bozzini 1988; Pomeranz 1990), lo cual puede influir en la secuencia de aminoácidos y las uniones que se dan entre ellos para formar las proteínas y el arreglo final de éstas en el gluten. Por ejemplo, las gluteninas de trigo duro están compuestas de anillos en orientación al azar, mientras que las de trigo panadero están compuestas de fibras paralelas agrupadas en agregados (Orth *et al.*, 1973 citado por Feillet, 1988). También las gluteninas de trigo duro tienen poca habilidad para formar polímeros de gran tamaño, posiblemente debido a la baja capacidad para formar enlaces disulfuro intermoleculares (Ammar *et al.*, 2000) a diferencia de las gluteninas de trigo panadero,

las cuales son capaces de formar enlaces disulfuro intermoleculares (Wrigley and Békes, 1999).

En base a lo anterior se puede decir que la tripsina de lisa hidrolizó mejor a los moléculas de proteína que no tengan un peso molecular muy elevado, contrario a lo que sucede con la proteasa comercial.

CONCLUSIONES

Se logró establecer las condiciones para extraer a la enzima tipo tripsina del intestino de la lisa del Golfo de California, y se logró obtener en forma casi pura.

El peso molecular de la enzima tipo tripsina fue de 27 kDa y presentó una actividad de 0.24 U/mg de proteína. Se observaron dos bandas restantes que tuvieron pesos moleculares de 72 kDa y 75 kDa.

El pH óptimo de la enzima tipo tripsina tuvo un rango de 8 a 10 y presentó estabilidad a pH de 4, 7 y 9 por 30 min.

En la temperatura se presentaron dos picos de máxima actividad, a 40°C y 60°C, y la enzima fue estable a 0°, 40° y 70°C por 30 min.

La enzima tipo tripsina presentó mayor hidrólisis sobre los gluten de trigo duro (Aconchi y Altar) que sobre el gluten de trigo panadero (Rayón); para la proteasa comercial, la hidrólisis fue mayor en el gluten del trigo panadero que en el gluten de los trigos duros.

La enzima tipo tripsina de la lisa fue capaz de hidrolizar a las proteínas del gluten de trigo duro.

Este trabajo es de los primeros en los cuales se logra separar la tripsina del sistema digestivo de un pez tropical capturado en el Golfo de California.

Al evaluar la capacidad de la tripsina de la lisa del Golfo, de hidrolizar al gluten del trigo duro, se puede proponer su uso en la industria panadera.

RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar aparte de la columna de afinidad con el SBTI, otra columna con el inhibidor benzamidina o utilizar columnas de intercambio iónico. También para conocer si las dos bandas de alto peso molecular tienen en realidad actividad tripsina se recomienda utilizar la técnica de Hjelmeland y Raa (1982) de actividad en gel donde utilizan BAPNA como sustrato.

Realizar un análisis de aminoácidos a la tripsina purificada y tratar de relacionar su composición con la actividad y estabilidad a diferentes pH y temperaturas.

Utilizar la enzima tipo tripsina de la lisa en un proceso de horneado y ver que resultados se obtienen, esto para confirmar si es viable su uso en la obtención de productos horneados.

BIBLIOGRAFÍA

- A. A. C. C. Approved Methods of Analysis. 1991. 8th edition. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, M. N. U. S. A.
- Ammar, K., Kronstad, W. E. and Morris C. F. 2000. Breadmaking quality of selected durum wheat genotypes and its relationship with high molecular weight glutenin subunits allelic variation and gluten protein polymeric composition. *Cereal Chem.* 77(2):230-236.
- Beasley, H. L., Blanchard, C. L. and Bekes, F. 2001. Preparative method for in vitro production of functional polymers from glutenin subunits of wheat. *Cereal Chem.* 78(4):464-470.
- Berk, A. 1980. Introducción a la Bioquímica de los Alimentos de J. B. S. Braverman. 1^a edición. Ed. El Manual Moderno. México. pp. 48-51.
- Blow, D. M., Janin, J. and Sweet, R. M. 1974. Mode of action of soybean trypsin inhibitor (Kunitz) as a model for specific protein-protein interactions. *Nature, Lond.* 249, 54-57.
- Bozzini, A. 1988. Chapter 1: Origin, Distribution and Production of Durum Wheat in the World. DURUM Chemistry and Technology. Published by American Association of Cereal Chemists, Inc. St Paul, Minnesota, USA.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Bushuk, W. 1986. Wheat: Chemistry and uses. *Cereal Foods World*. Vol. 31, No. 3, pp. 218-226.
- Cano-López, A.; Simpson, b. K. and Haard, N. F. 1987. Extraction of carotenoprotein from shrimp process wastes with the aid of trypsin from Atlantic cod. *J. of Food Sci.* Vol. 52, No.2, pp. 503-506.
- Carvajal-Gil, M. y Peña, V. C. B. 1982. Las variedades más recientes de trigo en México. Reproducido de la Revista Continental PAN del mes de mayo.
- Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 1991. Revista Mensual Pan. No. 458.
- Charley, H. 1987. *Tecnología de Alimentos. Procesos Químicos y Físicos en la preparación de Alimentos*. Ed. LIMUSA. México.
- Charley, H. 1988. *Preparación de Alimentos*. Vol. 4. Ed. LIMUSA. México.
- Cohen, T., Gertler, A. and Birk, Y. 1981. Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*)-I. Purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase B. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol.679B, pp. 639-646.

- De Vecchi, S. and Coppes, Z. 1996. Marine fish digestive proteases – relevance to food industry and the south-west Atlantic region – a review. *J. of Food Biochem.* 20:193-214.
- Dimes, L. E. and Haard, N. F. 1994. Estimation of protein digestibility-I. Development of an *in vitro* method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 108A.No. 2/3 pp. 349-362.
- Erlanger, B. F.; Kokowky, N. and Cohen, W. 1961. The preparations and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95:271-278.
- Fahrney, D. E. and Gold, A. M. 1963. Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. I. Rates of reaction with acetyl-cholinesterase, α -chymotrypsin and trypsin. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 997-1000.
- Feillet, P. 1988. Chapter 5: Protein and enzymes composition of durum wheat. *DURUM Chemistry and Technology*. Published by American Association of Cereal Chemists, Inc. St Paul, Minnesota, USA.
- Fowler, M. W. 1996. Capítulo 9: Tecnología Enzimática. *Biotecnología para los Ingenieros*. (Ed. Alan Scragg). Editorial LIMUSA. pp. 178-184.
- García-Carreño, F. L. 1992. Protease inhibition in theory and practice. *Biotech. Education*. 3(4):145-150.
- García-Carreño, F. L.; Dimes, L. E. and Haard, N. F. 1993. Substrate gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinase or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214:65-69.

- García-Carreño, F. L. 1996. Manual del Curso de Enzimología. CIBNOR. La Paz, B. C. S. pp. 1-7.
- Gildberg, A.; Simpson, B. K. and Haard, N. F. 2000. Part V: Uses of Enzymes from marine Organisms. Seafood Enzymes. (Ed. Haard, N. F. and Simpson, B. K.) Marcel Dekker, Inc. New York, E. U. A.
- Godfrey, T. And Reichelt, J. 1983. Introduction to Industrial Enzynology. In Industrial Enzymology. The Application of Enzymes in Industry. Nature Press, London, pp. 1-7.
- Guizani, N., Rolle, R. S. Marshall, M. R. amd Wei, C. I. 1991. Isolation, purification and characterization of a trypsin from the pyloric ceca of mullet (*Mugil cephalus*). Comp. Biochem. Physiol. Vol. 98B, No. 4, pp. 517-521.
- Guizani, N., Rolle, R. S. Marshall, M. R. amd Wei, C. I. 1992. Purification and characterization of a trypsin-like enzyme from the hepatopancreas of crayfish (*Procambarus clarkii*). Comp. Biochem. And Physiol. B-Biochem. & Molecular Biology. 103(4): 809-815.
- Haard, N. F. 1990. Fish protease in food industry. II Simposium sobre Biotecnología Marina. La Paz, B.C. S., México.
- Haard, N. F. 1992. A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. J. Aquatic Food Product Technol. 1:17-31.
- Haard, N. F. 1993. Enzyme technology in the aquatic foods industry. Biochem. Aq. Foods.

- Haard, N. F. 1995. Enzymes as food processing aids. Universidad de California, Davis. pp.1-2.
- Haard, N. F. and Simson, B. K. 1994. Chapter 6: Proteases from aquatic organisms and their uses in the seafood industry. Fisheries Processing: Biotechnological applications. (Ed. by A. M. Martin). Chapman & Hall, London. pp. 132-149.
- Heu, M. S., Kim, H. R. and Pyeun, J. H. 1995. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. Comp. Biochem. Physiol. Vol 112B. No. 3, pp. 557-567.
- Hernández, J, 2000. Asociación de Organismos de Agricultores del Norte de Sonora.
- Hjelmeland, K. and Raa J. 1982. Characteristics of two trypsin type isozymes isolated from the Arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). Comp. Biochem. Physiol. Vol. 71B, No. 4, pp. 557-562.
- Hoseney, R. C. 1992. Chapter 3: Cereal proteins. Principles of Cereal Science and Technology. Published by the American Association of Cereal Chemists, Inc. U. S. A. pp. 76-80.
- Hsu, H. W.; Vavak, D. L.; Stterle, L. D. and Miller, G. A. 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. J. of Food Sci. 42(5):1269-1273.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 1988; 1997.
- Kent, N. L. 1984. Technology of Cereals. An introduction for Students of Food Science and Agriculture. 3^a edition. Pergamon Press. Great Britain. pp. 1-16.

- Kristjánsson, M. M. 1991. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Agric. Food Chem. 39, 1738-1742.
- Laemli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature London. 227: 680-685.
- Lehninger, A. L. 1995. Bioquímica. 18ª reimpresión. Ediciones Omega, Barcelona, España. pp. 201-202.
- Mathewson, P. R. 1998. Enzymes. Ed. Eagan Press.
- Mathewson, P. R. 2000. Enzymatic activity during bread baking. Cereal Foods World. 45(3):98-101.
- Olivas-Burrola, H. 1999. Tesis: Actividad proteolítica del sistema digestivo de la sierra (*Scomberomorus concolor*). Universidad de Sonora.
- Onno, B. 1994. Capítulo 8: Les levains. La Panification Francaise. Collection sciences et techniques agro-alimentaires. Coordonateurs: Ginet, R. et Godon, B. Technique et Documentation Lavoisier. pp. 292.
- Pavlisko, A., Rial, A. and Coppes, Z. 1997 a. Characterization of trypsin purified from the pyloric caeca of the southwest Atlantic white croaker *Micropogonias furnieri* (Sciaenidae). J. of Food Biochemistry 21:383-400.
- Pavlisko, A., Rial, A., De Vecchi, S. and Coppes, Z. 1997 b. Properties of pepsin and trypsin isolated from the digestive tract of *Parona signata* "palometa". J. of Food Biochemistry 21:289-308.

- Pavlisko, A., Rial, A. and Coppes, Z. 1999. Purification and characterization of a protease from the pyloric caeca of menhaden (*Brevoortia spp*) and mullet (*Mugil spp*) from the southwest Atlantic region. *J. of Food Biochemistry* 23: 225-241.
- Peña, Martín. 2000. Asociación Agrícola Hermosillense. Hermosillo, Sonora. Mex.
- Pharmacia Fine Chemicals. 1979. Affinity Chromatography: principles and methods.
- Poldermans, B. and Schoppink, P. 1999. Controlling the baking process and product quality with enzymes. *Cereal Foods World*. Vol. 4. No. 3. pp. 132-135.
- Pomeranz, Y. 1988. Chapter 4: Chemical Composition of Kernel Structures. *Wheat: Chemistry and Technology*. (Ed. Pomeranz Y.) AACC. U. S. A. pp. 100.
- Pomeranz, Y. 1990. *Advances in Cereal Science and Technology*. Vol. X. Edited by Y. Pomeranz. AACC. ST Paul, Minnesota, USA. pp. 16-20.
- Potter, N. 1978. *La Ciencia de los Alimentos*. Ed. Edutex. México.
- Qarooni, J.; Ponte, J. G. and Posner, E. S. 1992. Flat breads of the world. *Cereal Foods World*. Vol. 37, No. 12, pp. 863.
- Quaglia, G. 1991. Capítulo 7: Los mejorantes. *Ciencia y Tecnología de la Panificación*. Ed. ACRIBIA. Zaragoza, España. pp. 190-191.
- Raksakulthai, R., Rosenberg, M. and Hard, N. F. 2000. Accelerated cheddar cheese ripening with an aminopeptidase fraction from squid hepatopancreas. *J. Food Sci.*
- Reece, P. 1988. Recovery of proteases from fish waste. *Process Biochemistry*. June, 62-66.
- Rungruangsak, T. K. and Male, R. 2000. Part II: Enzymes. *Seafood Enzymes*. (Ed. Haard, N. F. and Simpson, B. K.) Marcel Dekker, Inc. Ney York, E. U. A.

- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Recursos (SAGAR). 1997.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2001.
- Segel, I. H. 1976. Chapter 4: Enzymes. BIOCHEMICAL CALCULATION. 2nd edition. John Wiley & sons. U. S. A.
- Serna-Saldívar, S. O. 1996. Capítulo 4: Propiedades físicas y clasificación de los cereales. Química, Almacenamiento e Industrialización de los Cereales. 1^a Edición. AGT Editor. México, D. F. pp. 90.
- Simpson, B. K. and Haard, N. F. 1984. Trypsin from Greenland cod, *Gadus ogac*, isolation and comparative properties. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 79B, No. 4, pp. 613-622.
- Simpson, B. K. and Haard, N. F. 1985. Characterization of the trypsin fraction from cunner (*Tautogolabrus adspersus*). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 80B, No. 3, pp. 475-480.
- Simpson, B. K. and Haard, N. F. 1987. Cold-adapted enzymes from fish. *Food Biotech.* pp. 495-523.
- Simpson, B. K., Simpson, M. V. and Haard, N. F. 1989. On the mechanism of enzyme action: digestive proteases from selected marine organisms. *Biotech. and Applied Biochem.* 11, 226-234.
- Simpson, B. K., Simpson, M. V. and Haard, N. F. 1990. Properties of trypsin from the pyloric ceca of Atlantic cod (*gadus morhua*). *J. of Food Sci.* Volume 55, No. 4, 959-961.

- Stauffer, C. 1989. Enzyme Assays for Food Scientists. Van Nostrand Reinhol/AVI. New York.
- van Dam, H. W. and Hille, J. D. R. 1992. Yeast and enzymes in breadmaking. Cereal Foods World.
- Vasconcelos-Pérez, J., Sánchez-González, S. y Schultz-Ruíz, L. 1992. Cap.: La Pesquería de la Lisa. Pesquerías Relevantantes de México. Tomo II. Instituto Nacional de la Pesca, SEMARNAP.
- Whitaker R., John. 1994. Principles of Enzymology for the Food Sciences. 2ª Edición. Ed. Marcel Dekker, Inc. U. S. A. pp. 1-3.
- Wong, D. W. S. 1995. Chapter 1: Food Enzymes and Future Development. Food Enzymes: Structure and Mechanism. Ed. Chapman & Hall. New York. U. S. A.
- Wrigley, C. W. and Békes, F.1999. Glutenin-protein formation during the continuum from anthesis to processing. Cereal foods World. Vol. 44, No. 8, pp. 562.
- Zielke, M. 1991. Durum: important food source. World Grain.Vol. 9, April, pp. 10.