

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PROTEOLÍTICA EN PRODUCTOS PESQUEROS

Generalidades.

Las enzimas son una herramienta importante en biotecnología, procesamiento de alimentos y otras industrias. Existe una demanda considerable de enzimas con determinadas propiedades para usos muy específicos, (Haard, 1990). Las enzimas de origen microbiano, vegetal y animal han sido ampliamente estudiadas, mientras que las enzimas de origen marino no han sido totalmente estudiadas, (Haard, 1990).

El medio ambiente acuático es una fuente potencial de enzimas con propiedades físicas, químicas y catalíticas únicas, dada la diversidad de especies adaptadas a diferentes hábitats. De tal manera, que el conocimiento del tipo y propiedades de las enzimas de origen marino, representa actualmente una línea de investigación importante para futuras aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica entre otras, (Haard, 1990).

Alrededor del 60% de las enzimas usadas a nivel industrial son proteasas, usadas principalmente como detergentes y en la industria alimentaria.

Las proteasas difieren en sus propiedades catalíticas y físicas, así la utilización de una proteasa en particular dependerá de factores como la especificidad de la enzima, pH óptimo, temperatura, y la respuesta a estabilizadores, activadores e inhibidores específicos, (Haard, 1990).

Fuente de enzimas en productos marinos.

La identificación de una proteasa específica, responsable de un cambio particular es complicada por varias razones:

1. Existen muchas enzimas musculares, que hidrolizan proteínas.
2. Enzimas de otros tejidos pueden contaminar el músculo.
3. El estado fisiológico del organismo influye en la actividad proteolítica.
4. Gran diversidad de organismos marinos.
5. Las enzimas pueden provenir de microorganismos o parásitos contaminantes. (Haard y Simpson, 1994)

Proteasas endógenas.

Las proteasas endógenas importantes en productos marinos incluyen aquellas presentes en:

1. Célula muscular.
2. Matriz extracelular y tejido conectivo que envuelve a las células musculares.
3. Aparato digestivo y otros organismos.

Clasificación. Con base en el mecanismo de catálisis usado por la comisión de enzimas de la Unión Internacional de Bioquímicos, las proteasas de pescado pueden ser clasificadas en 4 grupos:

1. Serina proteasas.
2. Aspartil/ácido proteasas:
3. Cisteina/tiol proteasas.

4. Metaloproteasas.

Serinaproteasas. Este grupo de enzimas son endopeptidasas, y tienen la característica en común de ser inhibidas por el diisopropilfosforofluoridato (DFP), el cual reacciona con el grupo hidroxil de un residuo específico de serina en el sitio activo de la enzima, asimismo todas ellas contienen un grupo imidazol y un grupo aspártico carboxil en el sitio activo, (Whitaker, 1994).

A este grupo pertenecen la familia de las quimotripsinas (α , β , y γ quimotripsinas y quimotripsina B), tripsina, elastasa, trombina, subtilisina y α -lítico proteasa.

Los sustratos específicos para las enzimas de este grupo son diferentes. El mecanismo de acción para este grupo de enzimas es idéntico, solamente los grupos específicos involucrados en la unión del sustrato son diferentes, lo que da como resultado las diferentes especificidades, (Whitaker, 1994).

Tripsina. Esta enzima ha sido aislada a partir de varias especies acuáticas que incluyen el salmón del atlántico, capelín, sardina y bagre entre otros. La tripsina de organismos marinos es similar a la de los animales de sangre caliente con respecto a su peso molecular, composición de aminoácidos y sensibilidad a los inhibidores de serinaproteasas, (Haard y Simpson, 1994).

La tripsina de origen marino tiende a ser más estable en medio alcalino y muy inestable en condiciones ácidas, mientras que la tripsina de mamíferos es más estable en medio ácido.

La energía de activación de Arrhenius es considerablemente más baja en tripsina de origen marino que para aquellas de mamíferos. Una baja energía de activación indica que la reacción es menos sensible a los cambios de temperatura. Este comportamiento tiene implicaciones muy importantes a futuro, ya que actualmente se está investigando el uso de enzimas de origen marino en diversos campos de la biotecnología y la industria alimentaria, una de las ventajas de su uso sería su estabilidad a las temperaturas típicas del procesado de alimentos, (Haard y Simposn, 1994).

La tripsina y quimotripsina proveniente de vertebrados superiores, no hidrolizan efectivamente las proteínas globulares nativas, por lo que generalmente se asume que la desnaturalización e hidrólisis ácida en el estómago es necesaria para efectuar la digestión de las proteínas por las enzimas intestinales. Diversos estudios hechos en Crayfish (crustáceo) y salmonete, indican que las enzimas tripsina y tipo tripsina presentes en el intestino de estos organismos, son capaces de hidrolizar la proteína globular nativa, (Haard y Simpson, 1994).

Quimotripsinas. La familia de las quimotripsinas ha sido reconocida y caracterizada a partir de especies marinas como el pez oro (Racicot, 1984; Ramakrisha, Hultin y Atallah, 1978. Citados por Haard y Simpson, 1994), capelín y arenque (Kalac, 1978. Citado por Haard y Simpson, 1994).

La quimotripsina de origen marino mostró una mayor actividad en aislados protéicos de soya a diferentes temperaturas de reacción (5, 20 y 35 °C), que la quimotripsina de bovino (Ramakrishna, Hultin y Atallah, 1987. Citados por

Haard y Simpson,1994). También mostraron una alta velocidad de reacción e hidrolizaron más enlaces peptídicos en varios sustratos protéicos (caseína, colágeno y seroalbúmina bovina), que los obtenidos de páncreas de res.

Las quimotripsinas provenientes de arenque y capelín exhibieron altas actividades con el sustrato sintético N-benzoil-L-tirosina etil éster (BTEE), que aquellas de bovino, (Kalac, 1978. Citado por Haard y Simpson, 1994).

Mecanismo de acción. El sitio activo de las serinaproteasas tiene como factores comunes: Un residuo aspártil 102, un histidil en posición 57 y un seril 195. La Figura 4 muestra el sitio activo de quimotripsina. El mecanismo de acción de las serinaproteasas involucra dos etapas: acilación y deacilación. En la etapa de acilación los residuos seril-195, histidil-157 y aspartil-102 intervienen catalizando la hidrólisis de los enlaces del sustrato (Figura 5), donde el grupo imidazol de histidil-57 actúa como una base para promover el enlace H ---O del grupo hidroxil de serina-195, facilitando esto, el ataque nucleofílico del oxígeno del grupo seril en el grupo carbonil del sustrato, esto provoca la expulsión del grupo R' y la formación de una acilenzima (estructura C). En el proceso de deacilación, el grupo imidazol sirve como una base general para extraer un protón del agua para facilitar el ataque del ión hidroxilo al grupo carbonil de la acilenzima (estructura D), en el segundo estado de transición intermedio (estructura E), el grupo imidazol actúa como ácido en la deacilación de la acilenzima, esto permite la liberación de un segundo producto y de la enzima (estructura F), (Whitaker, 1994).

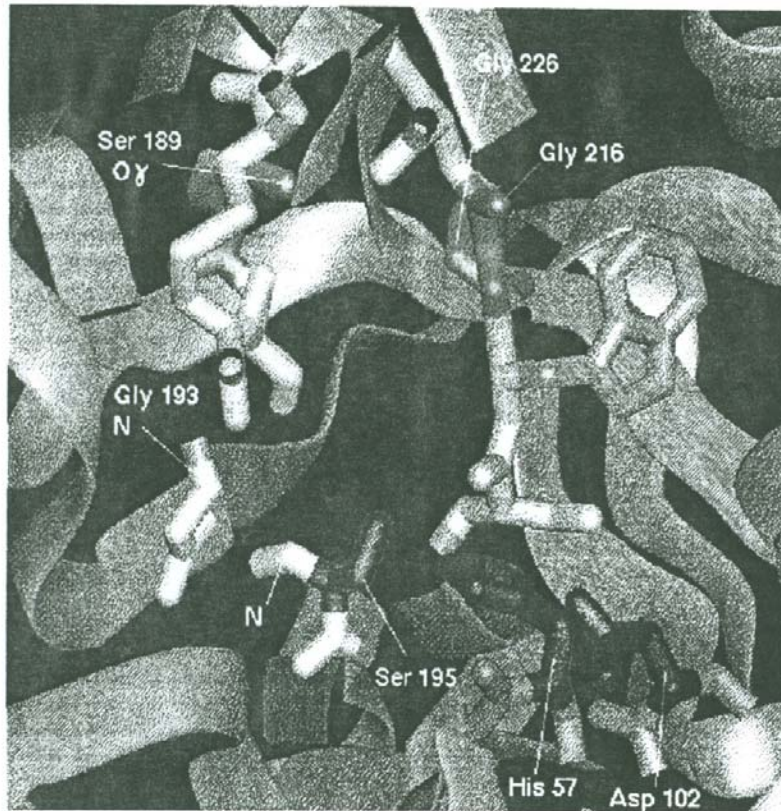
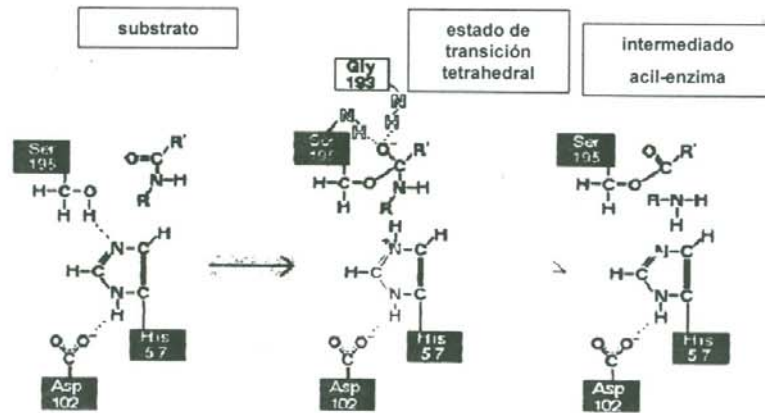
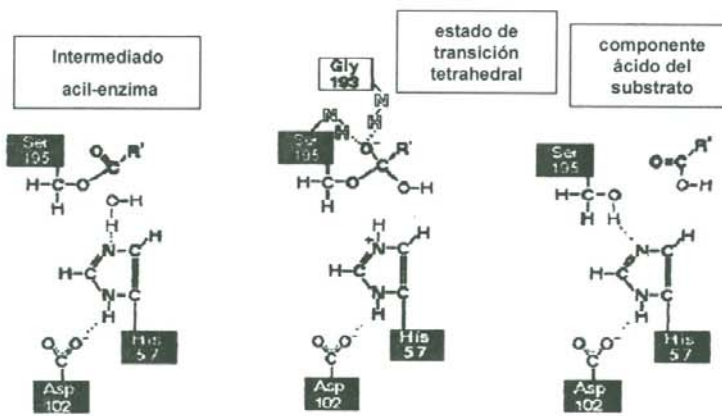


FIGURA 4. Sitio activo de una quimotripsina. His 57, Asp 102 y Ser 195.

Fuente: <http://bio.mtu.edu/campbell/401lecisbp2.html>.



A. ACETILACIÓN



B. DEACILACIÓN

FIGURA 5. Mecanismo de acción de una quimotripsina.

Fuente: <http://bio.mtu.edu/~campbell/401/lecisbp2.html>

Proteasas ácidas o aspárticas. El nombre de este grupo de enzimas se debe a que los grupos carboxil de dos residuos de ácido aspártico son los grupos catálíticos en el sitio activo, también son llamadas carboxilproteasas o proteasas ácidas, ya que su pH óptimo se encuentra 2 y 4. La enzima más estudiada de este grupo es la pepsina, en cambio, la quimosina es ampliamente usada en la industria de alimentos en la elaboración de quesos.

Pepsina. Estas enzimas han sido aisladas a partir de las glándulas gástricas de varios organismos acuáticos, incluidos capelín (Gildberg, y Raa, 1983. Citados por Haard, 1994).

Las pepsinas provenientes de peces de aguas frías, presentan una baja energía de activación de Arrhenius, una constante de Michaelis aparentemente alta, a una temperatura óptima baja, y una baja estabilidad térmica a pH altos, en comparación con pepsinas obtenidas de animales de sangre caliente. Se ha encontrado que las pepsinas de origen marino pueden ser muy resistentes a la autólisis a pH bajos, (Raa, 1990. Citado por Haard y Simpson, 1994). La temperatura de desnaturalización de las pepsinas de peces de aguas frías es alrededor de 20°C menos que las pepsinas de mamíferos.

Hay una relación directa entre la temperatura del hábitat del pez y la energía de activación de Arrhenius para la reacción de proteólisis (Simpson y Haard, 1987; Haard et al., 1982. Citados por Haard y Simpson, 1994). La E_a para la hidrólisis de hemoglobina por pepsina B de bacalao antártico es de

2.9 Kcal/mol, y de 11.2 Kcal/mol para la pepsina de animales de abasto (Arunchalam y Haard, 1985. Citados por Haard y Simpson, 1994).

Quimosina. Es una proteasa ácida con algunas características distintivas diferentes a otras proteasas gástricas, por ejemplo el pH óptimo de proteólisis es de 7.0. La quimosina generalmente está presente en la leche de los rumiantes mientras que las pepsinas se encuentran en los rumiantes y en animales monogástricos, (Haard y Simpson, 1994).

La presencia de quimosina en animales no rumiantes, no ha sido bien establecida. Recientemente, se encontró que las proteasas gástricas de foca incluyen dos isoenzimas con propiedades tipo quimosina, más que de pepsina (Haard et al, 1983; Shamsuzzaman y Haard, 1983,1984,1985. Citados por Haard y Simpson, 1994). La proteasa tipo quimosina presenta propiedades que la distinguen de una pepsina incluyendo una alta actividad proteolítica; un pH óptimo de 2.2-3.5 para hidrolizar hemoglobina, baja actividad sobre N-acetil-L-fenilalanil- 3,5-diiodo-L-tirosina e inestable a urea.

Cisteínaproteasas. Las sulfidrilproteasas, también llamadas tiolproteasas y cisteínaproteasas, tienen la característica común de ser inhibidas por reactivos sulfidrilos, (Whitaker, John, 1994).

Catepsinas. La terminología para estas proteasas, ha sido cambiada desde su clasificación inicial como catepsinas I, II, III, etc, y A, B, C, etc, (Fruton et al,1941 Citados por Haard y Simpson, 1994). Las catepsinas son ahora reconocidas como una familia de endopeptidasas y/o exopeptidasas. Existe evidencia que las proteasas lisosomales juegan un papel poco importante en

el funcionamiento de las proteínas miofibrilares in vivo (Goll et al, 1989. Citado por Haard y Simpson, 1994), sin embargo el importante papel de estas enzimas en la degradación proteica del músculo posmortem, sigue vigente.

Las catepsinas están caracterizadas como cadenas de polipéptidos simples con pesos moleculares de 13.6 a 25 Kda. También presentan un amplio rango de pH óptimo de 3.5 en algunos a pH de 8.0 en otros. Estas enzimas son activadas por iones cloro, y generalmente requieren agentes sulfhidrilos y/o quelantes para su activación. Son inhibidas por metales pesados y ácido iodoacético.

El músculo de pescado contiene alrededor de 10 veces más actividad catepsínica que los músculos de los mamíferos, (Siebert y Schnutt, 1965. Citados por Haaard y Simpson, 1994), y juega un papel muy importante en el ablandamiento del músculo durante el manejo postcaptura y almacenamiento, (Warrier et al, 1985. Citados por Haard y Simpson, 1994).

Metaloproteasas. Este grupo de enzimas está constituido principalmente por exopeptidasas, tales como carboxipeptidasa A (peptidil-L-aminoácido hidrolasa) y B (peptidil-L-lisina hidrolasa), glicil-glicina dipeptidasa (dipéptido hidrolasa), carnosinasa y citosol aminopeptidasa, prolidasa e iminodipeptidasa, entre muchas otras encontradas en tejido animal. Las metaloproteasas se caracterizan por ser inhibidas por agentes quelantes de metales.

La enzima carboxipeptidasa A, ha sido estudiada ampliamente, el sitio activo consiste de un ión Zn^{2+} enlazado con dos anillos imidazol de histidina y un grupo carboxil de un residuo glutámico, en el sitio activo también es importante un segundo residuo glutámico, (Whitaker, John, 1994).

Colagenasas. Estas enzimas han sido reconocidas y caracterizadas en glándulas digestivas de varios organismos marinos; jaiba, langostino y langosta (Eisen y Jeffrey, 1969; Eisen et al, 1973; Grant et al, 1983; Baranowski et al, 1984; Nip et al, 1985 y Glenn, 1992. Citados por Haard y Simpson, 1994).

Las colagenasas de origen marino se parecen a su contraparte de fuentes de mamíferos, en su acción sobre el colágeno nativo, sin embargo las de origen marino presentan actividad tipo tripsina y tipo quimotripsina.

Estas proteasas son más activas en un rango de pH de 6.5- 8.0, e inactivadas a pH debajo de 6.0. Se inhiben en presencia de diisopropilfluorofosfato y fenilmetil sulfonil fluoruro, Las proteasas son capaces de degradar el esqueleto polipéptico del colágeno nativo, bajo condiciones que no desnaturalizan la proteína. Las colagenasas de hepatopáncreas de invertebrados marinos han sido relacionadas en los cambios en textura durante el almacenamiento de estos organismos, (Haard y Simpson, 1994).

Calpainas. Estas enzimas son conocidas como proteasas neutras dependientes de calcio, las calpainas han sido caracterizadas en el músculo esquelético de varias especies marinas, bacalao, arenque y sardina (Goll, 1992. Citado por Haard y Simpson, 1994).

Las calpainas actúan sobre las proteínas miofibrilares incluidas las cadenas pesadas de miosina; y están asociadas al ablandamiento del músculo de pescado durante su almacenamiento postcaptura, por lo que puede esperarse que su actividad continúe en el músculo de pescado almacenado en hielo, lo que puede ser dañino para organismos marinos que se intenten usar para elaborar productos tipo surimi, (Haard y Simpson, 1994).

Actividad Proteolítica en Calamar.

Manto.

Sakai et al., (1981) encontraron que el calamar (*Ommastrephes sloani pacificus*) presenta una alta tasa de crecimiento, la cual debe involucrar un alto ritmo de regeneración de proteínas corporales y por lo tanto una intensa actividad de las enzimas proteolíticas.

Estos investigadores midieron la actividad autolítica del calamar a diferentes pH y cuantificaron los péptidos solubles en ácido tricloroacético, encontrando una alta actividad proteolítica en el rango de pH's ácidos con una actividad muy baja en los rangos de pH's neutros y alcalinos.

La actividad a pH 3.1 estuvo fuertemente inhibida por la pepstatina que inhibe a las carboxil proteinasas como la pepsina y catepsina D, además que el pH óptimo de la reacción de inhibición pH 3,1 está dentro del rango óptimo para la catepsina D pH 2.8-4.0.

Leblanc y Gill (1982), realizaron un estudio comparativo de la actividad proteolítica del músculo de *Illex illecebrosus* y *Loligo pealei* Lesur,

reportando que ambas especies presentaron actividad en un amplio rango de pH ácidos y alcalinos, encontrándose una mayor actividad a pH's ácidos (2.6 y 3.6 respectivamente). A pesar de esta similitud, *Illex illecebrosus* presentó una mayor actividad proteolítica y un menor tiempo de vida útil; por lo que estos investigadores sugieren que cada especie tiene un sistema único de enzimas fuertemente activo a diferentes pH's, lo que probablemente repercute en la velocidad de deterioro de cada especie.

De igual forma Stanley y Hultin (1984) estudiaron la actividad proteolítica de los extractos crudos de músculo de *Illex illecebrosus*, *Loligo pealei* y *Loligo opalescens*, encontrando que la actividad se presentó en un amplio rango de pH's de 2.6 a 7.4, la actividad específica fue 10-20 veces más alta que la encontrada en lenguado y merluza, lo cual indicó la presencia de proteasas fuertemente activas en el músculo de estas especies, asociando la pérdida de calidad posmortem del músculo con la presencia de estas enzimas.

Sakai-Suzuki, et al (1986), purificaron y caracterizaron una cisteínproteasa proveniente del extracto crudo de músculo de calamar *Todarodes pacificus*, con un peso molecular de 21 kDa; la actividad de la enzima fue inhibida por quimostatina y NEM (N-etilmaleimida) entre otros. Mientras que Okamoto, et al (1993), trabajando con la misma especie de calamar, purificaron y caracterizaron 2 metaloproteasas que nombraron miosina I y miosinasa II con un peso molecular de 16 y 20 kDa respectivamente; las condiciones óptimas de pH y temperatura para ambas especies fué de pH 7.0 y 40°C,

y su actividad inhibida por EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) y 1,10 fenantrolina.

Konno y Fukazawa (1993), demostraron que la actividad autoproteolítica del calamar (*Toradores pacificus*) estaba dada por al menos 2 tipos de proteasas metaloproteasas y serinaproteasa bajo diferentes condiciones de almacenamiento e inhibidores (Tabla 2).

Además de las cisteinaproteasas, metaloproteasas, catepsina D y serinaproteasas reportadas en las especies de calamar ya mencionadas, se ha detectado la presencia de la enzima tipo tripsina en músculo de calamar (*Loligo bleekeri*), la cual degrada miosina y tiene una temperatura óptima de 35°C. Estos resultados muestran que en la actividad proteolítica del músculo de calamar se encuentran asociadas diversas enzimas con condiciones óptimas de actividad diferentes.

En el caso particular del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) son escasos los trabajos encaminados a identificar el tipo de enzimas con actividad proteolítica así como las condiciones de pH y temperatura óptimas: Ponce-Alquicira, et al (1999), reportaron un patrón de actividad proteolítica en extractos crudos de calamar gigante a pH's ácidos y alcalinos con una actividad óptima a pH 3.0 y 7.5 a 35°C. La actividad fue inhibida por pepstatina, leupeptina y iodoacetamida, concluyendo que la actividad de catepsinas y cisteinaproteasas pueden jugar un papel importante en la degradación proteolítica posmortem.

TABLA 2. Inhibición de la autólisis por varios sustratos en manto de calamar *Todarodes pacificus*.

Inhibidores	Actividad Residual	
	25 °C	35°C
Ninguno	100	100
EDTA, 1mM	17	17
Ácido etileno glicol-bis-(β -aminoetil eter)	19	89
Pirofosfato, 10 mM	26	77
Fluoruro de metil sulfonil, 1mM	82	82
Leupeptina, 10 mg/mL	76	90
Inhibidor de tripsina, 0.25 mg/mL	89	90
Inhibidor de quimotripsina, papa, 0.5 μ g/mL	79	25
Acetamida de yodo, 5mM	157	91

Fuente: Konno y Fukasawa, 1993