



**TECNOLÓGICO NACIONAL  
DE MÉXICO**



## **Instituto Tecnológico de Tepic**

**EVALUACIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS DE FRUTOS DE *Bromelia karatas* Y *Bromelia pinguin* PARA OBTENER PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

**POR**

**IBQ JULIÁN GONZÁLEZ BORRAYO**

**TESIS PROPUESTA A LA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**

**DIRECTORA:**

**DRA. MARÍA DE LOURDES GARCÍA MAGAÑA**

**CO-DIRECTORA:**

**DRA. EFIGENIA MONTALVO GONZÁLEZ**

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, mis hermanos y a mi novia Liz,  
por su constante e incondicional apoyo durante esta etapa de mi vida y los proyectos futuros.

A mis compañeros,  
Por brindarme recomendaciones durante los seminarios y por su amistad incondicional

Al comité tutorial de este proyecto,  
por su constante apoyo para el desarrollo y conclusión del proyecto.

A el Dr. Enrique Rudiño Piñera y a su equipo de trabajo del IBT de la UNAM,  
por su apoyo y enseñanza durante las etapas de prepurificación de los extractos enzimáticos.

A los profesores investigadores del LIIA,  
Por su apoyo, consejos y enseñanzas durante el desarrollo de este proyecto

Al Instituto Tecnológico de Tepic,  
por permitir el desarrollo del proyecto de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT),  
por la beca de apoyo proporcionada durante el desarrollo del proyecto.

## RESUMEN

González Borrayo, Julián. M.C.A. Instituto Tecnológico de Tepic. Agosto de 2015. Evaluación de extractos enzimáticos de frutos de *Bromelia karatas* y *Bromelia pinguin* para obtener péptidos con actividad antioxidante. Dra. García Magaña, María de Lourdes.

La producción y procesamiento de camarón a nivel mundial genera una gran cantidad de subproductos lo cuales implican un riesgo ambiental, por lo que se han buscado estrategias para el aprovechamiento de sus compuestos como el de la proteína por medio de hidrólisis proteolítica (por vía enzimática, microbiana y autólisis) para la generación de péptidos bioactivos (secuencias de aminoácidos que presenten actividad biológica).

El objetivo del presente trabajo fue emplear extractos de proteasas de frutos de *Bromelia karatas* y *Bromelia pinguin* para hidrolizar proteínas de la cabeza de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) para generar hidrolizados con capacidad antioxidante.

Primeramente se realizó la extracción y prepurificación de los extractos enzimáticos por medio de salting-out con sulfato de amonio, seguida de cromatografías de exclusión molecular e intercambio iónico comprobando la pureza y actividad proteolítica en cada etapa por medio de técnicas electroforéticas. Posteriormente se hidrolizaron las proteínas de la cabeza de camarón con los extractos proteolíticos evaluando el efecto de pH, temperatura, tiempo de hidrólisis, concentración de sustrato y de enzima para determinar las condiciones óptimas por medio de un análisis de Taguchi L<sub>16</sub>. Finalmente las condiciones óptimas se emplearon para generar nuevos hidrolizados los cuales se

fraccionaron para evaluar, en cada fracción, la capacidad antioxidante y aproximar el peso molecular por Tricine-SDS-PAGE.

En los resultados se observó que los extractos de enzimas de los frutos de bromelias obtenidos por salting-out con sulfato de amonio constaban de varias proteasas con distintos puntos isoeléctricos, lo cual benefició al proyecto ya que esto implica una hidrólisis mayor. Se obtuvieron las condiciones óptimas para hidrolizar las proteínas de la cabeza de camarón con cada extracto proteolítico. Al fraccionar los hidrolizados generados en condiciones óptimas se observó que la actividad antioxidante es mayor en las fracciones que presentan un perfil de pesos moleculares más pequeños lo cual coincide con lo reportado en los antecedentes.

Con los resultados del proyecto se puede concluir que los extractos enzimáticos de ambos frutos constan de varias proteasas las cuales pueden ser purificadas por cromatografía de intercambio iónico, sin embargo para el proyecto no fue necesario realizarlo para hidrolizar las proteínas de la cabeza de camarón generando hidrolizados con actividad antioxidante y secuencias de aminoácidos con pesos moleculares de aproximadamente 1,400 Da o menores.

**Palabras clave:** *Bromelia karatas*, *Bromelia pinguin*, proteasas, hidrólisis proteolítica, subproductos de camarón, actividad antioxidante.

## ABSTRACT

González Borrayo, Julián. M.C.A. Instituto Tecnológico de Tepic. August 2015. Evaluation of enzymatic extracts of fruits of *Bromelia karatas* and *Bromelia pinguin* to produce peptides with antioxidant activity. Dra. García Magaña, María de Lourdes.

Production and processing global shrimp generates a lot of products which involve an environmental risk. Strategies have been employed for the use of the compounds as protein by proteolytic hydrolysis (enzymatically, microbial and autolysis) for the generation of bioactive peptides (amino acid sequences presented biological activity).

The aim of this study was to use proteolytic extracts of fruits *Bromelia karatas* and *Bromelia pinguin* to hydrolyze proteins head white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to generate hydrolysates with antioxidant capacity.

Extracting and prepurification of the enzymatic extracts was performed by salting-out with ammonium sulfate, followed by molecular exclusion chromatography and ion exchange checking purity and proteolytic activity at each stage by electrophoretic techniques. Subsequently proteins shrimp head proteolytic extracts evaluating the effect of pH, temperature, hydrolysis time, concentration of substrate and enzyme to determine the optimal hydrolysis conditions through  $L_{16}$  Taguchi analysis. Finally the optimal conditions were used to generate new fractionated hydrolysates which to evaluate, in each fraction, the antioxidant capacity and approximate molecular weight by Tricine-SDS-PAGE.

In the results it was observed that the enzyme extracts the bromelia's fruits obtained by salting out with ammonium sulfate consisted of several proteases with different isoelectric points, which benefited the project as this implies greater hydrolysis. Optimal conditions for hydrolyzing proteins head proteolytic shrimp each extract was obtained. By fractionating the hydrolysates produced under optimal conditions was observed that the antioxidant activity is higher in the fractions showing a profile of smaller molecular weight which is consistent with that reported.

With the project results it can be concluded that the enzymatic extracts of both fruits consist of several proteases which can be purified by ion exchange chromatography, however the project was not being done to hydrolyze proteins shrimp head, generating hydrolysates with antioxidant activity and amino acid sequences with molecular weights of about 1,400 Da or less.

**Keywords:** *Bromelia karatas*, *Bromelia pinguin*, proteases, proteolytic hydrolysis, shrimp by-products, antioxidant activity.

## CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE CUADROS	xviii
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	2
2.1 Producción de camarón	2
2.2 Camarón y composición proximal	4
2.3 Obtención de péptidos bioactivos	9
2.4 Proteasas	14
2.5 Obtención de proteasas cisteínicas de origen vegetal	18
2.6 <i>Bromelia pinguin</i>	20
2.7 <i>Bromelia karatas</i>	30
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN	34
CAPÍTULO 4. OBJETIVOS	35

4.1	Objetivo general	35
4.2	Objetivos específicos	35
CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS		36
Etapa 1: Extracción de proteasas prepurificadas		36
5.1	Muestreo	38
5.2	Preparación de las frutas <i>B. pinguin</i> y <i>karatas</i>	38
5.3	Extracción de proteasas de las frutas <i>B. pinguin</i> y <i>B. karatas</i>	38
5.4	Concentración de proteína	38
5.5	Actividad proteolítica	39
5.6	Fraccionamiento del extracto proteico por precipitación con sulfato de amonio	40
5.7	Diálisis	41
5.8	Diafiltración centrífuga	41
5.9	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	42
5.10	Cromatografía de exclusión molecular	44
5.11	Cromatografía de exclusión molecular con inhibidores de proteasas	45
5.12	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones semidesnaturalizantes (seminalive-PAGE) y	45

	zimograma	
5.13	Isoelectroenfoque	46
5.14	Cromatografía de intercambio iónico	46
5.15	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (native-PAGE)	47
5.16	Efecto del DTT y el calor	47
5.17	Análisis estadístico	48
	Etapa 2: Hidrólisis de las proteínas de cabeza de camarón	48
5.18	Determinación de las condiciones de hidrólisis de las proteínas de la cabeza de camarón	50
5.19	Preparación de subproductos de camarón	52
5.20	Concentración de grupos amino libres ( $\alpha$ -NH <sub>2</sub> )	52
5.21	Determinación de la capacidad antioxidante in vitro de los hidrolizados por el método FRAP	53
5.22	Determinación de la capacidad antioxidante in vitro de los hidrolizados por el método ABTS	54
5.23	Análisis estadístico	56
	Etapa 3: Producción de hidrolizados de proteína de la cabeza de camarón en las condiciones óptimas	56
5.24	Producción de los hidrolizados en las condiciones óptimas	58

5.25	Fraccionamiento de los hidrolizados en condiciones óptimas	58
5.26	Análisis electroforético por medio de Tricine-SDS-PAGE	58
CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		61
Etapa 1: Extracción de proteasas prepurificadas		61
6.1	Precipitación con sulfato de amonio	61
6.2	Diálisis	64
6.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de los extractos diafiltrados	65
6.4	Separación por tamaño molecular de las proteínas presentes en los extractos diafiltrados de <i>B. karatas</i>	66
6.5	Separación por tamaño molecular de las proteínas presentes en los extractos diafiltrados de <i>B. pinguin</i>	69
6.6	Separación por tamaño molecular de las proteínas presentes en los extractos diafiltrados de <i>B. karatas</i> inhibidos	72
6.7	Separación por tamaño molecular de las proteínas presentes en los extractos diafiltrados de <i>B. pinguin</i> inhibidos	75
6.8	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones semidesnaturalizantes (seminative-PAGE) y	78

	zimograma	
6.9	Isoelectroenfoque	79
6.10	Cromatografía de intercambio iónico de los extractos diafiltrados de <i>B. karatas</i>	81
6.11	Cromatografía de intercambio iónico de los extractos diafiltrados de <i>B. pinguin</i>	84
6.12	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (native-PAGE) de los extractos diafiltrados de <i>B. karatas</i> y <i>B. pinguin</i>	88
6.13	Efecto del DTT y el calor sobre las proteínas de los extractos diafiltrados de <i>B. karatas</i> y <i>B. pinguin</i>	89
	Etapa 2: Hidrólisis de las proteínas de cabeza de camarón	91
6.14	Actividad proteolítica de los extractos enzimáticos empleados en las hidrólisis	91
6.15	Concentración de las proteínas de camarón previo a la hidrólisis enzimática	91
6.16	Concentración de grupos $\alpha$ -NH <sub>2</sub>	92
6.17	Capacidad antioxidante por ABTS	95
6.18	Capacidad antioxidante por el método de FRAP	99
6.19	Condiciones óptimas de hidrólisis	101
	Etapa 3: Producción de hidrolizados de proteínas de la cabeza de camarón en las condiciones óptimas	107

6.20	Hidrólisis en condiciones óptimas	107
6.21	Separación de péptidos y oligopéptidos de los hidrolizados por exclusión molecular	108
6.21.1	Determinación de la concentración de grupos $\alpha$ -NH <sub>2</sub> de las fracciones	108
6.21.2	Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS de las fracciones	111
6.21.3	Determinación de la actividad antioxidante por el método FRAP de las fracciones	113
6.21.4	Análisis electroforético de los hidrolizados	113
CAPÍTULO 7.	CONCLUSIONES	116
CAPÍTULO 8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
CAPÍTULO 9.	ANEXOS	126
Anexo A.	Nomenclatura empleada para aminoácidos de polipéptidos	126
Anexo B.	Curvas de calibración	127
Anexo C.	ANOVA de la precipitación con sulfato de amonio	128
Anexo D.	Concentración de proteína del sustrato previa a la hidrólisis enzimática	131
Anexo E.	Análisis Taguchi L'16 para la concentración de grupos $\alpha$ -NH <sub>2</sub>	132

Anexo F.	Análisis Taguchi L'16 para capacidad antioxidante por ABTS	136
Anexo G.	Análisis Taguchi L'16 para capacidad antioxidante por FRAP	140
Anexo H	Electroforesis (SDS-PAGE) de los hidrolizados de la Etapa 2	144

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Principales estados productores de camarón	3
Figura 2.2	Producción de las principales especies de camarón en la zona de Sonora, Sinaloa y Nayarit	4
Figura 2.3	Clasificación de enzimas proteolíticas y conceptos empleados	15
Figura 2.4	Nomenclatura de sitios activos en proteasas	16
Figura 2.5	Fruto de <i>Bromelia pinguin</i>	21
Figura 2.6	<i>Bromelia pinguin</i>	22
Figura 2.7	Efecto del pH (a) y la temperatura (b) sobre la actividad proteolítica de pinguinain prepurificada en Unidades Caseinolíticas (Ucas)	27
Figura 2.8	Efecto de agentes reductores en la actividad proteolítica de la pinguinain prepurificada	28
Figura 2.9	Enfoque isoelectrico y zimograma de la pinguinain prepurificada	29
Figura 2.10	Electroforesis de fracción cromatográfica pI 7.4, pinguinain prepurificada y estándares de masa molar conocida	29
Figura 2.11	Fruto de <i>Bromelia karatas</i>	30

Figura 5.1	Diagrama de proceso de extracción y prepurificación de las proteasas	37
Figura 5.2	Diagrama de proceso de determinación de las condiciones de hidrólisis de los subproductos de camarón	49
Figura 5.3	Reacción de TNBS con un grupo amino primario	53
Figura 5.4	Estructura del complejo TPTZ-Fe	54
Figura 5.5	Oxidación de ABTS por persulfato de potasio para generar el radical catión ABTS <sup>•+</sup> y su reacción con un antioxidante (AOH)	55
Figura 5.6	Diagrama de proceso para la producción de hidrolizados en las condiciones óptimas y determinación de la capacidad antioxidante	57
Figura 6.1	Concentración de proteína en sobrenadante (—◆—), actividad proteolítica de sobrenadante (—■—) y actividad proteolítica de precipitado (▲) de extractos de <i>B. karatas</i> a diferentes concentraciones de sulfato de amonio.	62
Figura 6.2	Figura 6.1 Concentración de proteína en sobrenadante (—◆—), actividad proteolítica de sobrenadante (—■—) y actividad proteolítica de precipitado (▲) de extractos de <i>B. pinguin</i> a diferentes concentraciones de sulfato de amonio.	63
Figura 6.3	Conductividad del agua de diálisis	64
Figura 6.4	SDS-PAGE de extractos prepurificados de <i>B. karatas</i> y <i>B. pinguin</i> .	65
Figura 6.5	Cromatograma de la separación por exclusión molecular de los extractos enzimáticos diafiltrados de <i>B. karatas</i> .	67
Figura 6.6	SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular del extracto diafiltrado de <i>B. karatas</i> .	69
Figura 6.7	Cromatograma de la separación por exclusión molecular de los extractos enzimáticos diafiltrados de <i>B. pinguin</i> .	70
Figura 6.8	SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular del extracto diafiltrado de <i>B. pinguin</i> .	71

Figura 6.9	Cromatograma de la separación por exclusión molecular de los extractos enzimáticos diafiltrados de <i>B. karatas</i> con el coctel de inhibidores de proteasas cOplete.	73
Figura 6.10	SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular del extracto diafiltrado de <i>B. karatas</i> .	74
Figura 6.11	Cromatograma de la separación por exclusión molecular de los extractos enzimáticos diafiltrados de <i>B. pinguin</i> con el coctel de inhibidores de proteasas cOplete.	76
Figura 6.12	SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular del extracto diafiltrado de <i>B. pinguin</i> .	77
Figura 6.13	SDS-PAGE semidesnaturalizante (a) y zimograma (b) comparando la inhibición de extractos diafiltrados de <i>B. pinguin</i> y <i>B. karatas</i> .	79
Figura 6.14	Isoelectroenfoque.	80
Figura 6.15	Cromatografía de intercambio aniónico <i>B. karatas</i> con el nuevo gradiente de NaCl para mejorar la separación de las proteínas.	81
Figura 6.16	Seminative-PAGE y zimograma de las fracciones obtenidas a partir de la cromatografía de intercambio aniónico de los extractos diafiltrados de <i>B. karatas</i> .	82
Figura 6.17	Isoelectroenfoques de las fracciones obtenidas por intercambio iónico de los extractos diafiltrados de <i>B. karatas</i> .	83
Figura 6.18	Cromatografía de intercambio aniónico <i>B. pinguin</i> con el nuevo gradiente de NaCl para mejorar la separación de las proteínas.	84
Figura 6.19	Seminative-PAGE y zimograma de las fracciones obtenidas a partir de la cromatografía de intercambio aniónico de los extractos diafiltrados de <i>B. pinguin</i> .	85
Figura 6.20	Isoelectroenfoque de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico del fruto de <i>B. pinguin</i> .	86
Figura 6.21	Ejemplo de hidrólisis con proteasas de sitios de corte distintos	87

Figura 6.22	Native-PAGE en gel homogéneo 20% de los extractos diafiltrados.	88
Figura 6.23	SDS-PAGE y zimograma para comprobar el efecto del DTT sobre las proteínas presentes en los extractos diafiltrados de <i>B. karatas</i> y <i>B. pinguin</i> .	90
Figura 6.24	Efecto de la cantidad de sustrato y el pH sobre la concentración de proteína total.	92
Figura 6.25	Gráfica para determinar el nivel óptimo del factor tiempo en los hidrolizados con <i>B. karatas</i> .	103
Figura 6.26	Gráfica para determinar el nivel óptimo del factor cantidad de enzima en los hidrolizados con <i>B. karatas</i> .	104
Figura 6.27	Gráfica para determinar el nivel óptimo del factor pH en los hidrolizados con <i>B. pinguin</i> .	106
Figura 6.28	Separación por medio de exclusión molecular de los oligopéptidos y péptidos de los hidrolizados obtenidos en condiciones óptimas empleando: a) extractos enzimáticos de <i>B. karatas</i> ; a) extractos enzimáticos de <i>B. pinguin</i> ; y c) bromelina. Comparación de la absorbancia a 280nm con la concentración de grupos $\alpha$ -NH <sub>2</sub> (mM L-Leucina).	110
Figura 6.29	Separación por medio de exclusión molecular de los oligopéptidos y péptidos de los hidrolizados obtenidos en condiciones óptimas empleando: a) extractos enzimáticos de <i>B. karatas</i> ; a) extractos enzimáticos de <i>B. pinguin</i> ; y c) bromelina. Comparación de la absorbancia a 280nm con la actividad antioxidante por el método ABTS.	112
Figura 6.30	Electroforesis Tricine-SDS-PAGE (16.5%T, 5%C) de las fracciones de los hidrolizados producidos en condiciones óptimas empleando: a) extractos enzimáticos de <i>B. karatas</i> ; b) extractos enzimáticos de <i>B. pinguin</i> ; y c) bromelina.	114

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 2.1	Composición proximal de camarón crudo	5
Cuadro 2.2	Composición proximal de subproductos de cabeza de camarón	7
Cuadro 2.3	Péptidos bioactivos obtenidos por hidrólisis de subproductos marinos	11
Cuadro 2.4	Número de EC de cada tipo de peptidasa	17
Cuadro 2.5	Caracterización fisicoquímica del fruto de <i>Bromelia pinguin</i>	24
Cuadro 2.6	Actividad antibacterial de los extractos del fruto de <i>Bromelia pinguin</i>	25
Cuadro 2.7	Parámetros bromatológicos de <i>Bromelia karatas</i>	31
Cuadro 2.8	Capacidad antioxidante de los jugos de pulpa de <i>Bromelia karatas</i>	32
Cuadro 5.1	Tratamientos generados en el diseño robusto de Taguchi L <sub>16</sub>	51
Cuadro 6.1	Concentración de $\alpha$ -NH <sub>2</sub> en hidrolizados de cabeza de camarón por efecto de pH, temperatura, tiempo, cantidad de sustrato y cantidad de enzima.	94
Cuadro 6.2	Capacidad antioxidante por el método ABTS en hidrolizados de cabeza de camarón por efecto de pH, temperatura, tiempo, cantidad de sustrato y cantidad de enzima.	97
Cuadro 6.3	Capacidad antioxidante por el método FRAP en hidrolizados de cabeza de camarón por efecto de pH, temperatura, tiempo,	100

cantidad de sustrato y cantidad de enzima.

Cuadro 6.4	Valores óptimos obtenidos en el análisis de Taguchi L'16 de los hidrolizados con <i>B. karatas</i>	102
Cuadro 6.5	Valores óptimos obtenidos en el análisis de Taguchi L'16 de los hidrolizados con <i>B. pinguin</i>	105
Cuadro 6.6	Valores óptimos obtenidos en el análisis de Taguchi L'16 de los hidrolizados con bromelina	107

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La producción de camarón a nivel mundial fue de aproximadamente 3.5 millones de toneladas según lo reportado en el 2010 de los cuales únicamente el 65% es considerado camarón de consumo y el resto es desechado como subproducto junto con la masa no recuperable compuesta por el cefalotórax y la cabeza, donde este último subproducto representa entre el 35% y 45% del peso del camarón. Para aprovechar los compuestos presentes en este residuo (proteína, quitina y astaxantina) se han implementado nuevos métodos como lo es la hidrólisis enzimática empleando proteasas.

La hidrólisis de residuos con alto contenido de proteína por vía enzimática ha sido empleada por varios autores debido a que presenta la ventaja de generar durante este proceso secuencias de aminoácidos relativamente cortas (oligopéptidos y péptidos), los cuales; son absorbidos con mayor facilidad durante el proceso de digestión por lo que pueden ser empleados como suplementos alimenticios en dietas humanas y animales. Además, se ha observado que algunos péptidos pueden presentar funciones biológicas inhibiendo algunas enzimas promoviendo a la disminución de hipertensión (ACE-I), y control en la absorción de la glucosa (DPP-IV y Amilasa) entre otras.

En este trabajo se propone el aprovechamiento de los residuos de camarón sometiendo a hidrólisis enzimática las proteínas de la cabeza de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) empleando extractos prepurificados de enzimas proteolíticas de los frutos de *Bromelia karatas* y *Bromelia pinguin* determinando la capacidad antioxidante (ABTS y FRAP) de los hidrolizados producidos. Además de una estimación del peso molecular de las fracciones de los hidrolizados por medio de una Tricine-SDS-PAGE.

## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

### **2.1 Producción de camarón**

El camarón es un crustáceo del orden de los decápodos, suelen ser transparentes, rosados o castaño. Su producción a nivel mundial en la modalidad de captura en el año 2010 fue de aproximadamente 3.5 millones de Ton.

La Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca reportó en el Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca del 2011 que el camarón es la especie que ocupa el 2do lugar de la producción pesquera en México con un volumen de 184,123 Ton. Sin embargo, por su valor económico, ocupa el 1er lugar con valor de \$7,696,814,000. Además es la especie pesquera con mayor exportación, siendo Estados Unidos de América, Japón y Francia sus principales destinos.

En 2013, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) a través de la Comisión Nacional de Agricultura y Pesca (CONAPESCA) reportó que a nivel nacional se produjeron un total de 127,516.78 Ton con un valor equivalente de 7,500 millones de pesos.

El 75% del camarón a nivel Nacional es producido por la zona conformada por los estados de Sinaloa, Sonora y Nayarit (fig. 2.1).

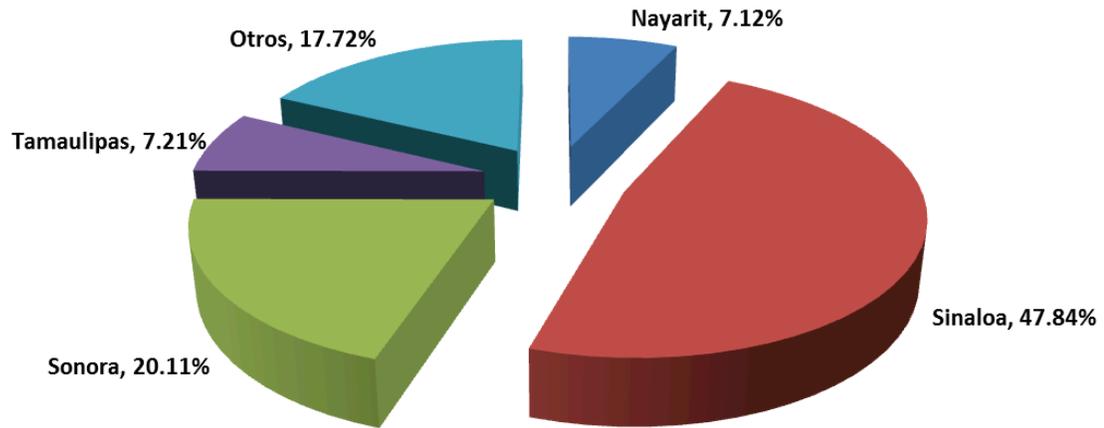


Figura 2.1 Principales estados productores de camarón. (CONAPESCA-SAGARPA, 2013)

En México, las principales especies cultivadas son el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, aunque otras especies de camarón del Pacífico también se cultivan como el camarón azul *Litopenaeus stylirostris* y camarón café *Farfantepenaeus californiensis*, pero en menor proporción (Ponce-Palafox y cols., 2011). Específicamente en la zona conformada por los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit se producen las dos primeras especies mencionadas (fig. 2.2) (CONAPESCA-SAGARPA, 2013).

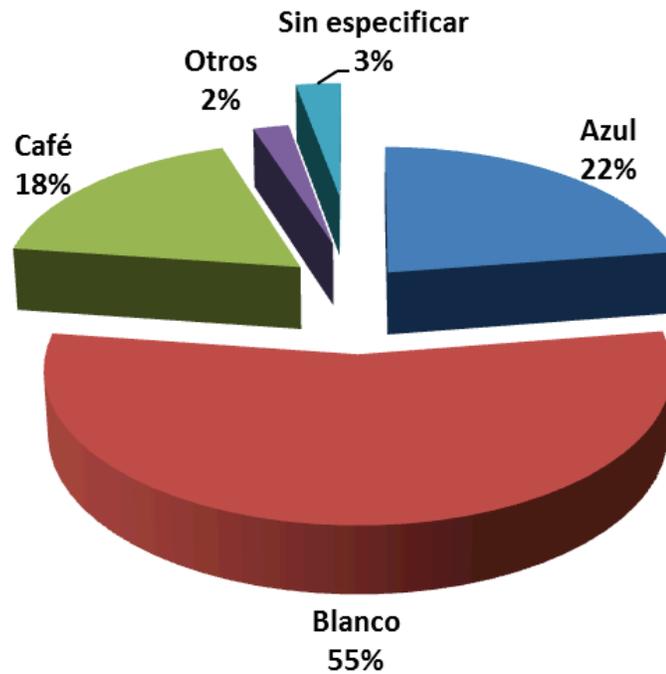


Figura 2.2 Producción de las principales especies de camarón en la zona de Sonora, Sinaloa y Nayarit. (CONAPESCA-SAGARPA, 2013)

### 2.2 Camarón y composición proximal

Simpson y cols. (1998) presentaron la composición proximal de la carne de camarón de manera fresca y congelada, mismos que se muestran en el Cuadro 2.1, donde se destaca la concentración de proteína.

Cuadro 2.1 Composición proximal de camarón crudo

Parámetro	kcal/ 100g	kJ/ 100g	
Energía	90	377	
	g/100g	Minerales	mg/100 g
Humedad	78.20	Calcio	63.00
		Fósforo	230.00
	mg/100 g	Hierro	1.60
Fibra dietética	0.00	Magnesio	42.00
Carbohidratos	1.50	Sodio	140.00
Proteínas	18.10	Potasio	220.00
Lípidos totales	1.30	Zinc	1.50
		Vitaminas	
Ácidos Grasos	mg/100 g		µg/100 g
Saturados	0.40	Vitamina A	12.00
Monoinsaturados	0.30		
Poliinsaturados	0.30		mg/100 g
Linolénico	0.01	Ác. Ascórbico	0.00
Docosahexanóico	0.10	Tiamina	0.02
Colesterol	128.00	Riboflavina	0.03
		Niacina	3.20

Muñoz de Chávez y cols., 2010

Solo el 40% (w/w) del camarón crudo es comestible, ya que la cabeza y el cefalotórax son desechados y considerados como subproductos de camarón junto con el 35% de los camarones que no son considerados para consumo. (Muñoz de Chávez y cols., 2010; Bueno-Solano y cols., 2009)

Dentro de los mencionados subproductos de la industria procesadora de camarón, el principal material de desecho es la cabeza, que constituye aproximadamente el 35-45% del peso del camarón completo (Cao y cols., 2008).

Madhu Babu y cols. (2008) realizaron análisis proximales a cabezas de cuatro especies de camarón obtenidas como subproductos, los cuales se presentan en el Cuadro 2.2, donde resalta la presencia de quitina, carotenoides y proteínas en las cabezas de las cuatro especies analizadas, además destacando la especie *Penaeus monodon* de cultivo con una mayor concentración de proteína que el resto de las especies, esto posiblemente debido a que en la modalidad por cultivo se controlan los factores que intervienen en el crecimiento de estos crustáceos siendo uno de estos factores la alimentación.

Cuadro 2.2 Composición proximal de subproductos de cabeza de camarón (g/100g)

Parámetro	<i>Penaeus monodon</i> (Silvestre)	<i>Penaeus indicus</i>	<i>Metapenaeus monocerous</i>	<i>Penaeus monodon</i> (Cultivo)
Humedad	67.4±4.6	73.6±1.0	75.8±0.6	77.0±2.3
Proteína	11.3±1.1	12.3±1.0	11.2±1.9	13.7±0.4
Quitina	2.9±0.2	2.5±0.3	1.7±0.6	2.5±0.8
Grasa	1.2±0.4	1.5±0.3	1.5±0.5	1.7±0.4
Carotenoides (µg/g)	50.2±8.5	37.2±7.5	34.1±8.5	24.3±5.5
Cenizas	9.1±0.8	7.1±0.3	10.5±1.5	6.0±1.0
CAI*	1.2±0.1	1.1±0.1	1.3±0.9	1.1±0.1

Media±SD (n=10); CAI\*  
Cenizas Ácidas Insolubles  
Madhu Babu y cols., 2008

Las proteínas juegan un papel central en los sistemas biológicos y abarcan todo tipo de funciones: estructura, transporte, motilidad, defensa, reconocimiento, almacenamiento y la función catalítica que llevan a cabo las enzimas (Badui Dergal, 2006). La diversidad funcional de las proteínas se debe especialmente a su composición química, ya que son polímeros muy complejos, constituidos por hasta 20 aminoácidos distintos (Fennema, 2000).

Los aminoácidos ( $\alpha$ -aminoácidos) son las unidades más simples de la estructura química común a todas las proteínas y constituyen los eslabones que conforman péptidos los cuales al formar cadenas polipeptídicas y alcanzar altos pesos moleculares se denominan proteínas (Badui Dergal, 2006).

En los sistemas biológicos se producen diversas modificaciones enzimáticas de las proteínas. Estas modificaciones se pueden agrupar en: glicosilación, hidroxilación, fosforilación, metilación, acilación y entrecruzamiento; que permiten mejorar sus propiedades funcionales (Fennema, 2000).

Otra modificación es la hidrólisis de las proteínas con proteasas, como pepsina (EC 3.4.23.1), tripsina (EC 3.4.21.4), papaína (3.4.22.2), etc., proceso que modifica sus propiedades funcionales produciendo péptidos de bajo peso molecular, formados por 2-4 residuos (Fennema, 2000); estos péptidos de bajo peso molecular presentan dentro de sus características una mejor digestibilidad (Armenta y Guerrero-Legarreta, 2009), además de una posible bioactividad como ha sido reportado en diversos trabajos (Katano y cols., 2013; Hai-Lun y cols., 2006; Tsai y cols., 2008; Je y cols., 2007; Lee y cols., 2010; Suetsuna, 2000; Mendis y cols., 2005).

Las proteínas de la cabeza de camarón han adquirido un gran interés, principalmente para el empleo de hidrolizados como saborizantes en alimentos a base de pescado, elaboración de alimentos para acuicultura, elaboración de medios de cultivo para microorganismos y para la obtención de péptidos bioactivos (Cao y col., 2014).

Así mismo se ha buscado el aprovechamiento de quitina y carotenoides, encontrándose estos últimos en forma de complejos caroteno-proteínas con pesos moleculares de 120 a 280 kDa (Cao y cols., 2008; Armenta y Guerrero-Legarreta, 2009).

Para el aprovechamiento de los compuestos presentes en la cabeza del camarón se han empleado métodos químicos, como el empleado comúnmente para la recuperación de quitina el cual implica el uso de álcalis para la desproteización y ácidos para la desmineralización. A pesar de ser este un proceso eficiente para el aislamiento de quitina, es ecológicamente agresivo y no permite el aprovechamiento de las proteína y los carotenoides (Bhaskar y cols., 2007), por lo que se han propuesto métodos más efectivos para el aprovechamiento integral de los compuestos de la cabeza del camarón, como la fermentación y métodos enzimáticos (Bhaskar y cols., 2007; Bueno-Solano y cols., 2009).

En el caso de los métodos enzimáticos se han hidrolizado proteínas empleando enzimas endógenas en un proceso denominado autólisis (Cao y cols., 2008; Cao y cols., 2009). Sin embargo, muchas de estas enzimas se encuentran inactivas durante la autólisis debido a que se encuentran como zimógenos u otras formas inactivas, lo que implica que la autólisis sea lenta y poco eficiente (Cao y cols., 2014).

Por lo anterior se ha buscado el empleo de enzimas proteolíticas endógenas, las cuales permiten la recuperación de aproximadamente el 80% de las proteínas y carotenoides de la cabeza de camarón (Armenta y Guerrero-Legarreta, 2009). Algunas enzimas proteolíticas que han sido empleadas para la hidrólisis de las proteínas de la cabeza de camarón son la alcalasa, tripsina, pepsina y papaína (Madhu Babu y cols., 2008; Cao y cols., 2014). Gildberg y Stenberg (2001) reportaron que por cada kg de quitosano producido se desperdician 3kg de proteína potencialmente hidrolizada que puede recuperarse con un tratamiento de proteasas como alcalasa y obteniendo productos aprovechables como péptidos bioactivos.

### **2.3 Obtención de péptidos bioactivos**

Así mismo, se han empleado enzimas proteolíticas para hidrolizar subproductos y productos de otras industrias. Una de estas industrias es la industria de lácteos en la cual se ha empleado ampliamente la hidrólisis proteolítica para modificar las propiedades de solubilidad, formación de espuma, emulsificación y gelificación de las proteínas de suero de leche, además en las últimas décadas se han realizado investigaciones para el desarrollo de péptidos bioactivos e hidrolizados de proteínas para su uso en alimentos funcionales y nutraceuticos. Una de las ventajas de los hidrolizados es que los pequeños péptidos se absorben más rápidamente en el intestino que los aminoácidos libres o proteínas intactas, además que éstos pueden presentar propiedades biológicas (Spellman y cols., 2009; Cheung y Li-Chan, 2014).

También los hidrolizados de proteínas extraídas de los subproductos marinos se han hecho populares en la industria de alimentos debido al alto contenido de proteínas (Bueno-Solano y cols., 2009). Los hidrolizados de proteínas de fuentes de mariscos infravaloradas y subproductos de varias especies marinas han sido analizados por sus propiedades

nutritivas y funcionales, explorado la posibilidad de obtener péptidos biológicamente activos (péptidos bioactivos), pero una desventaja de estos es que la hidrólisis enzimática con frecuencia libera péptidos con sabor desfavorable limitando las posibilidades de comercialización (Kim y Mendis, 2006; Cheung y Li-Chan, 2014).

Los péptidos bioactivos son fragmentos específicos de proteínas que además de actuar como fuentes de nitrógeno y aminoácidos tienen numerosas potenciales funciones fisiológicas en el cuerpo, los cuales incluyen inmunomodulador, anti-bacteriano, antitrombótico y actividad antihipertensiva. En general, los péptidos biofuncionales varían en tamaño de 2 a 20 residuos de aminoácidos (Harnedy y FitzGerald, 2012).

Las actividades biológicas de los péptidos generados a partir de una proteína particular, depende de dos factores: la secuencia primaria de la proteína sustrato y la especificidad de la enzima empleada para generar tales péptidos (Harnedy y FitzGerald, 2012).

Los péptidos producidos en hidrolizados enzimáticos de proteínas han mostrado diferentes propiedades físicoquímicas y actividades biológicas en función de sus pesos moleculares y secuencias de aminoácidos (Kim y Mendis, 2006). Es por ello que se han correlacionado los perfiles de tamaño de péptidos con las propiedades antigénicas y funcionales de diferentes hidrolizados de proteínas (Silvestre, 1997). Algunos péptidos bioactivos obtenidos a partir de productos marinos se resumen en el Cuadro 2.3.

Cuadro 2.3 Péptidos bioactivos obtenidos por hidrólisis de subproductos marinos

Actividad biológica	Origen	Secuencia*	Fuente
ACE inhibitoria	Ostra ( <i>Pinctada fucata martencii</i> )	FY	Katano y cols., 2003
		AW	
		VW	
		GW	
ACE inhibitoria	Camarón ( <i>Acetes chinensis</i> )	FCVLRP	Hai-Lun y cols., 2006
		IFVPAF	
		KPPETV	
		YLLF	
		AFL	
ACE inhibitoria	Almeja ( <i>Meretrix lusoria</i> )	VRK	Tsai y cols., 2008
		YN	
Antihipertensivo	Atún	GDLGKTTTVSNWSPPKYKDTP	Lee y cols., 2010
Antioxidante	Atún	VKAGFAWTANQQLS	Je y cols., 2007
Antioxidante	Gamba ( <i>Penaeus japonicus</i> )	IKK	Suetsuna, 2000
		FKK	
		FIKK	
Antioxidante	Calamar ( <i>Dosidicus gigas</i> )	FDSGPAGVL	Mendis y cols., 2005
		NGPLQAGQPGER	

\*Aminoácidos en código de una letra (Anexo A)

Para estas correlaciones se ha empleado la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodesil sulfato sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) como un método simple y rápido para la determinación del peso molecular, siendo algunos métodos alternativos la filtración en gel y cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC) (Silvestre, 1997).

Péptidos bioactivos derivados de proteínas de la leche pueden funcionar como sustancias reguladoras exógenas con actividad similar a una hormona en diferentes sitios diana intestinales y periféricas del organismo mamífero. Algunos de los péptidos derivados de proteínas de la leche han mostrado actividad hipertensiva, como los tripéptidos: valil proлил-prolina (VPP) y isoleucil-proлил-prolina (IPP) (Dimitrov, 2012).

Los hidrolizados de proteínas estructurales de varios residuos del procesamiento de productos marinos, moluscos y crustáceos han mostrado una potente actividad inhibidora *in vitro* de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Algunas proteínas incluidas son las proteínas estructurales de bacalao y atún, el krill, el mejillón, la ostra, proteínas de músculo y el cefalotórax de camarón, entre otras (Harnedy y FitzGerald, 2012).

Además se ha observado que los residuos cargados positivamente están asociados con la actividad antimicrobiana. Los residuos de aminoácidos como histidina, leucina, tirosina, metionina y cisteína se asocian con la actividad de secuestro y/o inhibición de radicales mientras que los aminoácidos hidrófobos (como prolina y hidroxiprolina) juegan un papel en la inhibición de la peroxidación lipídica (Harnedy y FitzGerald, 2012).

Esto último es de gran importancia ya que todos los seres vivos llevan a cabo procesos vitales de oxidación, como la respiración, durante los cuales se generan especies reactivas de oxígeno (ERO, o ROS por sus siglas en inglés) y nitrógeno (ERN) (Huang y cols., 2005). Estas especies reactivas también son conocidas como radicales libres y pueden ser eliminadas por un mecanismo de enzimas endógenas (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) (Dimitrios, 2006; Wang y cols., 2008), sin embargo si aumenta la generación de radicales libres puede generarse un desequilibrio resultando en daños sobre las proteínas, DNA, fosfolípidos de la membrana celular y lipoproteínas de baja densidad

LDL (Philanto, 2006). Esto se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades como la arteroesclerosis, artritis, diabetes y cáncer (Dávalos y cols., 2004). Por lo anterior que se ha buscado la producción y obtención de antioxidantes naturales que permitan inhibir o contrarestrar el desequilibrio electrónico que los ERO's y ERN's pueden ejercer sobre las células (Di Bernardini y cols., 2011).

Una de las bioactividades presentadas por algunos péptidos es la de presentar actividad antioxidante, que consiste en la capacidad de interactuar y eliminar radicales libres evitando que estos provoquen los daños antes mencionados (Sarmadi y Ismail, 2010).

Como mecanismos de acción de los péptidos bioactivos se ha propuesto que estos pueden inducir al hígado a que sintetice el tripeptido Cisteína-Ácido glutámico-Glicina (Cys-Glu-Gly) el cual puede actuar directamente con las ERO's o actuar como sustrato de la glutatión peroxidasa en la conversión de peróxido de hidrógeno en agua (Power y cols., 2013). También se ha propuesto como mecanismo que los péptidos pueden intervenir en las cadenas de señalización para la inducción de síntesis de las enzimas endógenas del mecanismo natural antioxidantes mencionados anteriormente (Wang y cols., 2008; Young y cols., 2011).

Así mismo se ha investigado la interacción directa entre los péptidos bioactivos antioxidantes y los radicales libres, para lo cual se han empleado modelos conocidos como relación cuantitativa de estructura y actividad o QSAR (Quantitative structure-activity relationship) por sus siglas en inglés (Yao-wang, y cols., 2011; Yao-wang y Bo, 2013). En el caso de los péptidos con capacidad antioxidante se ha observado una correlación con las propiedades de los aminoácidos principalmente del C-terminal y en menor medida con el N-terminal (Yao-wang y Bo, 2013). Otras conclusiones a las que se han llegado con estos estudios son (Sarmadi y Ismail, 2010):

- a) Los aminoácidos aromáticos en los péptidos permiten estabilizar los radicales por medio de sus estructuras resonantes.
- b) Los aminoácidos hidrofóbicos en los péptidos pueden donar protones hidrógeno ( $H^+$ ) a los radicales hidrofóbicos.

- c) Los aminoácidos ácidos y básicos pueden donar  $H^+$  de sus grupos carbonilo y amino además que éstos permiten que estos presenten la capacidad de quelar metales.
- d) La cisteína en los péptidos permite evitar la oxidación de los tejidos por la presencia de su grupo sulfhidrilo (-SH) con un mecanismo similar al del glutatión.

Guerard y cols. (2007) quienes emplearon alcalasa para la hidrólisis de subproductos de camarón (cefalotórax y cabeza) obteniendo péptidos de bajo peso molecular capaces de inhibir el radical DPPH.

Para la obtención de diversos péptidos bioactivos las enzimas que se encargan de hidrolizar las proteínas son de vital importancia, por ello; es necesario que se busquen fuentes alternas a las más conocidas que permitan la obtención de estos péptidos con propiedades potenciales de ser utilizadas. En ese sentido se han comenzado a obtener diversas proteasas a partir de plantas que han sido menos explotadas y que se describen en el siguiente apartado.

#### **2.4 Proteasas**

Las enzimas que desempeñan la degradación de las proteínas se conocen como “proteasas” o “enzimas proteolíticas”, las cuales fueron distinguidas por Grassmann y Dyckerhoff (1928) como “proteinasas” para las enzimas que actúan sobre proteínas y “peptidasas” a las enzimas proteolíticas que actúan preferentemente sobre oligopéptidos. Así mismo, se han adoptado diversos conceptos para referirse a las enzimas proteolíticas, mismos que se resumen en la fig. 2.3, sin embargo la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) recomienda el uso de los términos “peptidasa” para referirse a las enzimas proteolíticas en general, “endopeptidasa” para referirse a aquellas peptidasas que actúan preferentemente en regiones lejanas de los extremos y “exopeptidasa” para referirse a aquellas peptidasas que actúan cerca de los aminoácidos N- o C-terminal (Beynon y Bond, 2001).

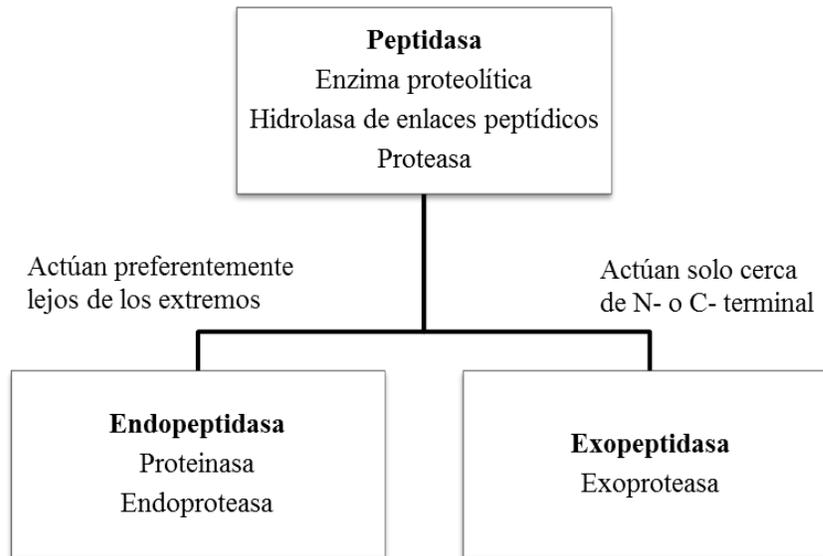


Figura 2.3 Clasificación de enzimas proteolíticas y conceptos empleados (Beynon y Bond, 2001)

Schechter y Berger (1967), propusieron una terminología en la cual la zona de unión del sitio activo puede ser dividida en subsitios o sitios específicos (S) que están ubicados a ambos lados del sitio catalítico y son numerados correlativamente, ya sea en dirección al extremo N-terminal (S1, S2, S3, etc.) o hacia el C-terminal (S'1, S'2, S'3, etc.); mientras que los aminoácidos (P) del sustrato que interactúa con la proteasa son numerados respectivamente (P1, P2, P'1, P'2, etc.), como se muestra en la fig. 2.4 (Caffini y cols., 1988).

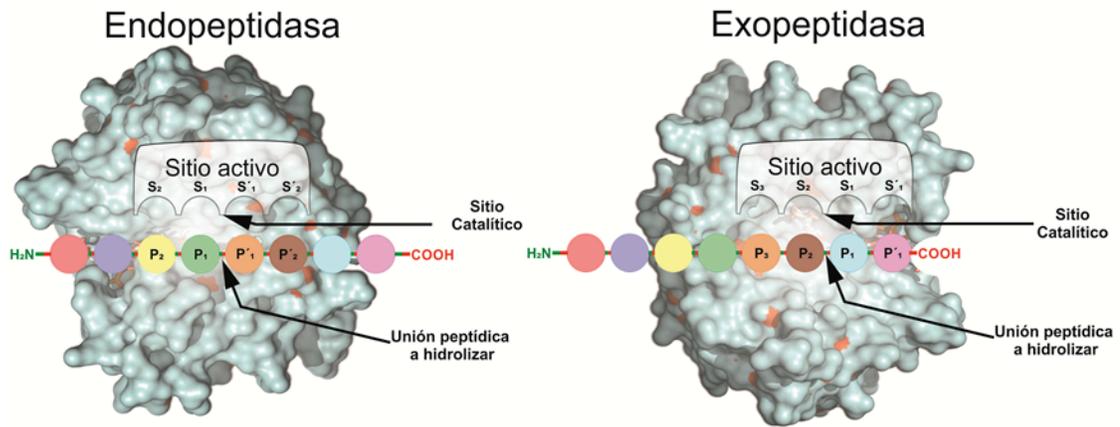


Figura 2.4 Nomenclatura de sitios activos en proteasas basada en lo reportado por Caffini y cols. (1988).

Las enzimas proteolíticas son agrupadas de acuerdo a la naturaleza química de los sitios catalíticos, siendo Hartley (1960) el primero en clasificarlas reconociendo cuatro tipos de sitios catalíticos (peptidasas tipo serín, cisteín, aspartic y metalo). Actualmente la Comisión de Enzimas (EC) del Comité de Nomenclatura del IUBMB clasifica las peptidasas como se muestra en el Cuadro 2.4 (Beynon y Bond, 2001).

En las peptidasas con Ác. aspártico y metalopeptidasas el nucleófilo del sitio catalítico es una molécula de agua activada a diferencia de las peptidasas con serina, treonina y cisteína en las que el nucleófilo del sitio catalítico es parte de un aminoácido. En las cisteína peptidasas el nucleófilo es el grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína. La mayoría de cisteína peptidasas pertenecen a la familia de la papaína, incluidos los de *Bromeliaceae*, dentro de las que se incluyen a la pinguinain y karatasin, obtenidas de los frutos de *B. pinguin* y *B. karatas*, respectivamente (López y cols., 2000).

Cuadro 2.4 Número de EC de cada tipo de peptidasa

Número	Tipo de Exopeptidasas	Número	Tipo de Endopeptidasas
3.4.11	Aminopeptidasas	3.4.21	Serín endopeptidasas
3.4.13	Dipeptidasas	3.4.22	Cisteín endopeptidasas
3.4.14	Dipeptidil-peptidasas	3.4.23	Aspartic endopeptidasas
3.4.15	Peptidil-peptidasas	3.4.24	Metaloendopeptidasas
3.4.16	Tipo Serine carboxipeptidasas	3.4.99	Endopeptidasas tipo
3.4.17	Metalocarboxipeptidasas		desconocido
3.4.18	Tipo cisteín carboxipeptidasas		
3.4.19	Omega peptidasas		

Beynon y Bond, 2001

Diversos estudios han mostrado como las enzimas proteolíticas pueden decrecer significativamente cierto tipo de tumores, como la serín proteasa purificada de la lombriz india (*Pheretima posthuma*) que presenta un IC<sub>50</sub> de 263.14 µg/ml en células de cáncer mamario MCF-7 (Verma y cols., 2013) y como la bromelina de la piña (EC 3.4.22.32), la cual posee un potente efecto anticancerígeno, debido a la propiedad de autofagia inducida de la bromelina contra células de carcinoma mamario. Además, otros autores señalan que la bromelina de la piña tiene cualidades medicinales que incluyen funciones antiinflamatorias, antitrombóticas, fibrinolíticas y anticancerígenas (Hornung-Leoni, 2011a).

Además, la aplicación de las enzimas en la industria de los alimentos se ha convertido en una parte importante e indispensable para producir una amplia y diversificada gama de productos para el consumo humano y animal. Esto se debe a la naturaleza altamente específica de las enzimas y a su alta actividad en concentraciones muy bajas. En

condiciones suaves de pH y temperatura resultan con menos efectos secundarios no deseados en el proceso de producción en subproductos (Shahidi y Kamil, 2001).

Específicamente las proteasas son empleadas para hidrolizar proteínas generando una disminución del tamaño, por lo que los hidrolizados son una fuente de aminoácido más disponible para la biosíntesis de proteínas. Éstos hidrolizados tienen una variedad de aplicaciones en una diversidad de industrias, incluyendo la farmacéutica, nutrición humana, nutrición animal y cosméticos (Bueno-Solano y cols., 2009).

### **2.5 Obtención de proteasas cisteínicas de origen vegetal**

Las proteasas vegetales están involucradas en muchos aspectos de la fisiología de las plantas y su desarrollo, jugando un papel fundamental en procesos como la rotación de proteínas, la movilización de proteínas de reserva durante la germinación de la semilla, la senescencia y la modificación postraduccional de proteínas por proteólisis limitada en los sitios altamente específicos. La mayoría de estas proteasas han sido clasificadas como cisteín proteasas y, algunas como aspártico proteasas (González y cols., 2011).

La mayoría de las proteasas cisteínicas de interés práctico se obtienen de plantas, principalmente de la familia de las Bromeliáceas y de las Caricáceas, como la bromelina extraída de la piña (*Ananas comosus*) (Clavijo y cols., 2012), papaína extraída de la papaya (*Carica papaya*) (Monti y cols., 2000) y la hemisfericina extraída de *Bromelia hemisphaerica* (Reyes N., 2010).

Las bromelias son plantas herbáceas, terrestres, litófitas, que crecen sobre piedras, o bien son epífitas, que se desarrollan sobre árboles que reciben el nombre de forófitos (huésped) y del cual no se obtienen los nutrientes directamente (Mondragón Chaparro y cols., 2011).

Estas se distribuyen principalmente en el Neotrópico abarcando diversos tipos de vegetación y altitudes desde nivel del mar hasta 4000 msnm (Hornung-Leoni, 2011a).

La familia de *Bromeliaceae* se conforma por casi 3,086 especies en 56 géneros, siendo México un centro de diversificación de grupos de bromelias, registrando 18 géneros y 342 especies (Castillo y cols., 2010).

Esta familia se ha dividido tradicionalmente en tres subfamilias: Pitcairnioideae, Bromelioideae y Tillandsioideae (Espejo Serna y cols., 2010). Sin embargo, esta clasificación de la familia ha sido cuestionada según Givnish y cols. (2007) la evidencia que proporcionan los datos moleculares (región cloroplástica ndhF) permite reconocer ocho clados (grupo de organismos con similitud genética), incluyendo a las subfamilias Tillandsioideae y Bromelioideae como monofiléticas (pertenecientes al mismo grupo), pero a Pitcairnioideae como parafilética (exclusiva de un grupo distinto); es por lo anterior que se propuso la descripción de cuatro nuevas subfamilias (Brochinioideae, Lindamnioideae, Hechtioideae y Puyoideae), así como la recircunscripción de Pitcairnioideae y Naviodeae (Gomes-da-Silva y Ferreira, 2013).

Usualmente presentan una forma arrosetada y sin tallo, con inflorescencias que generalmente emergen del centro de la roseta y rara vez de las axilas de las hojas. Las flores y los frutos presentan colores muy vistosos y, por lo general, son de larga duración (Mondragón Chaparro y cols., 2011).

Otra característica única de la familia son los tricomas foliares peltados visibles en forma de un manto aterciopelado de color grisáceo presente en especies que ocupan hábitats extremadamente secos y con altas radiaciones solares. Estos tricomas también se observan en las brácteas de la inflorescencia y en algunas estructuras florales, se especializan en la captura de agua y nutrimentos de la lluvia, del rocío o de la escorrentía por las ramas de sus forofitos, para transportarla a sus tejidos internos para la ejecución de sus funciones vitales (Mondragón Chaparro y cols., 2011).

Las *Bromeliaceae* son una familia conocida particularmente por frutos comestibles como la piña, *Ananas comosus* L., fruto sudamericano que se dio a conocer en Europa luego del viaje de Cristóbal Colón, la cual por su similitud con el fruto de los pinos se le denominó “pineapple” (Hornung-Leoni, 2011a).

Sin embargo, presentan usos muy variados en Latinoamérica, empleándose como ornamental, medicinal, fines alimenticios, decorativos y ceremonial, así como para la elaboración de bebidas, obtención de fibras, sustituto del café, relleno de cojines, instrumento musical, decoración de piñatas y lava trastes (Hornung-Leoni, 2011a).

Además, son un importante recurso de proteínas como fruta fresca, bebidas y vegetales, siendo una fuente natural rica en proteasas potenciales para usos medicinales como es el caso de las denominadas “bromelina de tallo” y “bromelina de fruto” obtenidas a partir de *Ananas comosus*. La bromelina extraída de la piña, es una enzima que se ha convertido en producto farmacéutico popular con propiedades medicinales como digestivo y contra parásitos intestinales (Hornung-Leoni, 2011a).

Así mismo se han aislado y caracterizado proteasas a partir de las frutas de *Bromelia pinguin*, *B. hemispherica*, *B. palmeri* y *B. sylvestris*, *B. plumieri*, *B. hieronymi*, y *macrodon* *Pseudananas* (López y cols., 2000).

### **2.6 *Bromelia pinguin***

La planta *Bromelia pinguin* L. se distribuye en el Neotrópico, desde las Antillas y norte de México hasta las Guayanas y Ecuador, donde se emplea como cercas vivas para separar linderos y es conocida por los nombres comunes guamara, conquistle, muta, maya, piñuela y piña de ratón, entre otros (Espejo Serna y cols., 2010; Pío León y cols., 2009).

En Tamaulipas, México, se emplea la raíz y el fruto para hacer bebidas y, para la elaboración de dulces y medicinas, la flor y semillas; mientras que en Puerto Rico, el eje de la inflorescencia se consume como vegetal fresco o cocinado (Hornung-Leoni, 2011b).



Figura 2.5 Fruto de *Bromelia pinguin* (Hornung-Leoni, 2011b)

Estudios realizados a los extractos de las hojas y frutos, mostraron que éstos no presentan propiedades antimicrobianas, sin embargo; los frutos son empleados en la medicina tradicional como antihelmíntico (antiparasitario), posiblemente por la presencia de una mezcla de cisteín endopeptidasas llamadas “pinguinain”. También el jugo ha sido empleado contra los tricocéfalos y otros parásitos similares, así como diurético y antirreumático; mientras que, en forma de cataplasma, se emplea para dislocaciones y fracturas.

Por otro lado se ha demostrado que presentan actividad contra bacterias patógenas como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia* y *Pseudomonas* (Hornung-Leoni, 2011a).

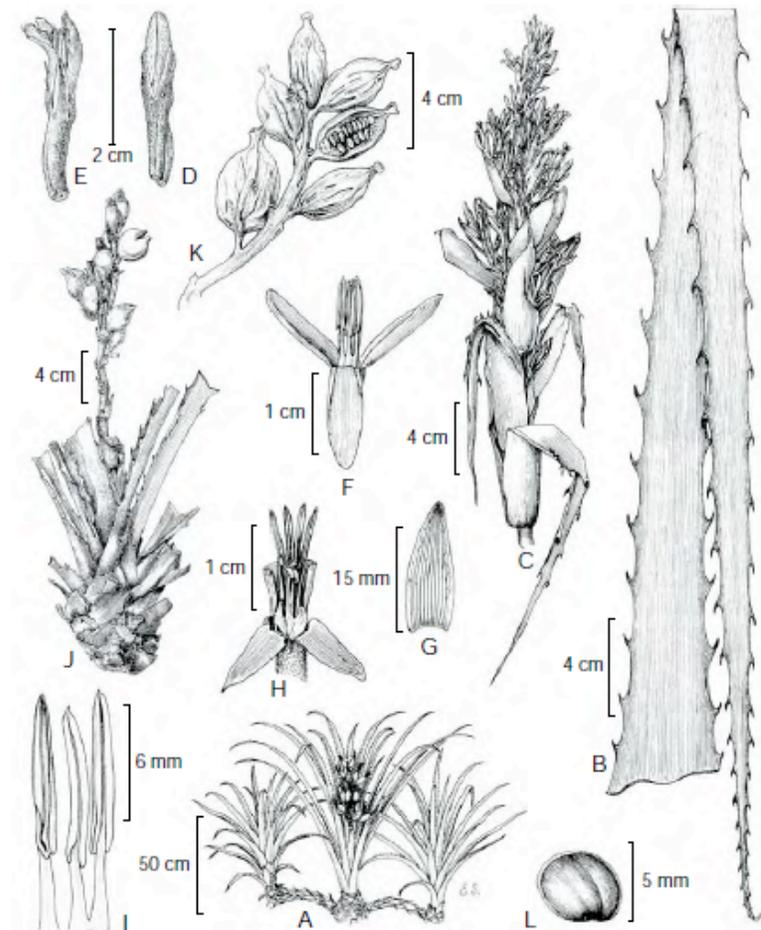


Figura 2.6 *Bromelia pinguin*. A) aspecto general de la planta; B) hoja; C) inflorescencia; D) y E) botones florales; F) flor; G) Sépalo; H) flor disecada para mostrar el androceo y el gineceo; I) estambres; J) infrutescencia; K) frutos; L) semillas (Espejo Serna y cols., 2010)

El fruto es de tipo baya ovoide que presenta un tamaño de hasta 5 cm y un peso promedio de 13.7 g que es utilizado, como alimento y agente fitoterapéutico para tratamiento de tos, trastornos del tracto respiratorio, escorbuto y diabetes con previa inactivación por calor de la proteasa “pinguinain” ya que su presencia combinada con los daños provocados por los rafidios de oxalato de calcio presentes en la cáscara de la fruta genera irritación en las yemas de los dedos y alrededor de la boca (Pío León y cols., 2009; Payrol y cols. 2005).

Análisis realizados en Cuba y otros países han detectado un alto contenido de componentes nutricionales (Cuadro 2.5), además de considerar el fruto como un alimento funcional por la presencia de compuestos fenólicos, terpenos, saponinas y ácidos grasos (Pío León y cols., 2009).

Cuadro 2.5 Caracterización fisicoquímica del fruto de *Bromelia pinguin*.

Parámetros fisicoquímicos	
Composición proximal <sup>b,d</sup>	g/100g b.s.
Humedad	80.4±0.311
Proteína	7.2±0.19
Lípidos	1.4±0.072
Cenizas	10.6±0.017
Fibra cruda	3.4±0.339
Carbohidratos	77.3±0.340
Taninos <sup>b</sup>	ND <sup>g</sup>
Ácido fítico <sup>b,d</sup>	0.12±0.004
Minerales <sup>b,d</sup> (RDA <sup>e</sup> /AI <sup>f</sup> )	mg
Ca (1300mg <sup>e</sup> )	1290±80
Co (ND)	1.2±0.14
Fe (18mg <sup>e</sup> )	1.7±0
K (4700mg <sup>f</sup> ) (NE)	903±56.6
Mg (420mg <sup>e</sup> )	500±40
Mn (2.3mg <sup>f</sup> )	2.95±0.212
Na (1500mg <sup>f</sup> )	ND
P (1250mg <sup>e</sup> )	56.6±5.77
Zinc (11mg <sup>e</sup> )	2.8±0
Dimensiones <sup>a</sup>	cm
Largo	3.430±0.399
Ancho 1	2.794±0.27
Ancho 2	2.728±0.26
Peso (g)	13.7±3.35
Color <sup>a</sup>	
L*	74.5±1.97
a*	3.7±1.2
b*	43.2±1.74
pH <sup>b</sup>	3.7±0.044
Acidez <sup>b,c</sup>	4.6±0.034
°Brix <sup>b</sup>	14.1±1.08
Vitamina C <sup>b</sup> (mg/100g)	126.0±2.25
<sup>a</sup> Media±SD de 50 mediciones	<sup>c</sup> Aportes dietéticos recomendados
<sup>b</sup> Media±SD de 5 mediciones	<sup>f</sup> Ingesta adecuada; NE= No Establecido
<sup>c</sup> Determinado como porcentaje de ácido cítrico	<sup>g</sup> ND. Concentración no detectable con el método
<sup>d</sup> Valores son en base seca (b.s.) excepto la humedad	empleado
Pío León y cols., 2009	

Por otro lado Pío León y cols. (2009) presentaron un análisis de la actividad antibacterial del extracto de frutos de *Bromelia pinguin*, fraccionando dicho extracto con metanol (ME), hexano (HF), cloroformo (CF), acetato de etilo (EaF) y agua (AqF), para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) sobre las bacterias mostradas en el Cuadro 2.6, comparando la MIC obtenida de cada extracto y fracción con la concentración mínima inhibitoria de gentamicina, un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro, observando que el extracto con metanol y las fracciones realizadas con acetato de etilo y agua presentan actividad antibacterial posiblemente debido a que este extracto y fracciones presentaron una alta concentración en compuestos fenólicos, específicamente taninos y flavonoides.

Cuadro 2.6 Actividad antibacterial de los extractos del fruto de *Bromelia pinguin*

Bacteria	MIC (mg/ml)				MBC (mg/ml)		
	G*	ME	EaF	AqF	ME	EaF	AqF
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	2	16	8	16	32	8	32
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	4	16	4	16	32	16	16
<i>Streptococcus</i> grupo A-4	0.5	8	4	8	16	4	32
Salmonela groupo D	0.5	16	8	16	32	16	32
<i>Salmonella typhi</i>	0.5	16	4	16	16	16	32
<i>Shigella flexneri</i>	0.5	8	2	16	64	4	32
<i>Shigella dysenteriae</i>	0.5	8	16	8	n.b.	32	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1	16	4	8	16	8	32
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0.5	16	8	16	64	16	32

n.b., sin efecto bactericida  
 MIC, concentración mínima inhibitoria  
 MBC, concentración mínima bactericida  
 Pío León y cols., 2009

G\*, gentamicina (µg/ml)  
 ME, extracto con metanol  
 EaF, fracción en acetato de etilo  
 AqF, fracción acuosa

La pinguinain es una glicoproteína similar a la papaína en propiedades pero presenta gran resistencia a la desnaturalización por calor y una actividad óptima a 65°C (Toro-Goyco y cols., 1968). También es similar a la bromelina pero difiere en que la pinguinain es inhibida por la cistatina de pollo (Rowan y cols., 1990).

Esta proteasa fue aislada por Messing (1961) de una variedad Cubana, observando que esta constaba de al menos dos componentes. Sin embargo, Toro-Goyco y Matos (1964) reportó que consistía en un solo compuesto al analizar una variedad de Puerto Rico.

Toro Goyco y cols. (1980) demostraron que la enzima presenta cinco residuos de cisteína, cuatro en dos enlaces disulfuro y otro en el sitio activo de la enzima por medio de una carboxamidometilación completa.

Payrol y cols. (2005) prepararon una solución prepurificada de pinguinain (PPP), a partir de frutos cultivados en Cuba, y analizaron el efecto del pH en la actividad proteolítica (fig. 2.7 a) y la estabilidad térmica (fig. 2.7 b), observando que la solución (PPP) presenta una mayor actividad proteolítica en un pH de 8.2 y una rápida pérdida de la actividad proteolítica cuando la solución se encuentra a una temperaturas de 66°C y 75°C.

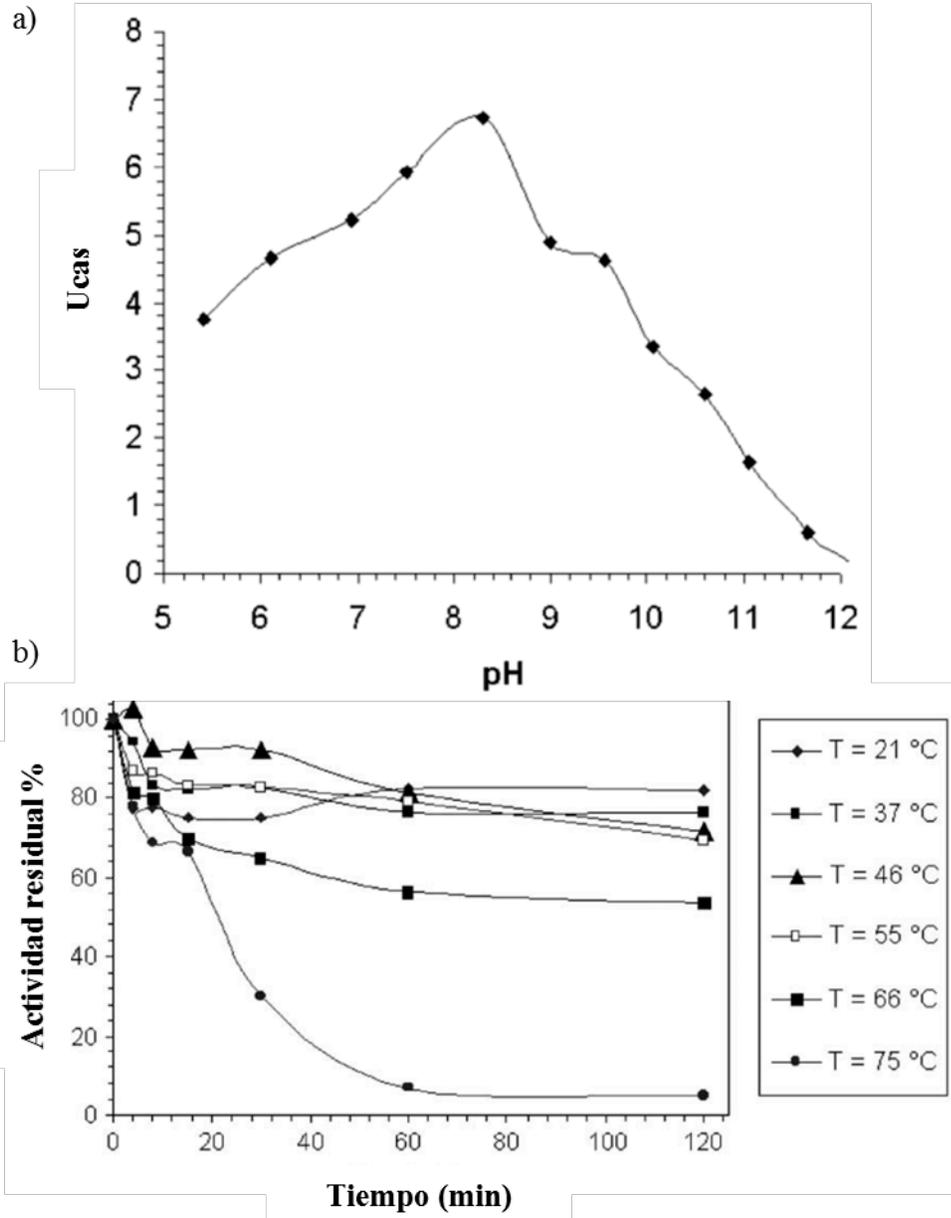


Figura 2.7 Efecto del pH (a) y la temperatura (b) sobre la actividad proteolítica de pinguinain prepurificada en Unidades Caseinolíticas (Ucas) (Payrol y cols., 2005)

Además, Payrol y cols. (2005) analizaron el efecto de agentes reductores sobre la actividad proteolítica (fig. 2.8), donde observaron que la presencia de L-cisteína en el medio de reacción aumenta hasta cinco veces la actividad proteolítica.

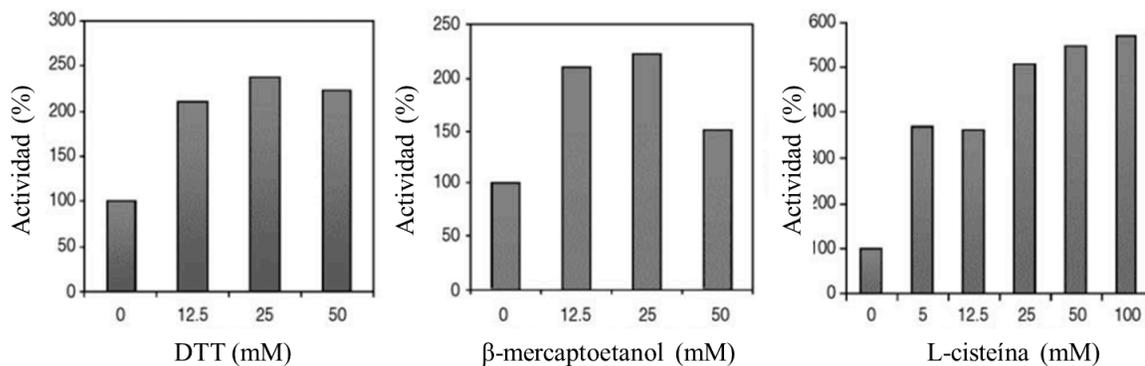


Figura 2.8 Efecto de agentes reductores en la actividad proteolítica de la pinguinain purificada; de izquierda a derecha ditioneitol (DTT),  $\beta$ -mercaptoetanol y L-cisteína (Payrol y cols., 2005)

Así mismo, realizaron un isoelectroenfoque de PPP mostrando varios componentes, en su mayoría proteolíticamente activos, entre pI 4.6 y 8.1 (fig. 2.9), seguido por un análisis de zimograma observando la presencia de tres bandas principales proteolíticas (pI 8.1, 7.4 y 6.0) y, finalmente una electroforesis de la enzima desnaturalizada con dodecilsulfato sódico en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) que se muestra en la fig. 2.10 donde se apreció que los principales componentes de la proteína pinguinain tienen masas moleculares de 20kDa.

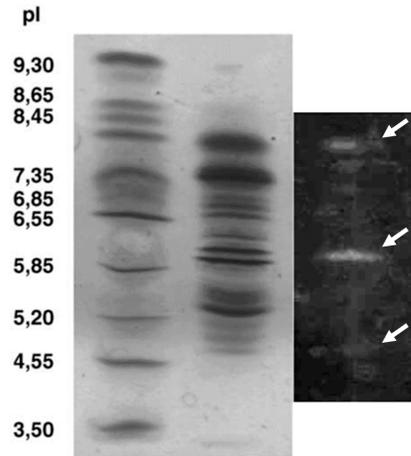


Figura 2.9 Enfoque isoeléctrico y zimograma de la pinguinain prepurificada, izda y dcha respectivamente (Payrol y cols., 2005)

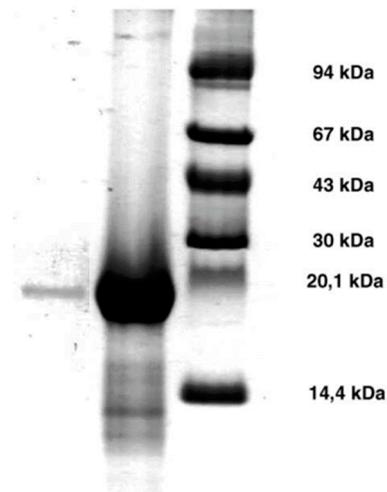


Figura 2.10 Electroforesis de fracción cromatográfica. pI 7.4, pinguinain prepurificada y estándares de masa molar conocida, de izda a dcha respectivamente (Payrol y cols., 2005)

### 2.7 *Bromelia karatas*

La planta *Bromelia karatas* se distribuye geográficamente en el Neotrópico creciendo en bosques tropicales caducifolios y subcaducifolios a una altura de 350-450m desde las Antillas y México hasta Brasil y Ecuador, floreciendo y fructificando de enero a marzo. Es conocida por los nombres comunes aguama, cocuistle, piñuela, timbirichi, entre otros (Espejo Serna y cols., 2010). En el estado de Nayarit se distribuye en los municipios de Acaponeta, Huajicori, Rosamorada, Ruíz, Santiago Ixcuintla, Tecuala, Ahuacatlan, Amatlán de cañas, Ixtlán del Río y Jala (INIFAP, 2010).

En Hidalgo, México se le conoce a la fruta como “timbiriche” y se comercializa principalmente como agua endulzada, así como para preparar una pomada contra la inflamación y cercas vivas para separar linderos (Hornung-Leoni, 2011a).

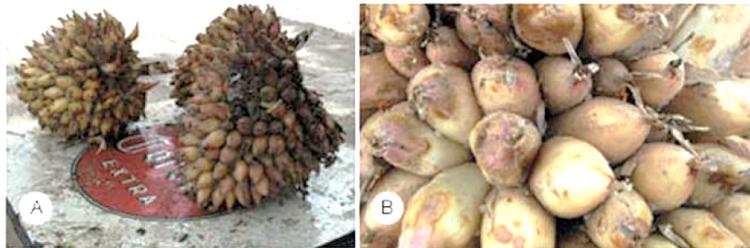


Figura 2.11 Fruto de *Bromelia karatas* (Hornung-Leoni, 2011b)

Moyano y cols. (2012) realizaron análisis bromatológicos (Cuadro 2.7) y fitoquímicos a frutos verdes y maduros de *Bromelia karatas* colectados en Colombia, además evaluaron la funcionalidad antioxidante determinando el contenido de fenoles totales, capacidad total hidrosoluble (CATH), el poder reductor férrico (PRF) y la capacidad inhibitoria del anión superóxido.

Cuadro 2.7 Parámetros bromatológicos de *Bromelia karatas* (g/100g)

Parámetro	Cáscara		Pulpa	
	Madura	Verde	Madura	Verde
Materia Seca	24.88±0.16	18.52±0.09	23.41±0.96	13.15±0.13
Cenizas	4.45±0.22	6.40±0.01	4.22±0.05	12.0±0.01
Ext. Etéreo	0.28±0.00	0.55±0.03	2.65±0.01	1.2±0.06
Proteína	1.60±0.10	5.20±0.01	3.13±0.20	13.3± 0.20
Fibra Bruta	18.9±2.65	20.9±0.15	0.61±0.04	9.2±0.01
Vitamina C*	0.12±0.00	0.02±0.00	0.03±0.00	0.01±0.00
Vitamina E**	-	-	0.34±0.05	0.12±0.01
Ca	0.19±0.00	0.52±0.00	0.29±0.00	1.65 ±0.00
K	0.65±0.00	0.47±0.00	0.67±0.00	0.63±0.00
Mg	1.22±0.00	0.02±0.00	0.47±0.00	0.39±0.00
P	0.34±0.00	0.37±0.00	0.22±0.00	1.14±0.00
Na***	602±0.00	207±0.00	294±0.00	579±0.00
Fe***	295±10.30	32±2.10	56±3.20	92±3.80

\*(mg/ml extracto)

\*\*(mg/100g fruta)

\*\*\*ppm

Moyano y cols., 2012

Los análisis fitoquímicos evidenciaron la presencia de flavonoides, terpenos, cumarinas, taninos y fenilpropanoides. Además se observó que la presencia de los compuestos fenólicos, vitamina C y vitamina E es hasta 70% superior en los frutos maduros que en los frutos verdes, lo que explica los valores de capacidad antioxidante obtenidos (Moyano y cols., 2012).

Cuadro 2.8 Capacidad antioxidante de los jugos de pulpa de *Bromelia karatas*

Estadio	Contenido fenólico total <sup>1</sup>	CATH <sup>2</sup>	PRF <sup>3</sup>	Inhibición del O <sub>2</sub> <sup>-4</sup>
Jugo verde	290.3±0.0	91.8±0.7	2.48±0.0	4.0±0.0
Jugo Maduro	407.9±0.0	169.7±2.0	2.74±0.0	35.3±0.0
BHT		-	1.66±0.0	15.1±0.0
Ácido ascórbico		511.37±0.2	0.353±0.2	95.8±0.0

<sup>1</sup> Capacidad Total Hidrosoluble en mg equivalente de ác. gálico/100g

<sup>2</sup> Poder Reductor Férrico mg equivalentes de ác. ascórbico/100g

<sup>3</sup> Abs 700nm;

<sup>4</sup> %

Moyano y cols., 2012

La proteasa extraída del fruto de *Bromelia karatas*, denominada karatasin, presenta una masa molar de 24,868Da, la cual puede disociarse en subunidades activas, una de peso molecular menor a 12-13kDa pero mayor que 3.5kDa y otra entre 13kDa y 20kDa, por la adición de dodecil sulfato sódico (SDS) y β-mercapto-etanol (Montes y cols., 1990).

Estas proteasas purificadas se probaron para reemplazar la papaína en la industria alimentaria, ya que presenta ventajas relativas como la estabilidad a alta temperatura y actividad aceptable en varios valores de pH, además la composición de aminoácidos y la secuencia parcial de la enzima muestra una analogía con la papaína y la bromelaina de tallo (Montes y cols., 1990).

Debido a estas propiedades que presentan estos frutos, resulta de interés el poder desarrollar un estudio en el cual se pueda elucidar los potenciales efectos que la hidrólisis enzimática de estas proteasas pueda ejercer en subproductos del camarón y así poder evaluar su potencial efecto antioxidante.

## CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

La producción y consumo de camarón a nivel mundial genera una gran cantidad de subproductos, por lo que en los últimos años se ha buscado convertir estos residuos en productos con valor económico para disminuir su acumulación. Dentro de los procesos que se han desarrollado para el aprovechamiento de estos subproductos se encuentra la recuperación de quitina, astaxantina y, recientemente, hidrolizados de proteínas, captando estos últimos la atención de los investigadores ya que se ha reportado que algunos de los péptidos obtenidos durante la fermentación e hidrólisis enzimática de proteínas muestran bioactividad.

Para los procesos mencionados anteriormente se han empleado proteasas como la tripsina, alcalasa (*Bacillus licheniformis*) y mezcla de proteasas (Novozymes Protamex®) (*Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus licheniformis*), ya que presentan la ventaja de hidrolizar regiones específicas de las proteínas. Es por lo anterior que se propone el empleo de dos proteasas vegetales obtenidas a partir de las especies *Bromelia karatas* y *Bromelia pinguin* para hidrolizar subproductos de camarón generados en la zona para posteriormente evaluar la capacidad antioxidante de los hidrolizados obtenidos.

## CAPÍTULO 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Evaluar extractos enzimáticos de frutos de *Bromelia karatas* y *Bromelia pinguin* para obtener péptidos con potencial capacidad antioxidante.

### 4.2 Objetivos específicos

- Obtener extractos enzimáticos prepurificados de los frutos de *B. pinguin* y *B. karatas*.
- Evaluar el efecto del extracto enzimático en los subproductos de camarón.
- Evaluar la capacidad antioxidante de los hidrolizados de subproductos de camarón.
- Evaluar la capacidad antioxidante de los péptidos obtenidos de subproductos de camarón.
- Determinar el peso molecular de los hidrolizados de subproductos de camarón.

## CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se dividió en tres Etapas, las cuales consistieron:

Etapa I, Obtención y caracterización general de los extractos enzimáticos de los frutos de *B. karatas* y *B. pinguin*.

Etapa II, Hidrólisis de proteínas de subproductos de camarón empleando los extractos enzimáticos de *B. karatas* y *B. pinguin* para la obtención de las condiciones óptimas de hidrólisis para la generación de hidrolizados con actividad antioxidante.

Etapa III, Obtención y fraccionamiento de hidrolizados de proteínas de subproductos de camarón en condiciones óptimas, así como la evaluación de actividad antioxidante, determinación de grupos amino terminales ( $\alpha$ -NH<sub>2</sub>) y electroforesis de los hidrolizados y sus fracciones.

### **Etapa 1: Extracción de proteasas prepurificadas**

En la fig. 5.1 se muestra el diagrama de flujo del proceso desarrollado para la Etapa 1.

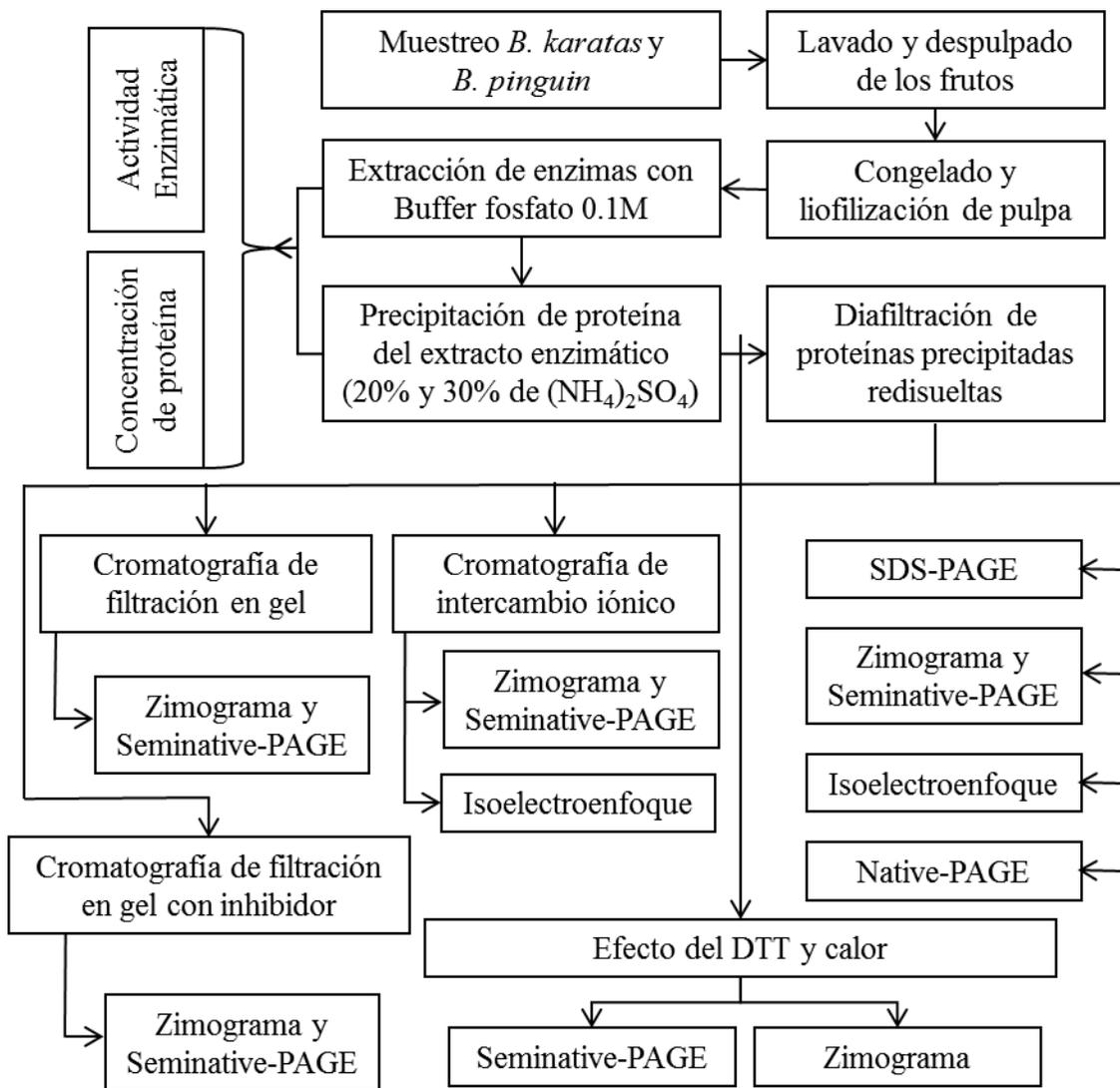


Figura 5.1 Diagrama de proceso de extracción y prepurificación de las proteasas.

### **5.1 Muestreo**

Los frutos de *Bromelia pinguin* se obtuvieron de cultivos silvestres en el municipio de Santiago Ixcuintla, Nayarit y los frutos de *Bromelia karatas* se obtuvieron en el municipio de Ixtlán del río, Nayarit.

### **5.2 Preparación de las frutas *B. pinguin* y *karatas***

Los frutos se lavaron con una solución de jabón (0.01%) y una solución desinfectante de NaClO 225 ppm. Se extrajo la pulpa de ambos frutos, en el caso de los frutos de *B. karatas* sin semillas y los de *B. pinguin* con semillas. La pulpa se congeló a -20 °C, se liofilizó, molió y almacenó en recipientes de plástico sellados herméticamente a -20 °C hasta su utilización.

### **5.3 Extracción de proteasas de las frutas *B. pinguin* y *B. karatas***

Se siguió la metodología empleada por López y cols. (2000). Se homogenizó en un mezclador 10 g de pulpa liofilizada con 250 ml de buffer de fosfato de sodio (0.1 M, 4 °C, pH 6.0, 5 mM de EDTA y 5 mM de L-cisteína). La suspensión se filtró para eliminar los restos insolubles de la pulpa y se centrifugó (6000 g, 30 min, 4 °C) (Hermle, Z32HK, Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany). Se determinó la concentración de proteína (5.4) y la actividad proteolítica (apartado 5.5) del sobrenadante.

### **5.4 Concentración de proteína**

La concentración de proteína se determinó por el método propuesto por Bradford (1976). Este método se basa en el cambio de color del compuesto azul brillante de Coomassie G-250 de roja a azul al formar un complejo colorante-proteína, el cual tiene un coeficiente de extinción alto que implica una gran sensibilidad en la determinación. La formación del complejo colorante-proteína es rápida (aprox 2 min) y permanece en solución aproximadamente 1 h.

Se colocó 0.1 ml de solución proteica con 1 ml de reactivo de Bradford y se mezcló por agitación en vórtex, la midió de la absorbancia en un espectrofotómetro (JENWAY, 6705,

Bibby Scientific Limited, OSA, UK) a 595 nm entre 5 min y 10min después de la reacción. El blanco se preparó con 0.1 ml de buffer de fosfato de sodio 0.1 M con 1 ml de reactivo de Bradford. Se elaboró una curva de calibración con soluciones estándar de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) a concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200 y 250 mg/l, las absorbancias medidas se representaron en una gráfica Absorbancia vs Concentración. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

### **5.5 Actividad proteolítica**

La actividad proteolítica se midió siguiendo el método empleado por López y cols. (2000) modificando el sustrato por albúmina de huevo grado reactivo. Se hizo reaccionar 1.1 ml de solución de albúmina al 1% en buffer de fosfatos (pH 6.0, 12.5 mM de L-cisteína) con 0.1 ml de solución de enzima a 37°C. La reacción finalizó agregando 1.8 ml de ácido tricloroacético (TCA, por sus siglas en inglés) al 5%.

Se centrifugó la solución (18,500 g, 10 min) (Hettich, MIKRO 200R, Andreas Hettich GmbH y Co., Tuttlingen, Germany) y se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm en un espectrofotómetro (JENWAY, 6705, Bibby Scientific Limited, OSA, UK). Se realizó la medición de la absorbancia a 280 nm por ser la longitud de onda a la cual los aminoácidos tirosina y triptófano absorben por la presencia de sus grupos cromóforos (Pace y cols., 1995).

Se realizó una curva de calibración de tirosina con soluciones desde 10 hasta 3000  $\mu\text{mol/ml}$  en buffer de fosfato (pH 6.0) y se midió la absorbancia a 280 nm. Los resultados se representaron en una gráfica Absorbancia vs Concentración de tirosina. Posteriormente se transformaron las absorbancias leídas en la actividad proteolítica en equivalentes de tirosina con la ecuación obtenida de la curva de calibración.

La actividad proteolítica se reportó en Unidades de Actividad ( $U_A$ ), definida como el cambio de la concentración de tirosina/ml de extracto enzimático/min de reacción a 37 °C en las condiciones de reacción descritas en este apartado (Ecuación 5.1).

**Ecuación 5.1.** Actividad proteolítica

$$U_{A@37^{\circ}C} = \frac{\Delta \text{Concentración de tirosina}}{V_{\text{Enzima}} \cdot t} \cdot \frac{V_{\text{Reacción}}}{V_{\text{Enzima}}}$$

La actividad proteolítica específica se reportó en Unidades de Tirosina ( $U_T$ ), definida como el cambio de la concentración de tirosina/mg de proteína/min de reacción a 37 °C en las condiciones de reacción descritas en este apartado (Ecuación 5.2).

**Ecuación 5.2.** Actividad proteolítica específica

$$U_{T@37^{\circ}C} = \frac{\Delta \text{Concentración de tirosina}}{V_{\text{Enzima}} \cdot t \cdot C_{\text{Enzima}}} \cdot \frac{V_{\text{Reacción}}}{V_{\text{Enzima}}}$$

Donde,  $\Delta \text{Concentración de tirosina}$ , es la diferencia de la concentración de tirosina entre la muestra problema y el testigo;  $V_{\text{Enzima}}$ , Volumen de la solución de enzima (0.1 ml); t, Tiempo de hidrólisis (20 min);  $V_{\text{Reacción}}$ , Volumen empleado en la reacción (3 ml);  $C_{\text{Enzima}}$ , Concentración enzimática obtenida por el método de Bradford.

Se prepararon testigos de cada extracto enzimático colocando 0.1 ml de solución enzimática con 1.8 ml de TCA 5% previo a la adición de la solución de albúmina de huevo y los tratamientos térmicos. El blanco se preparó con 1.2 ml de buffer y 1.8 ml de TCA 5%.

### **5.6 Fraccionamiento del extracto proteico por precipitación con sulfato de amonio**

La precipitación con sales, denominada “salting-out”, es resultado de la competencia entre los iones de sal agregados y las proteínas por el solvente, ya que a concentraciones elevadas de sal, los iones agregados se encuentran solvatados y, por lo tanto, es menor la cantidad de solvente disponible para disolver las proteínas presentes (Voet y cols., 2009).

Se siguió el procedimiento realizado por Wang y cols. (2013) modificando las concentraciones de sulfato de amonio empleadas. Se añadió sulfato de amonio al extracto proteico hasta una concentración final de 20% (w/v) y se refrigeró con agitación (4 °C, 4 h). El precipitado se recuperó después de una centrifugación (10,000 g, 30 min) (Hermle, Z32HK, Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany). Se agregó sulfato de amonio al sobrenadante hasta alcanzar una concentración de 30% (w/v). Se repitió el procedimiento mencionado con una concentración de 50% (w/v) de sulfato de amonio. Los precipitados obtenidos de los procesos anteriores se resuspendieron en el buffer empleado durante la extracción de las proteasas.

Se determinó la concentración de proteína (apartado 5.4) y actividad proteolítica (apartado 5.5) a todos los precipitados y sobrenadantes obtenidos.

### **5.7 Diálisis**

Para eliminar el exceso de sulfato de amonio de los precipitados resuspendidos se empleó una membrana de diálisis (Celulosa, 13 kDa) (D0530-Dialysis tubing, high retention seamless cellulose tubing, Sigma-Aldrich®). Se recirculó agua destilada en el baño en que se encontraban los tubos de diálisis durante 21 h. Se reemplazó el agua del baño y continuó la recirculación durante otras 24 h. Se midió la conductividad (HANNA Instruments, HI 4521, HANNA Instruments Inc., Texas, USA) del agua de recirculación durante el proceso. La diálisis terminó al alcanzar una conductividad en el agua de recirculación equivalente a la conductividad del agua destilada empleada.

### 5.8 Diafiltración centrífuga

La diafiltración es una técnica de purificación basada en el empleo de membranas de ultrafiltración para eliminar moléculas de bajo peso molecular, como sales y azúcares simples, que se encuentran disueltas en una solución que contiene un compuesto de interés a partir de una previa adición de agua desionizada (Durán y Jaramillo, 2006).

Los extractos dializados se diafiltraron para concentrarlos y eliminar los residuos de sal que pudieran estar presentes posterior a la diálisis. Se emplearon tubos de filtración centrífuga con masa molecular de corte (MWC, Molecular Weight Cutoff) de 10 kDa (Millipore, Amicon Ultra-15, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) (membrana Ultracel, celulosa regenerada, superficie activa de 7.6 cm<sup>2</sup>). Estos tubos se seleccionaron en base a los datos reportados por Montes y cols. (1990). Los tubos se centrifugaron (4,000 g, ciclos de 40-60 min) (Hermle, Z32HK, Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany) hasta alcanzar un volumen de 0.5 ml, equivalente a un factor de reducción volumétrico (FRV) de 30. Posteriormente, se agregaron 10 ml de buffer de fosfatos previamente empleado durante la extracción de las proteasas y nuevamente se realizó la centrifugación hasta alcanzar un volumen de 0.5 ml, repitiendo este ciclo en una ocasión más.

**Ecuación 5.3** Factor de Reducción Volumétrico (FRV)

$$FRV = \frac{\text{Volumen alimentado}}{\text{Volumen retenido}}$$

El retenido concentrado se recuperó para realizar electroforesis de proteína en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE, apartado 5.9), en condiciones semidesnaturizantes (Seminitive-PAGE, apartado 5.12), en condiciones no desnaturizantes (Native-PAGE, apartado 5.15), zimograma (apartado 5.12) e isoelectroenfoque (apartado 5.13). Así mismo, los concentrados se emplearon para

analizar el efecto del dithiothreitol (DTT) y el calor (apartado 5.16) sobre los compuestos proteicos presentes en los extractos concentrados.

Además, las muestras obtenidas se utilizaron posteriormente para realizar las cromatografías de exclusión molecular e intercambio iónico, las cuales se describen posteriormente.

### 5.9 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

La electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) consiste en desnaturizar las proteínas de la muestra empleando calor y el detergente dodecilsulfato sódico (SDS) para conferirle carga negativa a todas las proteínas y posteriormente separar éstas según su tamaño en una matriz de poliacrilamida con un tamaño de poro definido por la concentración de acrilamida y bis-acrilamida. Para describir la mezcla acrilamida/bisacrilamida se emplean dos parámetros (Schägger y von Jagow, 1987):

- % T, hace referencia a la concentración en porcentaje (w/v) del total de acrilamida y bisacrilamida con respecto al volumen final del gel (Ecuación 5.4).

**Ecuación 5.4** Fórmula para calcular % T

$$\% T = \frac{\textit{masa}_{\textit{acrilamida en gramos}} + \textit{masa}_{\textit{bisacrilamida en gramos}}}{\textit{Volumen}_{\textit{gel en mililitros}}} \times 100\%$$

- % C, hace referencia a la concentración en porcentaje (w/w) del agente entrecruzante (bisacrilamida) con respecto a la cantidad total de acrilamida y bisacrilamida (Ecuación 5.5).

**Ecuación 5.5** Fórmula para calcular % C

$$\% C = \frac{\textit{masa}_{\textit{bisacrilamida en gramos}}}{\textit{masa}_{\textit{acrilamida en gramos}} + \textit{masa}_{\textit{bisacrilamida en gramos}}} \times 100\%$$

Se realizó una SDS-PAGE a los extractos diafiltrados siguiendo la metodología propuesta por Laemmli (1970). Se generó un gel separador (15% T y 2.6% C) compuesto por Acrilamida 2 M, Bis-acrilamida 32.4 mM, Tris 375 mM (pH 8.8), SDS 3.47 mM, persulfato de amonio 2.19 mM y TEMED 0.67 mM; así como un gel concentrador (4% T y 2.6% C) compuesto por Acrilamida 0.5 M, Bis-acrilamida 11 mM, Tris 167.5 mM (pH 6.8), SDS 1.7 mM, persulfato de amonio 2.19 mM y TEMED 1.68 mM.

La muestra de proteína se diluyó 2:1 en buffer de carga (glicerol 2.5 M, Tris 250 mM, SDS 138.7 mM y azul de bromofenol 1.5 mM; pH 6.8) y se calentó a 96 °C durante 5 min. En seguida, la mezcla muestra-buffer de carga se cargó en el carril correspondiente. Se separaron las proteínas de las muestras induciendo el gel a una corriente eléctrica (25 mA por cada gel) hasta que el frente de corrida de color azul se encontraba en el límite inferior del gel. Posteriormente el gel se tiñó (azul de Coomassie R-250 1.2 mM, etanol 8.6 M y ácido acético 1.75 M) durante 20 a 30 min en agitación. El gel se lavó repetidamente con agua caliente y agitación hasta obtener un gel ligeramente transparente con bandas de proteína definidas. El gel se fotografió con un fotodocumentador (Bio-Rad, Gel Doc™ EZ Imager, California, USA). Se empleó un marcador de peso molecular comercial de 10 a 250 kDa (Thermo Scientific, PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA).

**5.10 Cromatografía de exclusión molecular**

La cromatografía de exclusión molecular o cromatografía de filtración en gel consiste en la separación de las moléculas según su tamaño y forma empleando como fase estacionaria esferas de gel con poros de un rango de tamaño definido que evitan el paso de

moléculas de gran tamaño a través de ellos y estas son eluidas con mayor velocidad por la fase móvil empleada (Voet y cols., 2009).

Se colocaron 500  $\mu$ l de la solución diafiltrada en una columna preempacada (matriz de agarosa/dextran, volumen de columna de 24 ml) (Pharmacia, Superdex 75, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., NJ, USA) conectada a un equipo de cromatografía de líquidos (GE Healthcare, ÄKTA Pure 25 L, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., NJ, USA) colectando fracciones de 1 ml en tubos de ensayo con un colector de fracciones (GE Healthcare, Fraccion Collector F9 – R, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., NJ, USA). Como fase móvil se empleó buffer de fosfatos (0.1 M, pH 5.5, 10 mM de NaCl, 0.2 ml/min). Se midió en continuo la absorbancia a 280 nm (Montes y cols., 1990) y se graficó este parámetro con el software UNICORN 6.0. Las fracciones correspondientes a los picos de absorbancia se analizaron por SDS-PAGE para determinar su pureza siguiendo los procedimientos descritos en el apartado 5.9.

Además, se realizó una prueba congelando una muestra de precolumna (previo a la cromatografía) en buffer de carga para SDS-PAGE con la finalidad de conocer si durante la cromatografía de exclusión molecular las proteasas hidrolizaban otras proteínas que pudieran encontrarse en la muestra.

### **5.11 Cromatografía de exclusión molecular con inhibidores de proteasas**

Se realizaron cromatografías de exclusión molecular adicionando en la fase móvil un inhibidor de proteasas (Roche, cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) el cual posee inhibidores tanto reversibles como irreversibles para cisteín proteasas, serín proteasas y metaloproteasas de origen animal, vegetal o microbiano. Los extractos se diafiltraron empleando el buffer con inhibidores previo a la cromatografía. Las fracciones se conservaron en hielo una vez colectadas y se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis por SDS-PAGE.

### **5.12 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones semidesnaturalizantes (seminative-PAGE) y zimograma**

La electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones semidesnaturalizantes (seminative-PAGE) se basa en la separación de una mezcla de proteínas sin que estas sean desnaturalizadas, mientras que el zimograma se basa en la separación de una mezcla de proteínas en su estructura nativa manteniendo un sustrato en el gel para la enzima de interés (Le y Katunuma, 2004).

Los extractos diafiltrados se cargaron en geles de seminative-PAGE y zimograma. Para este método se emplearon dos geles de poliacrilamida: un seminative-PAGE y un zimograma.

El gel de seminative-PAGE se preparó de manera similar a un SDS-PAGE.

El gel del zimograma se preparó similar al gel de SDS-PAGE convencional pero se le adicionó como sustrato gnetina a una concentración final de 1mg/ml.

En ambos casos (seminative-PAGE y zimograma) se omitió el calentamiento y la adición de agentes reductores (DTT y el  $\beta$ -mercaptohetanol) durante la preparación de la muestra para mantener la actividad de las enzimas.

El gel del zimograma se lavó en dos ocasiones con una solución de Tritón X-100 (2.5%, 20 min) y se incubó en buffer Tris-HCl (pH 8.0). Finalmente, ambos geles se tiñeron y destiñeron de la misma manera que un SDS-PAGE (apartado 5.9). Los geles obtenidos se fotografiaron con un fotodocumentador (Bio-Rad, Gel Doc<sup>TM</sup> EZ Imager, California, USA).

### **5.13 Isoelectroenfoque**

Un isoelectroenfoque consiste en la separación de proteínas a partir de su punto isoeléctrico al someterlas en condiciones nativas a un campo eléctrico en un gel de poliacrilamida.

Se empleó un equipo automático de electroforesis (Pharmacia, PhastSystem Separation, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Los extractos precipitados-dializados

de ambas frutas se diafiltraron contra buffer de fosfatos (pH 6.0) y posteriormente se cargaron en el gel de isoelectroenfoque (GE Healthcare, PhastGel IEF, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). El gel de isoelectroenfoque se colocó en una solución de ácido tricloroacético al 20% (w/v) para fijar las proteínas separadas por su pI, posteriormente se lavó el gel en una solución 30% (v/v) de metanol y 10% (v/v) de ácido acético. El gel lavado se tiñó en una solución 0.02% (w/v) de azul de Coomassie R, 30% (v/v) metanol, 10% (v/v) ác. acético y 0.1% (w/v)  $\text{CuSO}_4$ . El gel teñido se lavó y se fotografió con un fotodocumentador (Bio-Rad, Gel Doc™ EZ Imager, California, USA). Se empleó un marcador de punto isoelectroforético (GE Healthcare, PhastGel IEF 3-9 Broad pI, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden).

#### 5.14 Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico consiste en separar las proteínas en base a su carga en un pH definido empleando una matriz de separación que presenta una carga específica.

Se realizó la separación de los extractos diafiltrados de los frutos de *B. karatas* y *B. pinguin* por cromatografía de intercambio aniónico empleando una columna preempacada (Pharmacia, mono Q, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., NJ, USA) (Poliestireno/divinil benzeno,  $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ , 1 ml de volumen de columna) conectada a un equipo de cromatografía de líquidos (GE Healthcare, ÄKTA Pure 25 L, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., NJ, USA) empleando como fase móvil buffer Bis-Tris propano (20mM, pH 9.5, 0.5 ml/min) colectando fracciones de 8 ml (GE Healthcare, Fraccion Collector F9 – R, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., NJ, USA). Los gradientes de cloruro de sodio empleados fueron:

- *B. karatas*: un gradiente de 65 mM a 190 mM en 400 ml
- *B. pinguin*: un gradiente de 80 mM a 190 mM en 400 ml

Las fracciones correspondientes a los picos de absorbancia observados en los cromatogramas fueron analizados por medio de Seminitive-PAGE, zimograma e

isoelectroenfoque siguiendo los procedimientos descritos previamente en los apartados 5.12 y 5.13.

### **5.15 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (native-PAGE)**

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (native-PAGE) con la finalidad de determinar el peso molecular de las proteasas de los frutos de *B. karatas* y *B. pinguin*.

Se empleó un equipo automático de electroforesis (Pharmacia, PhastSystem Separation, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Los extractos diafiltrados se cargaron en un gel de acrilamida preformado (homogéneo de 20%) (17-0624-01 PhastGel Homogeneous, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). El gel obtenido se tiñó y fotografió con un fotodocumentador (Bio-Rad, Gel Doc™ EZ Imager, California, USA).

### **5.16 Efecto del DTT y el calor**

Se evaluó el efecto del DTT y el calor sobre las proteínas de los extractos diafiltrados para determinar si éstas proteínas presentaban estructuras cuaternarias (dos o más subunidades).

Se siguió el procedimiento descrito previamente para realizar un seminative-PAGE y un zimograma (apartado 5.12), únicamente se modificó el tratamiento de las muestras antes de cargarlas en los geles.

Los tres tratamientos empleados fueron:

- Sin adición de DTT y sin calentar. Condición equivalente a un seminative-PAGE.
- Con DTT sin calentar
- Con DTT y con calor (96 °C). Condición equivalente a un SDS-PAGE.

### 5.17 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico unifactorial para determinar si existía diferencia significativa en la concentración de proteína y actividad proteolítica en la etapa de precipitación con sulfato de amonio empleando el software STATISTICA 10.0 con un ANOVA ( $\alpha=5\%$ ) y una prueba de LSD de Fisher para comparación de medias.

#### Etapa 2: Hidrólisis de las proteínas de cabeza de camarón

En la fig. 5.2 se muestra el diagrama de flujo del proceso empleado para la hidrólisis de las proteínas de la cabeza de camarón con las enzimas prepurificadas de los frutos de *Bromelia karatas* y *Bromelia pinguin*, así como bromelina (B4882-Bromelain from pineapple stem, Sigma-Aldrich®) como control positivo.

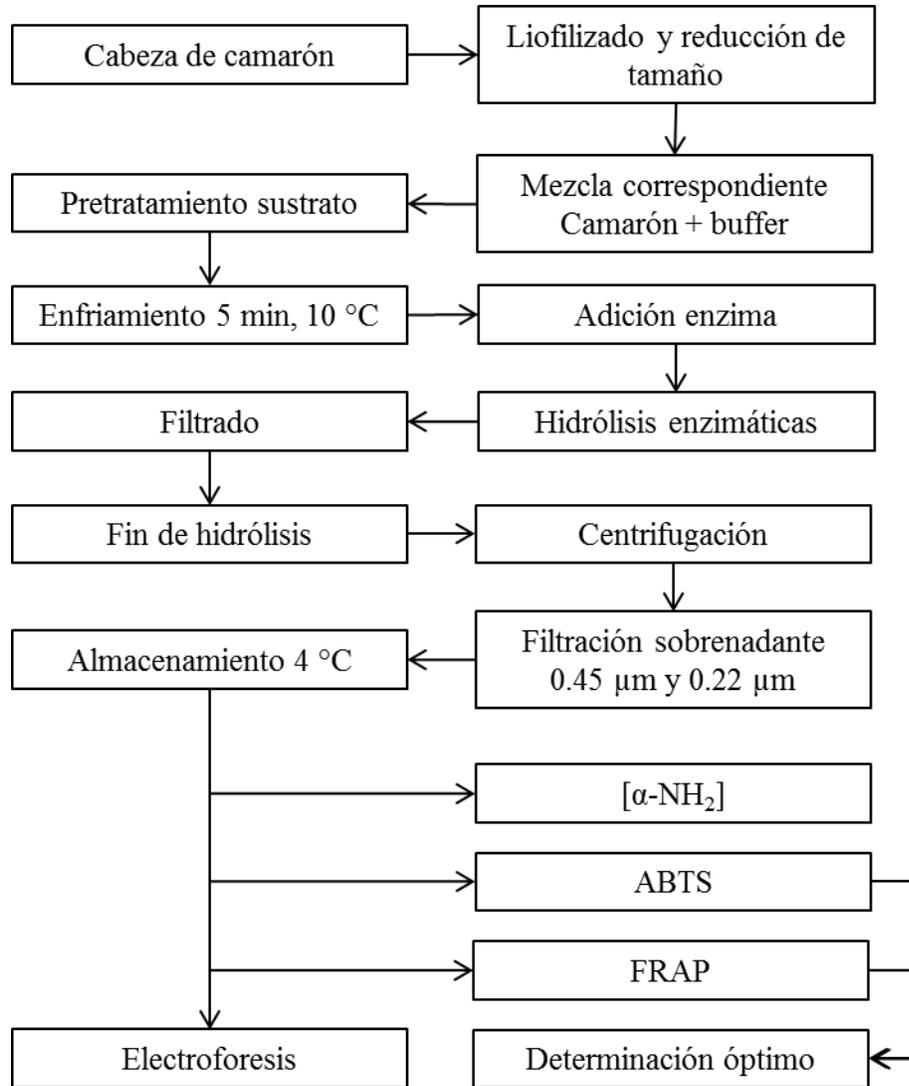


Figura 5.2 Diagrama de proceso de determinación de las condiciones de hidrólisis de los subproductos de camarón.

### **5.18 Determinación de las condiciones de hidrólisis de las proteínas de la cabeza de camarón**

Para la determinación de las condiciones de hidrólisis enzimática se empleó un diseño robusto de Taguchi  $L_{16}$ , el cual genera 16 tratamientos (Cuadro 5.1) con diferentes niveles en los 5 factores evaluados: pH (6.5, 7.0, 7.5 y 8.0), temperatura (25 °C, 30 °C, 35 °C y 40 °C), tiempo de hidrólisis (0.5 h, 1 h, 2 h, y 4 h), cantidad de sustrato (0.5 g, 0.75 g, 1 g y 1.5 g) y cantidad de enzima (50 µg, 100 µg, 150 µg y 250 µg). Este diseño se aplicó para las enzimas de *B. karatas*, *B. pinguin* y, como control positivo, bromelina (B4882-Bromelain from pineapple stem, Sigma-Aldrich®) con la finalidad de determinar el efecto de cada uno de los factores evaluados en cada una de las enzimas, así como determinar el nivel de cada factor para obtener los hidrolizados con una óptima actividad antioxidante (FRAP y ABTS).

Las soluciones enzimáticas se prepararon como se indica en los apartados 5.3 y 5.6. Posteriormente fueron concentrados siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.8 hasta alcanzar una concentración de proteína superior a 250 µg/ml determinada por el método de Bradford (1976). Se determinó la actividad proteolítica de las soluciones enzimática como se menciona en el apartado 5.5. Alícuotas de las soluciones enzimáticas se diluyeron hasta alcanzar las concentraciones correspondientes a cada tratamiento.

Para la hidrólisis de camarón en las condiciones de los distintos tratamientos se colocaron 30 ml de buffer de fosfatos 0.2 M (pH correspondiente a cada tratamiento) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml en el cual se agregó la cantidad correspondiente de sustrato (cabeza de camarón liofilizado) y se colocó durante 15 min en baño a ebullición (aproximadamente 98 °C). Posteriormente se vació el contenido en tubos de teflón de 50 ml para ser enfriados en agua a 10 °C, 5 min. En seguida se adicionó 1 ml de solución enzimática a la concentración adecuada para cada tratamiento y se colocaron los tubos de hidrólisis en agua a la temperatura y tiempo correspondiente con agitación constante.

Cuadro 5.1 Tratamientos generados en el diseño robusto de Taguchi L<sub>16</sub>.

Num. de Corrida	Factores				
	pH	Temperatura, °C	Tiempo, h	Sustrato, g	Enzima, µg
<b>1</b>	6.5	25	0.5	0.5	50
<b>2</b>	6.5	30	1	0.75	100
<b>3</b>	6.5	35	2	1	150
<b>4</b>	6.5	40	4	1.5	250
<b>5</b>	7.0	25	1	1.5	150
<b>6</b>	7.0	30	0.5	1	250
<b>7</b>	7.0	35	4	0.75	50
<b>8</b>	7.0	40	2	0.5	100
<b>9</b>	7.5	25	2	0.75	250
<b>10</b>	7.5	30	4	0.5	150
<b>11</b>	7.5	35	0.5	1.5	100
<b>12</b>	7.5	40	1	1	50
<b>13</b>	8.0	25	4	1	100
<b>14</b>	8.0	30	2	1.5	50
<b>15</b>	8.0	35	1	0.5	250
<b>16</b>	8.0	40	0.5	0.75	150

Las hidrólisis empleando bromelina se llevó a cabo a pH 7.0, 37 °C por ser los óptimos reportados para esta enzima (Hernández y cols., 2005).

Los hidrolizados de cada tratamiento se filtraron con una malla de aproximadamente 2 mm, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se calentaron en baño de agua a ebullición, 15 min. Posteriormente se centrifugaron (14,000 g, 10 min) (Hermle, Z32HK, Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany). Una alícuota (3 ml) de cada sobrenadante se microfiltró con un filtro membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore, MF-Membrane Filtres HAWP, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) y el permeado se microfiltró con un filtro membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore, Membrane Filtres GSWP, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). El sobrenadante restante de cada tratamiento se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y el permeado de la segunda microfiltración (0.22  $\mu\text{m}$ ) se almacenó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

A los hidrolizados microfiltrados se les determinó la concentración de grupos amino libres ( $\alpha\text{-NH}_2$ ) y la capacidad antioxidante *in vitro* (ABTS y FRAP) como se menciona a continuación.

### **5.19 Preparación de subproductos de camarón**

El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) se obtuvo en dos lotes en los mercados locales. Se extrajo la cabeza de los camarones, se congeló ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), se liofilizó, se molió y se almacenó en bolsas de plástico selladas herméticamente a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Bhaskar y cols., 2007).

### **5.20 Concentración de grupos amino libres ( $\alpha\text{-NH}_2$ )**

La concentración de grupos amino libres ( $\alpha\text{-NH}_2$ ) es determinado por diversos métodos, siendo uno de ellos el método de ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS), el cual se basa en la determinación espectrofotométrica del cromóforo formado al reaccionar el TNBS con los grupos amino primarios del hidrolizado en un medio ligeramente alcalino, finalmente la reacción se detiene disminuyendo el pH del medio (Adler-Nissen, 1979).

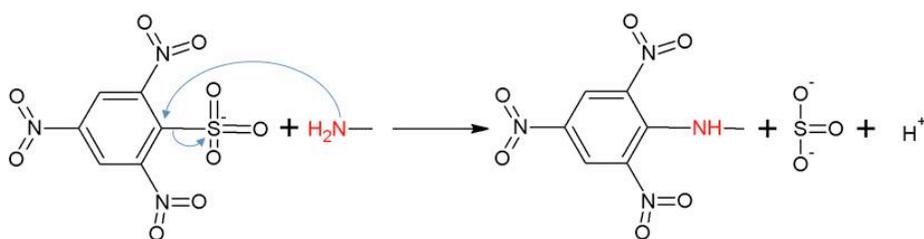


Figura 5.3 Reacción de TNBS con un grupo amino primario

Se siguió la metodología propuesta por Adler-Nissen (1979) y empleada por Cheung y Li-Chan (2010). Las cantidades de los reactivos se ajustaron para un volumen final de 4.120 ml y se omitió la adicción de SDS a las muestras. Para la determinación se mezcló 0.120 ml de hidrolizado con 1 ml de buffer de fosfato de sodio (0.2 M, pH 8.2) y 1 ml de TNBS 0.1% (P2297-Picrylsulfonic acid solution, Sigma Aldrich®). La mezcla se incubó en oscuridad en un baño a 50 °C, 60 min. La reacción finalizó agregando 2 ml de HCl 0.1 N y se enfrió en oscuridad 30 min. Se midió la absorbancia de la solución a 340 nm. El blanco se preparó sustituyendo el volumen de muestra por un volumen igual de buffer. Se preparó una curva de calibración de L-Leucina a concentraciones de 0.5 mM hasta 3.0 mM.

### 5.21 Determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* de los hidrolizados por el método FRAP

El método consiste en la reducción del complejo Tripiridiltriazina férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) a la forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) por un antioxidante en medio ácido, produciendo un compuesto de color azulado que es monitoreado midiendo la absorbancia a 595nm durante 30min (Benzie y Strain, 1996; Álvarez-Parrilla y cols., 2010).

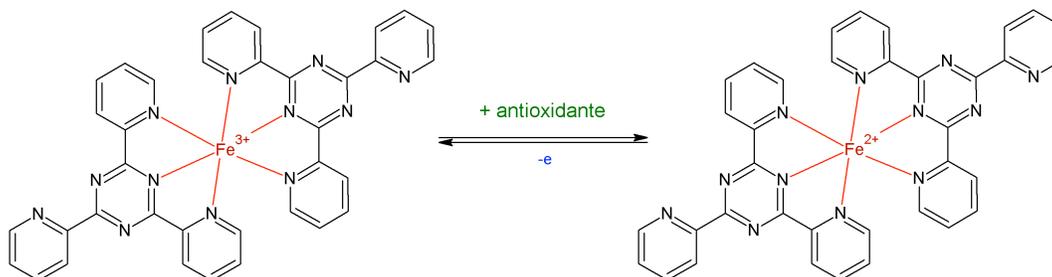


Figura 5.4 Estructura del complejo TPTZ-Fe (Barbosa y cols., 2005).

La determinación se realizó en un espectrofotómetro de microplacas (BioTek, Synergy HT, Winoosky, VT, USA). Se preparó el reactivo FRAP colocando en una relación 10:1:1 buffer de acetato de sodio 0.3 M (pH 3.6), cloruro férrico hexahidratado 20 mM y TPTZ 10 mM (en solución de HCl 40 mM), respectivamente. La cantidad del reactivo a preparar se determinó con relación a la cantidad de determinaciones a realizar en cada ocasión, considerando que estas se realizaron por triplicado y que se requieren 176  $\mu$ l del reactivo para cada determinación. Se preparó una curva de calibración de Trolox a concentraciones de 130  $\mu$ M, 65  $\mu$ M, 32.5  $\mu$ M, 16.25  $\mu$ M y 8.125  $\mu$ M.

Se colocó por triplicado 24  $\mu$ l de la solución problema (blanco, muestra o solución estándar de Trolox) en cada pocillo de la microplaca y se midió la absorbancia a 595 nm cada minuto durante 30 min. El espectrofotómetro de microplacas fue controlado por medio del software GEN5.

### 5.22 Determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* de los hidrolizados por el método ABTS

Se empleó el método propuesto por Re y cols. (1999), el cual se basa en la capacidad de una sustancia antioxidante para capturar el radical ABTS<sup>•+</sup> (ácido 2,2' azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) lo cual provoca un descenso en la absorbancia a 730 nm.

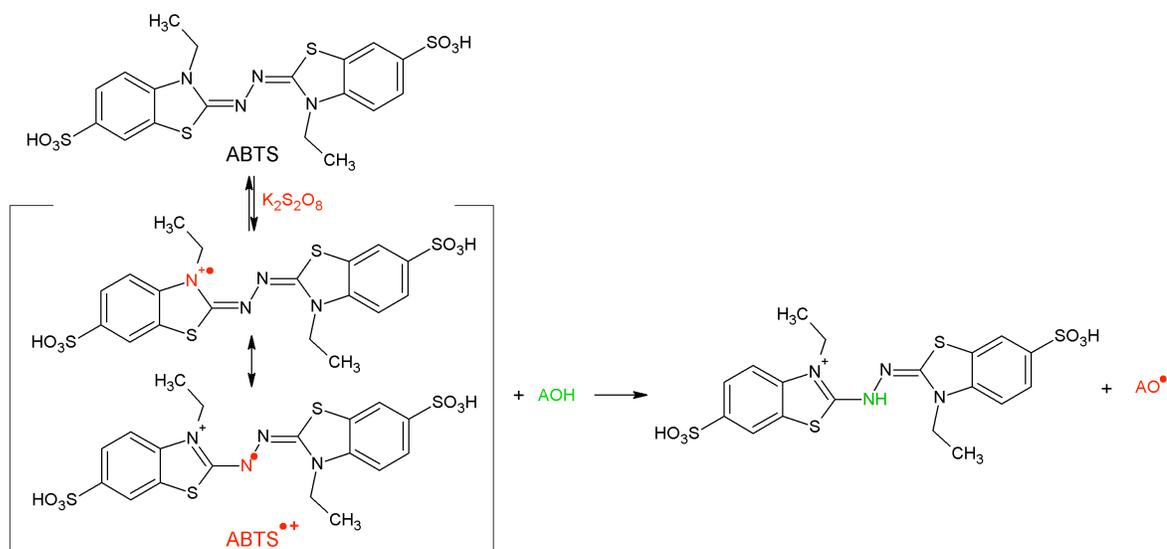


Figura 5.5 Oxidación de ABTS por persulfato de potasio para generar el radical catión ABTS<sup>•+</sup> y su reacción con un antioxidante (AOH) (De Oliveira y cols., 2014).

La determinación se realizó en un espectrofotómetro de microplacas (BioTek, PowerWave HT, BioTek Instruments, Inc., Vermont, USA). Se preparó una solución ABTS 7 mM en buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.4) con persulfato de potasio (2.45 mM), a partir de esta solución se realizaron diluciones con el buffer de fosfatos empleado en la solución hasta alcanzar una dilución con una absorbancia de 0.7. Una vez estimada la disolución a emplear se preparó una cantidad de ésta con relación a la cantidad de determinaciones a realizar en cada ocasión, considerando que estas se realizaron por triplicado y que se

requieren 180  $\mu$ l del reactivo para cada determinación. Se preparó una curva de calibración de Trolox a concentraciones de 600  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 150  $\mu$ M, 75  $\mu$ M y 37.5  $\mu$ M.

Se colocó por triplicado 20  $\mu$ l de la solución problema (blanco, muestra o solución estándar de Trolox) en cada pocillo de la microplaca y se midió la absorbancia a 734 nm cada minuto durante 7 min. El espectrofotómetro de microplacas fue controlado por medio del software GEN5.

### **5.23 Análisis estadístico**

Se obtuvieron las condiciones óptimas de los resultados obtenidos analizando el Diseño de Taguchi empleado con el software STATISTICA 10.0. Las variables de respuesta analizadas fueron únicamente las correspondientes a la actividad antioxidante debido a que el objetivo de la tesis era la obtención de hidrolizados con capacidad antioxidante.

### **Etapas 3: Producción de hidrolizados de proteína de la cabeza de camarón en las condiciones óptimas**

En la fig. 5.6 se muestra el diagrama de flujo del proceso empleado para producir los hidrolizados en las condiciones óptima encontradas durante la Etapa 2 y su fraccionamiento por exclusión molecular, así como la determinación de la capacidad antioxidante tanto de los óptimos como de las fracciones obtenidas.

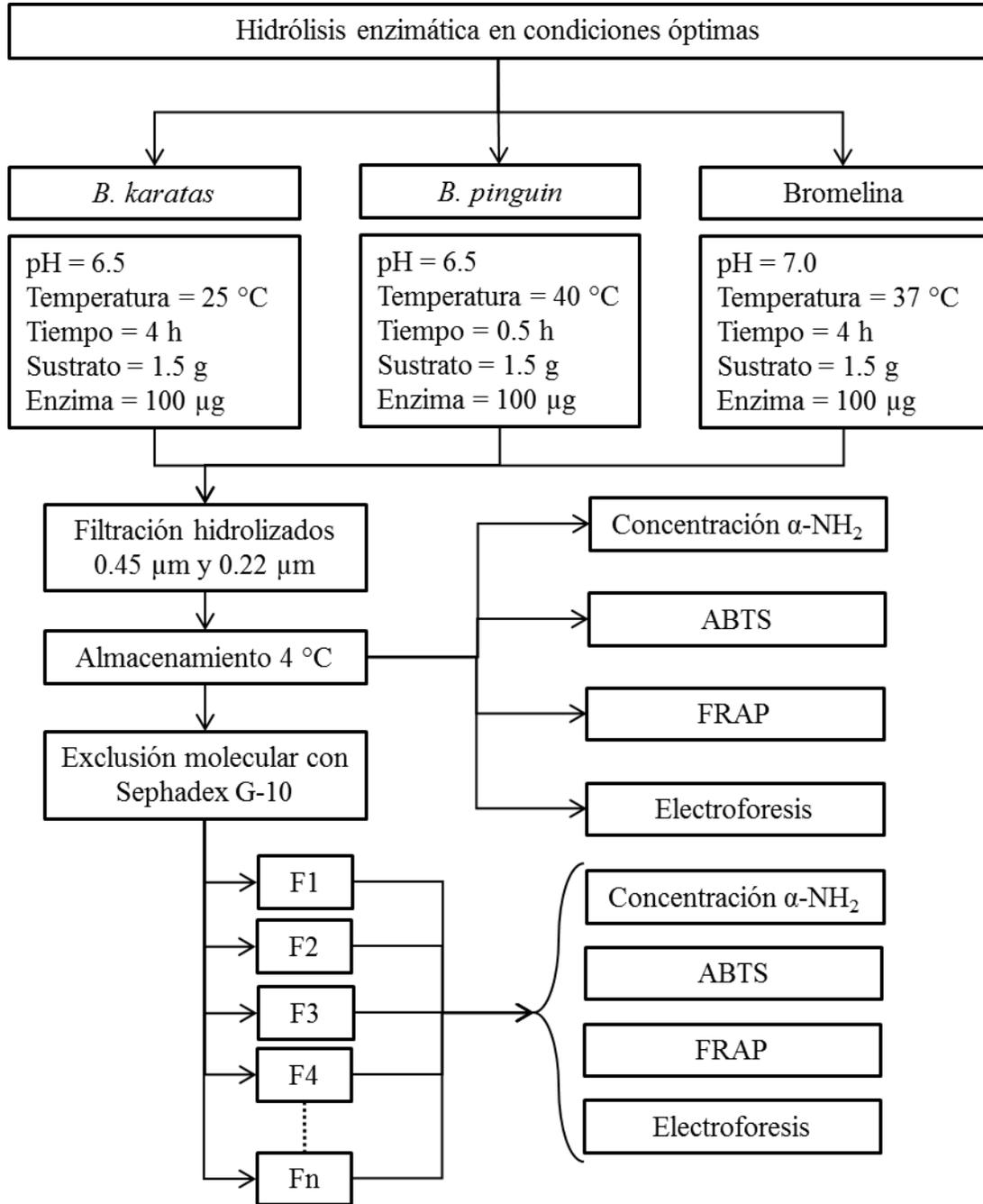


Figura 5.6 Diagrama de proceso para la producción de hidrolizados en las condiciones óptimas y determinación de la capacidad antioxidante.

### **5.24 Producción de los hidrolizados en las condiciones óptimas**

Los datos obtenidos durante la Etapa 2 fueron analizados con el software STATISTICA 10 empleando un diseño robusto de Taguchi  $L_{16}$  con el cual se obtuvieron los factores significativos para las determinaciones de capacidad antioxidante (ABTS y FRAP) así como los niveles propuestos como óptimos por el análisis para cada uno de los factores evaluados y cada una de las enzimas empleadas. Considerando dichas condiciones se generaron nuevos hidrolizados los cuales fueron denominados óptimos, siguiendo el mismo procedimiento que se indicó anteriormente y determinando a cada uno de los hidrolizados la concentración de grupos  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> y capacidad antioxidante por los métodos de ABTS y FRAP como se mencionó previamente. Una vez realizadas las determinaciones, los hidrolizados fueron fraccionados empleando una cromatografía de exclusión molecular como se menciona a continuación.

### **5.25 Fraccionamiento de los hidrolizados en condiciones óptimas**

Se colocaron 0.5 ml del hidrolizado óptimo de cada enzima evaluada en una columna (18cm x 0.77cm<sup>2</sup>) empacada con Sephadex<sup>®</sup> G-10 medium (G10120- Sephadex<sup>®</sup> G-10, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), empleando como fase móvil buffer de fosfatos (0.1 M, 4 °C, 5 mM de NaCL, 18.5 ml/h) y colectando fracciones de 2 ml con un colector de fracciones (Pharmacia Biotech, RediFrac, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., NJ, USA). A cada fracción obtenida se midió la absorbancia a 280 nm, se determinó la concentración de grupos  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> y se determinó la actividad antioxidante por los métodos ABTS y FRAP. Además, se realizó un análisis electroforético de cada fracción siguiendo el procedimiento que se menciona a continuación.

### **5.26 Análisis electroforético por medio de Tricine-SDS-PAGE**

Para observar la distribución de pesos moleculares de las fracciones obtenidas durante la cromatografía de exclusión molecular se realizaron electroforesis siguiendo la metodología propuesta por Schägger y von Jagow (1987) y Schägger (2006).

Para cada una de las electroforesis se preparó un gel de acrilamida/bisacrilamida compuesto por tres secciones:

- 1) Un gel concentrador (4% T y 2.6% C) de aproximadamente 1.4 cm de altura, el cual permite comprimir las proteínas y péptidos de las muestras para que ingresen a las secciones posteriores lo más concentrado posible.
- 2) Un gel espaciador (10% T y 2.6% C) de aproximadamente 0.8 cm de altura, el cual permite retener las proteínas de alto peso molecular, mientras que las de bajo peso molecular lo atraviesan rápidamente.
- 3) Un gel separador (16.5% T y 5% C) de aproximadamente 5.0 cm de altura, el cual permite separar los polipéptidos de bajo peso molecular.

El gel concentrador se preparó siguiendo la metodología indicada en la metodología del apartado 5.9. El gel espaciador se preparó con Acrilamida 1.36 M, Bis-acrilamida 17.3 mM, Tris 0.33 M (pH 8.8), HCl 0.1 M (para ajustar a pH 8.45), SDS 1.15 mM, persulfato de amonio 2.2  $\mu$ M y TEMED 5.57  $\mu$ M. Finalmente, el gel separador se preparó con Acrilamida 2.2 M, Bis-acrilamida 51.9 mM, glicerol 1.02 M, Tris 0.3 M, HCl 0.1 M (para ajustar a pH 8.45), SDS 1.16 mM, persulfato de amonio 1.5  $\mu$ M y TEMED 6.67  $\mu$ M.

Las muestras se diluyeron en una relación 2:1 con buffer de carga (glicerol 3.26 M, SDS 34.7 mM, DTT 0.14 M, Coomassie G-250 0.23 mM y Tris 0.1 M pH 6.8) y se calentaron a 37 °C, 15 min cargando en cada carril del gel 15  $\mu$ l.

Para la corrida se emplearon dos buffers, uno para el cátodo (Tris 0.1 M, Tricina 0.1 M, SDS 0.1%) y otro para el ánodo (Tris 0.1 M ajustado a pH 8.9 con HCl) sometiendo el sistema a 15 mA/gel hasta que la muestra entra en el gel separador, momento en el cual se sometió el sistema a una corriente de 20 mA/gel.

El gel se colocó en una solución de fijación (Metanol 40% y ácido acético 10%) durante 30 min, posteriormente se tiñó (Ácido acético 10%, Coomassie G-250 0.025%) durante 1 hora y se lavó repetidamente con una solución de destinción (Ácido acético 10%) hasta alcanzar una destinción que permitió visualizar las bandas correspondientes a los péptidos y polipéptidos.

Para determinar los pesos moleculares, se empleó un marcador de peso molecular (161-0326 Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Bio-Rad), éste se diluyó 1:20 con buffer de carga y se calentó a 95 °C durante 5 min cargando en el gel 15 µl. El estándar contiene los polipéptidos: Triosafosfato isomerasa (26,625 Da); mioglobina (16,950 Da);  $\alpha$ -lactoalbúmina (14,437 Da); aprotinina (6,512 Da); insulina B oxidada (3,496 Da) y bacitracina (1,423 Da).

## CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Etapa 1: Extracción de proteasas prepurificadas**

#### **6.1 Precipitación con sulfato de amonio**

En la fig. 6.1 se muestran los valores correspondientes a la concentración de proteína y actividad proteolítica del extracto crudo de *B. karatas* (0% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), así como la concentración de proteína y actividad proteolítica del precipitado y sobrenadante obtenidos al precipitar las proteínas del extracto enzimático de *B. karatas* con 20% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . En esta figura se observó que al precipitar las proteínas de los extractos enzimáticos de *B. karatas* con sulfato de amonio a una concentración de 20%, la actividad del sobrenadante es prácticamente nula y la concentración de proteína es de aproximadamente la mitad con respecto a la concentración inicial lo que implica que en el sobrenadante de 20% solo existen proteínas sin actividad proteolítica y prácticamente todas las enzimas proteolíticas fueron precipitadas con una concentración al 20% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , por lo que esta concentración es la adecuada para precipitar las proteasas presentes en este fruto.

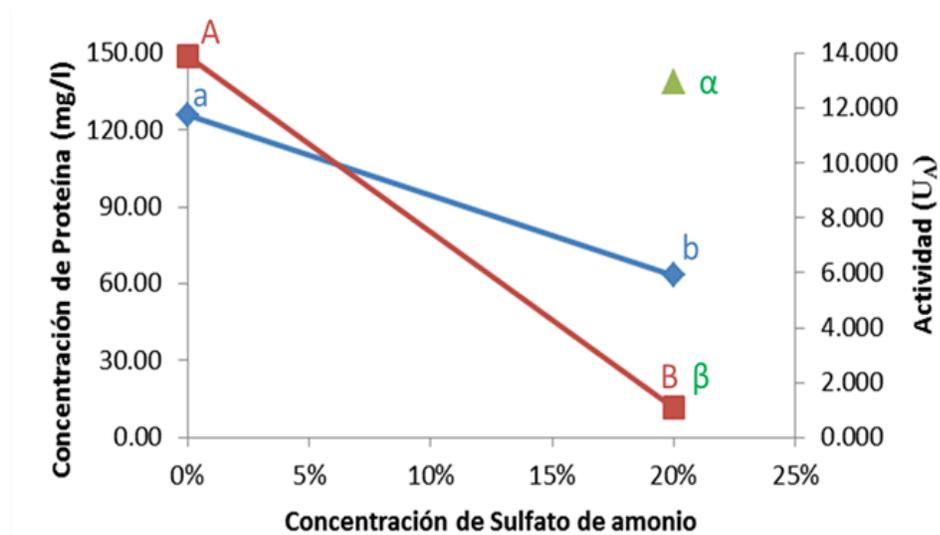


Figura 6.2 Concentración de proteína en sobrenadante (◆), actividad proteolítica de sobrenadante (■) y actividad proteolítica de precipitado (▲) de extractos de *B. kartatas* a diferentes concentraciones de sulfato de amonio. Letras minúsculas indican diferencia significativa en la concentración de proteína en el sobrenadante a las diferentes concentraciones de sulfato de amonio; letras mayúsculas indican diferencia significativa en la actividad proteolítica del sobrenadante entre concentraciones de sulfato de amonio; letras griegas indican diferencia significativa en la actividad proteolítica entre precipitado y sobrenadante a una concentración de 20% de sulfato de amonio.

En la fig. 6.2 se observó que al precipitar el extracto de *B. pinguin* con una concentración de 20% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  existe actividad tanto en el precipitado como en el sobrenadante; sin embargo, al agregar sulfato de amonio al sobrenadante hasta alcanzar una concentración de 30%, la actividad proteolítica en el sobrenadante disminuye conservando éste una concentración de proteína de aproximadamente 30% con respecto a la concentración inicial, mientras que en el precipitado se observó una actividad proteolítica relativamente alta. En base a lo anterior se decidió precipitar el extracto enzimático de *B. pinguin* con una concentración al 30% con la finalidad de precipitar en conjunto las enzimas precipitadas a 20% y las precipitadas a 30%.

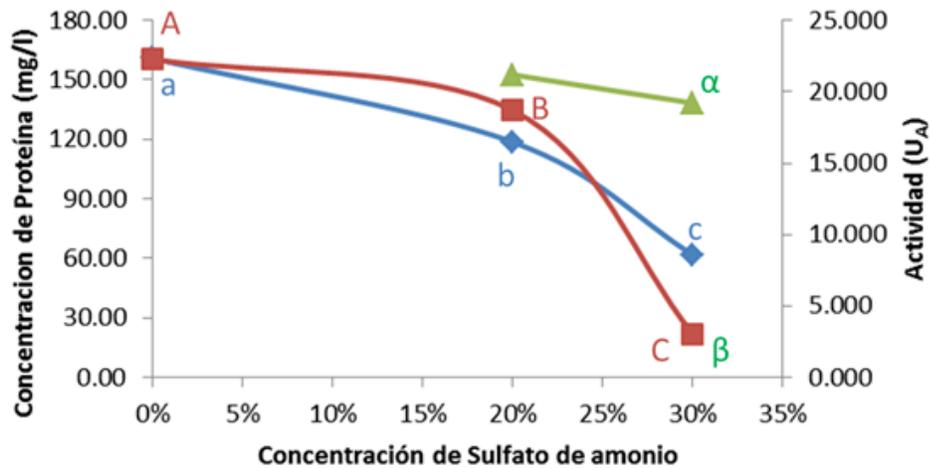


Figura 6.3 Concentración de proteína en sobrenadante (—◆—), actividad proteolítica de sobrenadante (—■—) y actividad proteolítica de precipitado (—▲—) de extractos de *B. pinguin* a diferentes concentraciones de sulfato de amonio. Letras minúsculas indican diferencia significativa en la concentración de proteína en el sobrenadante a las diferentes concentraciones de sulfato de amonio; letras mayúsculas indican diferencia significativa en la actividad proteolítica del sobrenadante entre concentraciones de sulfato de amonio; letras griegas indican diferencia significativa en la actividad proteolítica entre precipitado y sobrenadante a una concentración de 30% de sulfato de amonio.

Curoto y cols. (1998) reportaron resultados similares en la precipitación de proteasas de origen vegetal en *Cucurbita ficifolia* empleando sulfato de amonio a una concentración de 30%. Es importante mencionar que la concentración a la cual precipita una proteína es característica de cada una de ellas debido a que cada proteína presenta distintos aminoácidos y secuencias lo que modifica el área superficial accesible (o asa, por sus siglas en inglés) al solvente y por lo tanto puede requerir mayor o menor concentración de sulfato de amonio para eliminar las interacciones con el solvente permitiendo las interacción proteína-proteína y su posterior precipitación como se explicó previamente en el fundamento del método (Jones y Thornton, 1995; Voet y cols., 2009).

## 6.2 Diálisis

En la fig. 6.3 se muestran gráficamente los valores obtenidos de conductividad del agua de recirculación con respecto al tiempo de diálisis, dividiendo el proceso en los dos ciclos, antes y después del cambio de agua, respectivamente. En el primer ciclo se alcanzó una conductividad constante (aproximadamente 80  $\mu\text{S}$ ) al paso de 15 horas. En el segundo ciclo se observaron conductividades relativamente bajas (aproximadamente 10  $\mu\text{S}$ ) lo cual indicó que la concentración de sulfato de amonio presente en los extractos resuspendidos era baja.

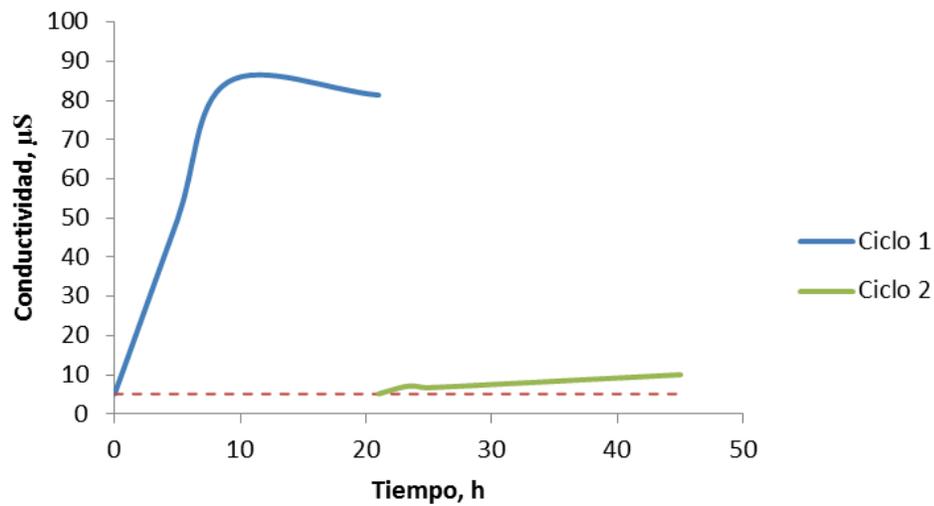


Figura 6.4 Conductividad del agua de diálisis.

### 6.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de los extractos diafiltrados

En la fig. 6.4 se observó que los extractos diafiltrados mostraban una banda mayoritaria alrededor de 20 kDa, que es el peso molecular aproximado de las proteasas buscadas según lo reportado por Payrol y cols. (2005), Payrol y cols. (2008) y Montes y cols. (1990). Las bandas restantes mostraron pesos moleculares inferiores a los 15 kDa; sin embargo, considerando que la técnica seleccionada para la purificación (cromatografía de exclusión molecular) se basa en la separación de las proteínas de la muestra según su peso molecular, se decidió continuar con la exclusión molecular.

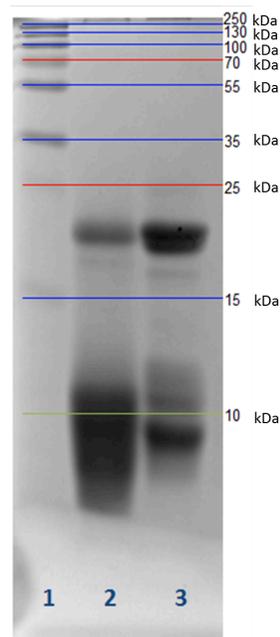


Figura 6.5 SDS-PAGE de extractos prepurificados de *B. karatas* y *B. pinguin*. Carriles: 1) Marcadores de peso molecular; 2) Extracto precipitado-dializado de *B. pinguin*; 3) Extracto precipitado-dializado de *B. karatas*

#### **6.4 Separación por tamaño molecular de las proteínas presentes en los extractos diafiltrados de *B. karatas***

En el cromatograma de los extractos diafiltrados de *B. karatas* (Fig. 6.5) se pudo observar un pequeño pico en las primeras fracciones (8 a 10), lo que indica la presencia de proteínas de alto peso molecular, y un pico de mayor área en las fracciones 16 a 21 lo que indica una alta concentración de un grupo de proteínas de peso molecular muy similar.



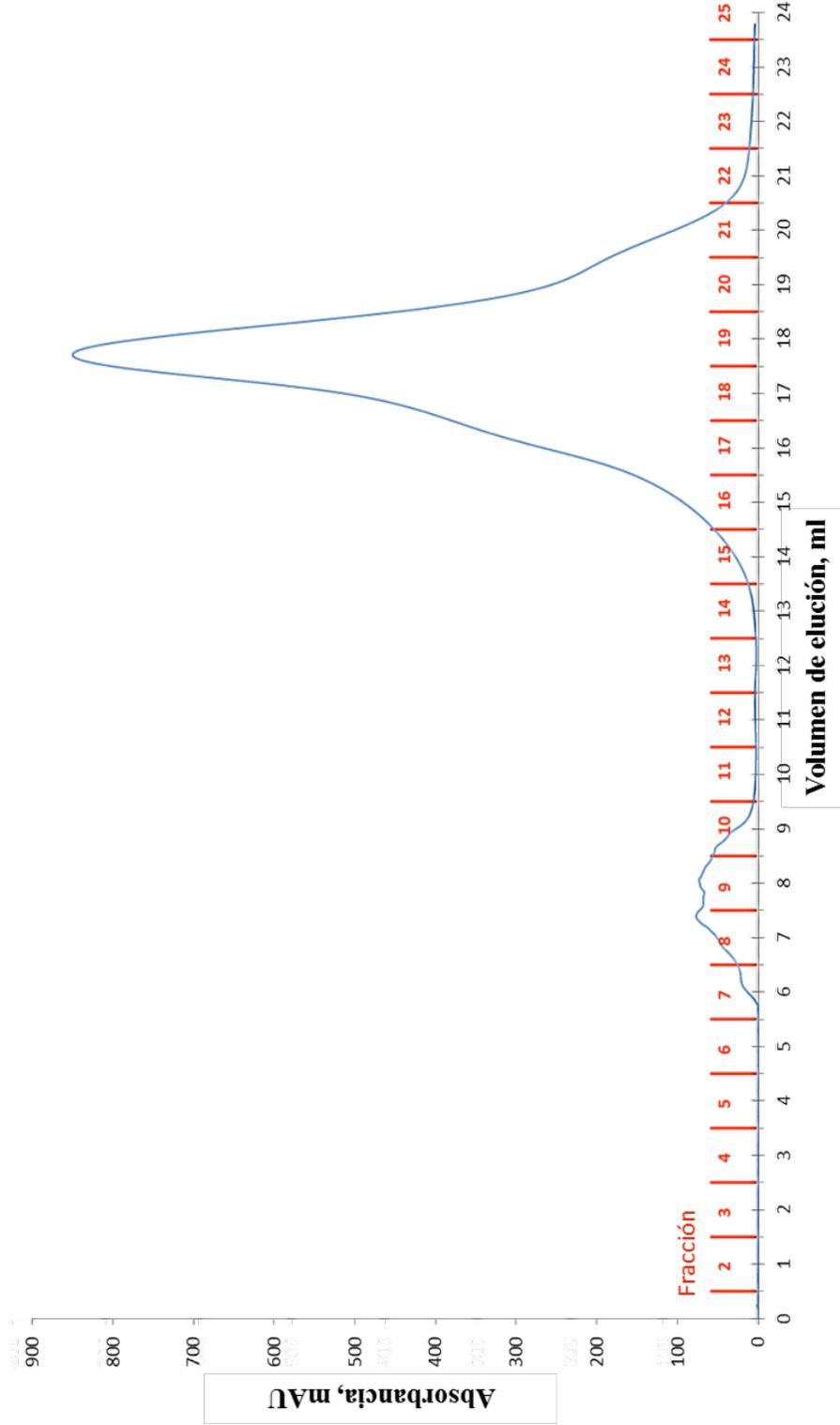


Figura 6.6 Cromatograma de la separación por exclusión molecular de los extractos enzimáticos diafiltrados de *B. karatas*.

Para conocer la pureza y peso molecular de las proteínas presentes en estas fracciones se realizó una SDS-PAGE, el resultado obtenido se presenta en la fig. 6.6. En el gel (fig. 6.6) se pudo observar nuevamente la presencia de las bandas de proteína con pesos moleculares correspondientes a los 20 kDa que, como ya se mencionó anteriormente, corresponden a las proteasas del fruto (Montes y cols. 1990), sin embargo después de la cromatografía de exclusión molecular se apreciaron bandas de pesos moleculares cercanos a los 10 kDa, lo cual no coincide con lo observado en el cromatograma (fig. 6.5), por lo que se estableció que estas bandas podrían ser producto de una hidrólisis posterior a la cromatografía de exclusión molecular. Sin embargo, se observó que no existía diferencia entre la muestra de precolumna que permaneció congelada durante la cromatografía y la que permaneció en refrigeración, por lo que no se podía confirmar que existiera una hidrólisis proteolítica durante la preparación de la muestra para la cromatografía ni durante su fraccionamiento con dicha técnica.

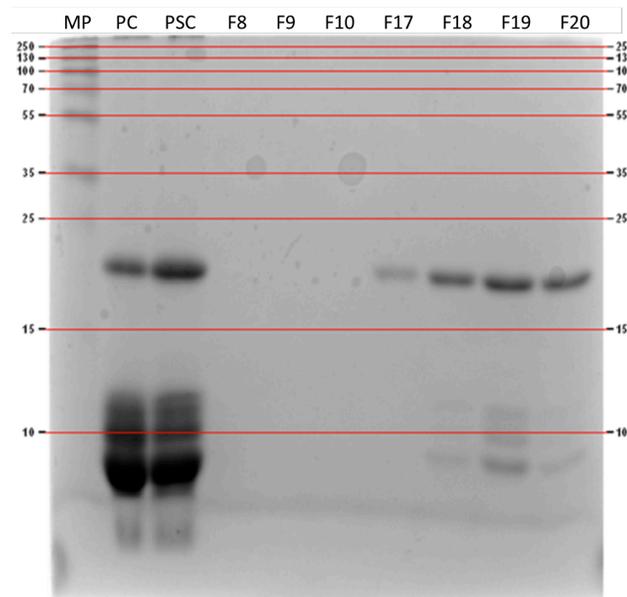


Figura 6.7 SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular del extracto diafiltrado de *B. karatas*. MP, Marcador de peso molecular; PC, Precolumna congelado; PSC, Precolumna sin congelar; y F, fracción.

### 6.5 Separación por tamaño molecular de las proteínas presentes en los extractos diafiltrados de *B. pinguin*

En el cromatograma de la fig. 6.7 correspondiente a la cromatografía de exclusión molecular de los extractos diafiltrados de *B. pinguin* se pudo observar un pequeño pico de absorbancia en las primeras fracciones (8 y 9) y un pico de absorbancia de mayor área entre las fracciones 15 y 18 de manera similar al caso de la muestra de *B. karatas*.



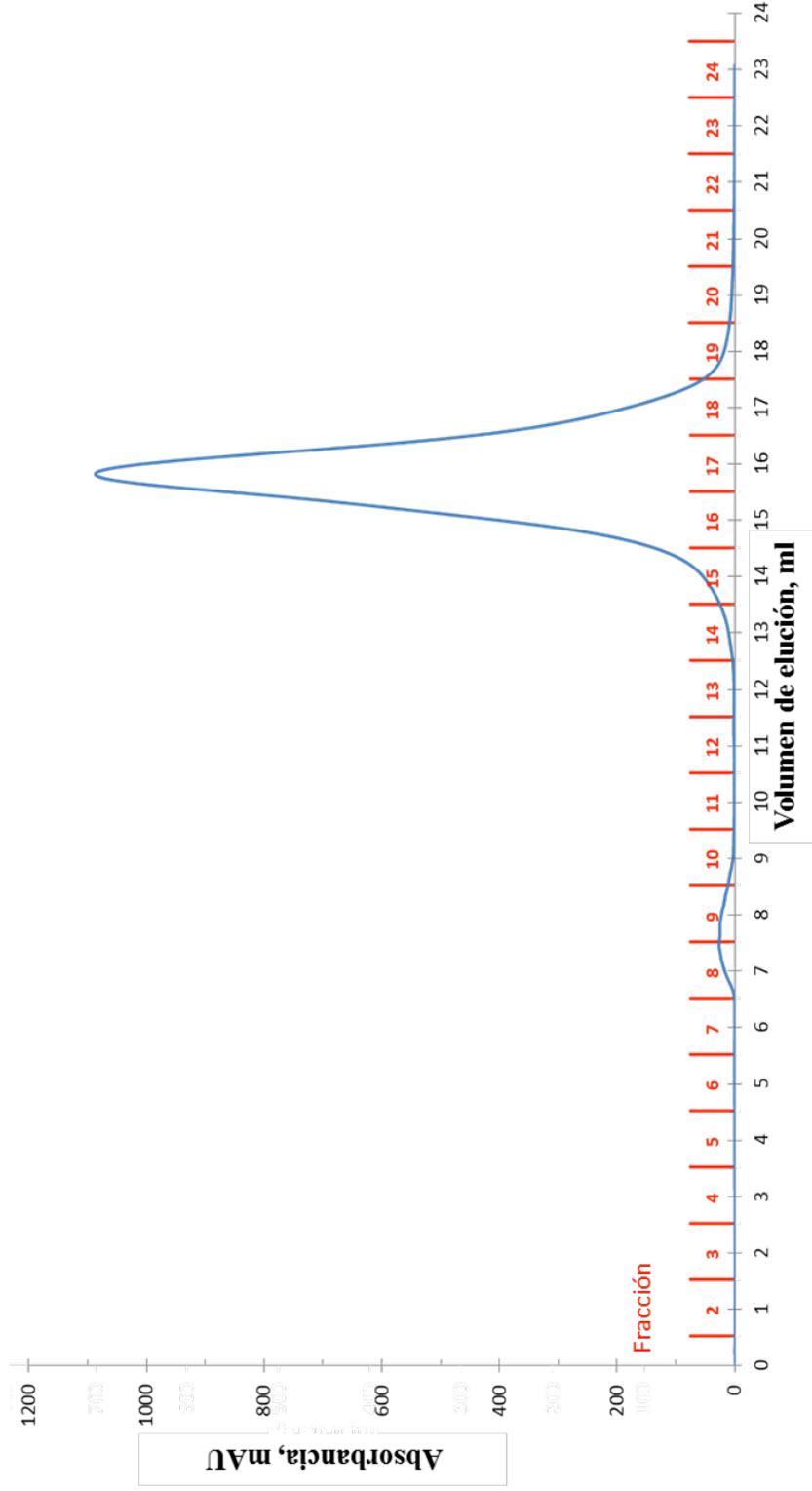


Figura 6.8 Cromatograma de la separación por exclusión molecular de los extractos enzimáticos diafiltrados de *B. pinguin*.

Estas fracciones se cargaron en un gel de SDS-PAGE para verificar la purificación dando como resultado el gel de la fig. 6.8, en el cual se pudo observar que las fracciones de *B. pinguin* presentaron las bandas correspondientes a las proteasas (aproximadamente 20 kDa) (Payrol y cols. 2005; Payrol y cols. 2008), sin embargo al igual que en el caso de los extractos diafiltrados de *B. karatas* se observaron bandas con pesos moleculares inferiores a 15 kDa, por lo que se concluyó lo mismo que en el caso de las fracciones de los extractos proteolíticos correspondientes a la fruta de *B. karatas*.

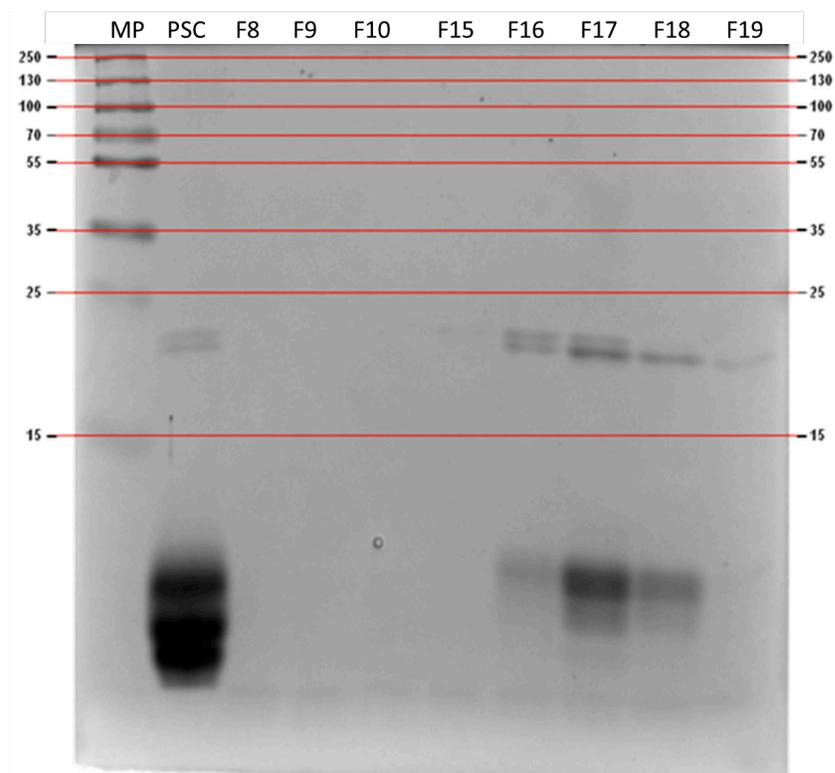


Figura 6.9 SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular del extracto diafiltrado de *B. pinguin*. MP, Marcador de peso molecular; P, Precolumna; y F, fracción.

### **6.6 Separación por tamaño molecular de las proteínas presentes en los extractos diafiltrados de *B. karatas* inhibidos**

El cromatograma obtenido empleando el extracto enzimático diafiltrado de *B. karatas* inhibido y una fase móvil con el inhibidor se muestran en la fig. 6.9. Al comparar el cromatograma obtenido empleando el coctel de inhibidores (fig. 6.9) con el cromatograma obtenido sin inhibidores (fig. 6.5) no se encontró diferencia por lo que podía descartar la posibilidad de una hidrólisis proteolítica en las fracciones obtenidas por exclusión molecular.



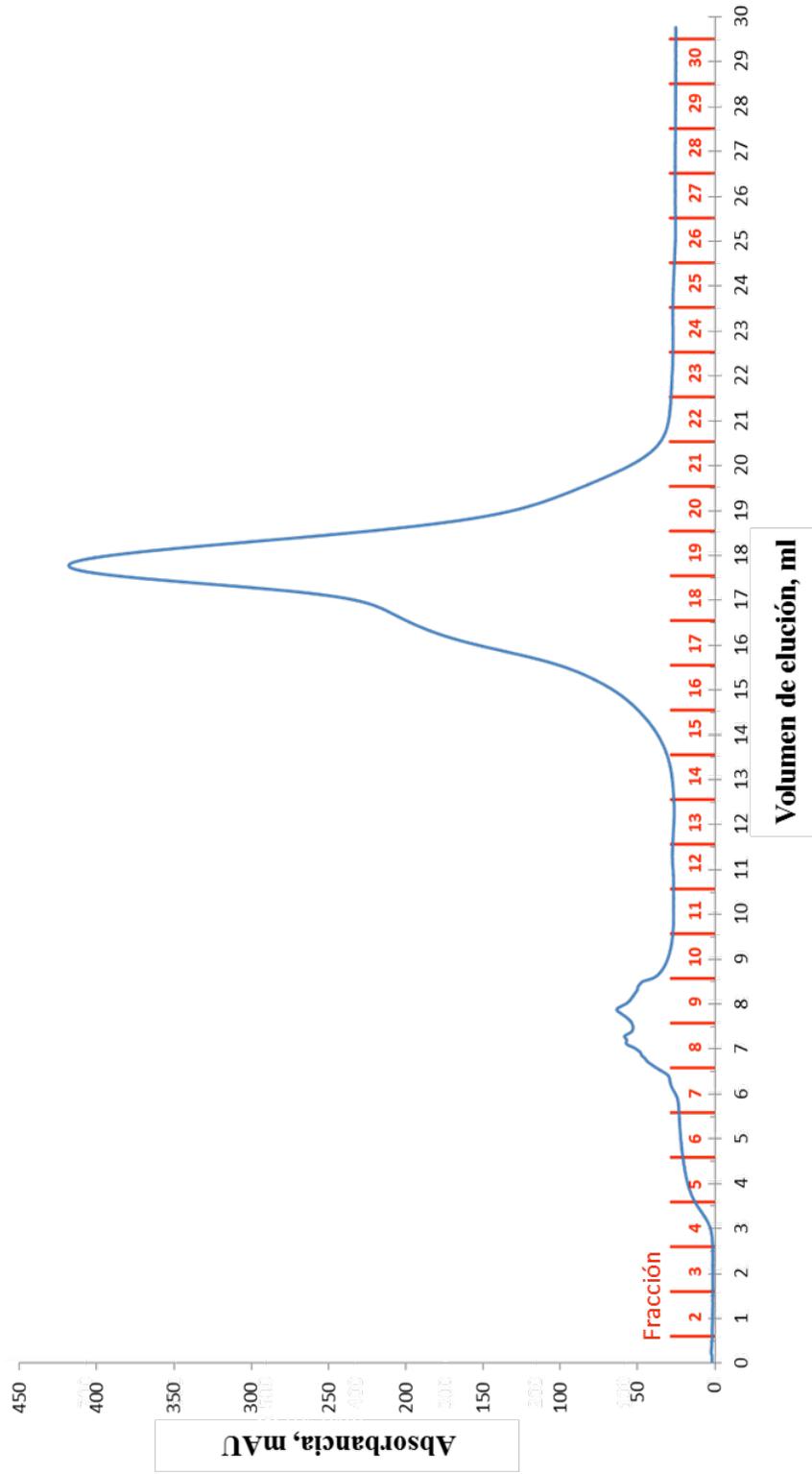


Figura 6.10 Cromatograma de la separación por exclusión molecular de los extractos enzimáticos diafiltrados de *B. karatas* con el coctel de inhibidores de proteasas cOmplete.

El SDS-PAGE de las fracciones correspondientes a los picos de absorbancia se muestra en la fig. 6.10. En este gel (fig. 6.10) nuevamente se observó la presencia de bandas correspondientes a pesos moleculares cercanos a los 10 kDa, por lo que se propuso que estas bandas y las de 20 kDa eran producto de la separación de las subunidades de proteínas con estructuras cuaternarias y no derivadas de una hidrólisis proteolítica, sin embargo para verificarlo se realizó un zimograma y un seminative-PAGE de los extractos diafiltrados los cuales se presentan en los apartados siguientes.

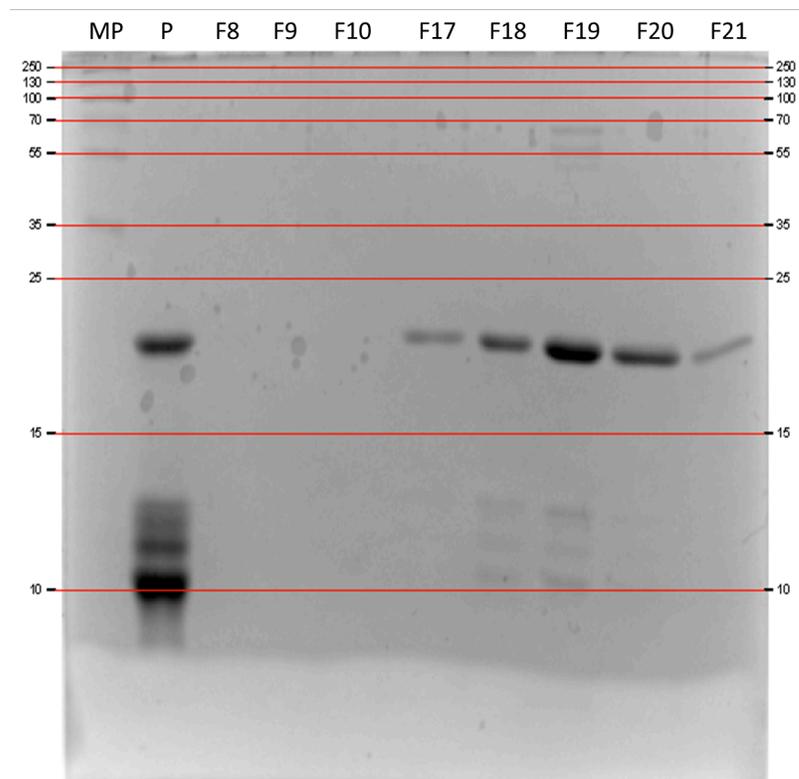


Figura 6.11 SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular del extracto diafiltrado de *B. karatas*. MP, Marcador de peso molecular; P, Precolumna; y F, fracción.

### **6.7 Separación por tamaño molecular de las proteínas presentes en los extractos diafiltrados de *B. pinguin* inhibidos**

En la fig. 6.11 se muestra el cromatograma obtenido empleando el extracto enzimático diafiltrado de *B. pinguin* inhibido y una fase móvil con el inhibidor en el cual se pudo observar que no existen diferencias con respecto al cromatograma obtenido sin inhibidor (fig. 6.7).



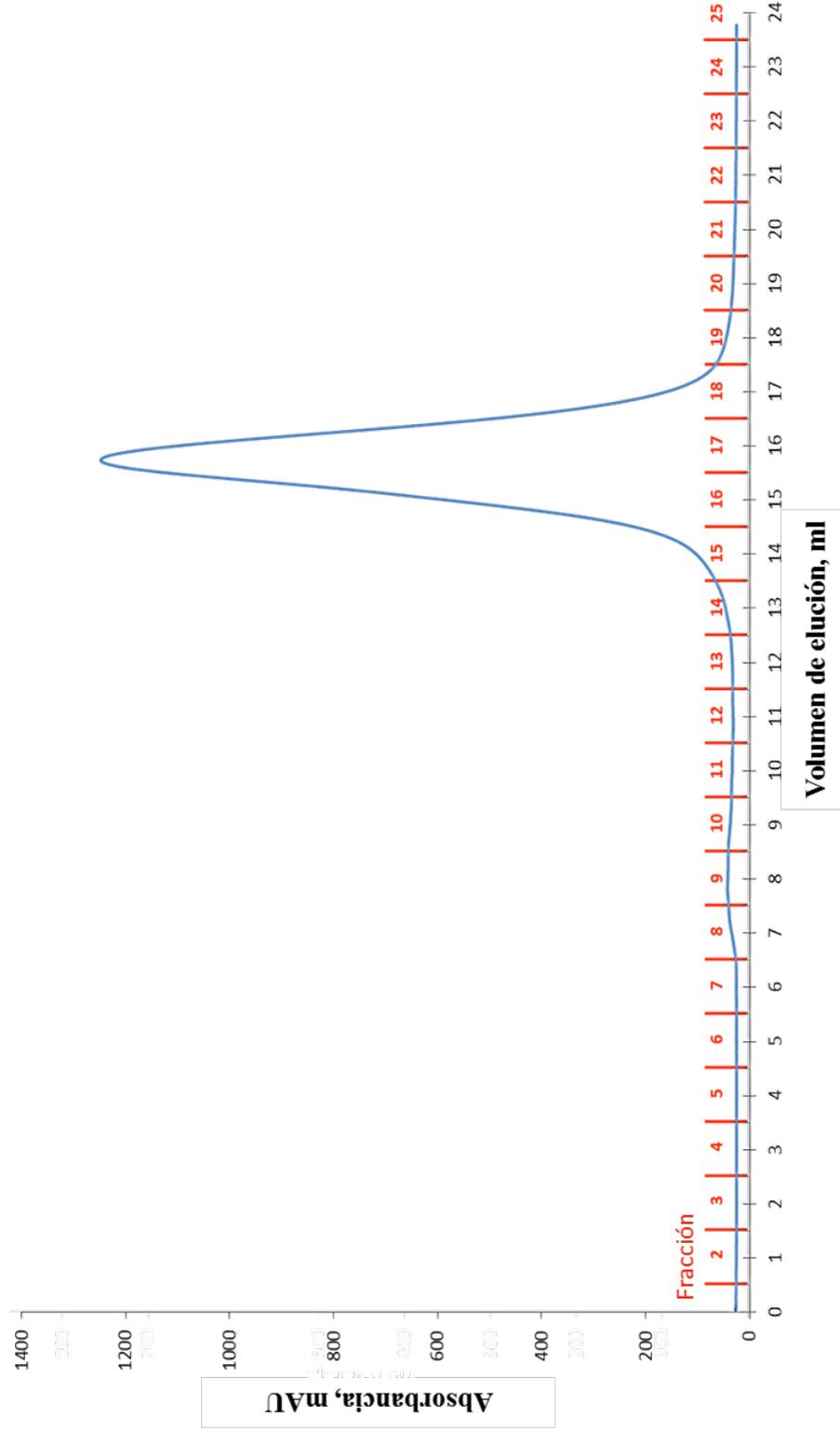


Figura 6.12 Cromatograma de la separación por exclusión molecular de los extractos enzimáticos diafiltrados de *B. pinguin* con el coctel de inhibidores de proteasas cOplete.

En la fig. 6.12 se puede observar que las fracciones correspondientes a los picos de absorbancia de la cromatografía de exclusión molecular con inhibidores presentaron las bandas correspondientes a pesos moleculares cercanos a los 10 kDa y las de 20 kDa, por lo que se propuso la misma explicación que en el caso de los extractos proteolíticos del fruto de *B. karatas*.

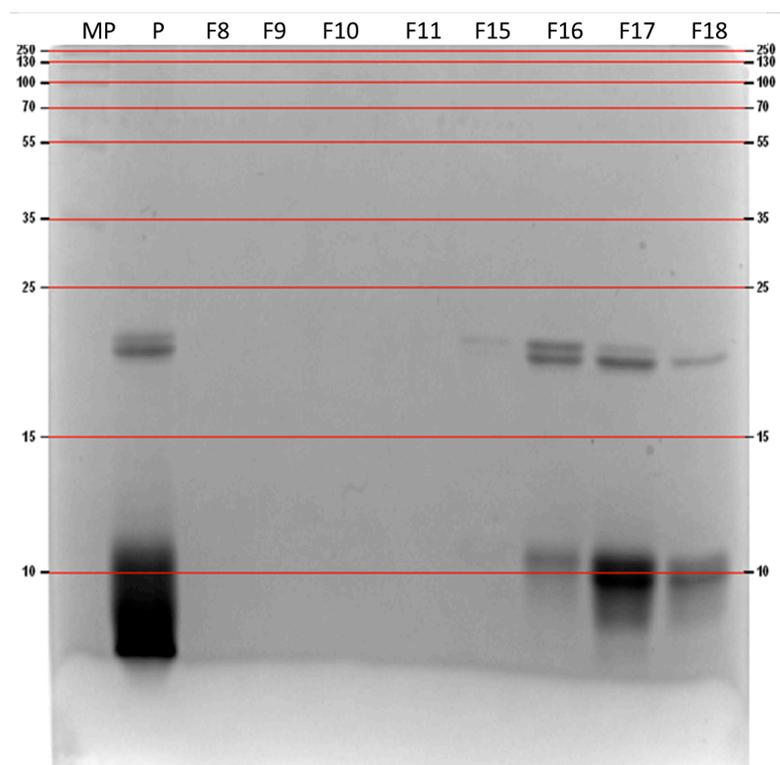


Figura 6.13 SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular del extracto diafiltrado de *B. pinguin*. MP, Marcador de peso molecular; P, Precolumna; y F, fracción.

### **6.8 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones semidesnaturalizantes (semnative-PAGE) y zimograma**

Para verificar que los extractos proteolíticos de los frutos de *B. karatas* y *B. pinguin* se encontraban inactivos por los inhibidores empleados se realizó un semnative-PAGE y un zimograma. En la fig. 6.13a se observó que al cargar las muestras en condiciones no desnaturalizantes en los geles de poliacrilamida las bandas de proteínas se posicionan en una altura equivalente a proteínas de alto peso molecular (aproximadamente 55 kDa) según el estándar de peso molecular empleado. Esto se debe a que en condiciones no desnaturalizantes las proteínas que presentan estructuras cuaternarias continúan con su estructura nativa, es decir con sus subunidades unidas. Esta teoría fue reforzada con la nula aparición de las bandas de bajo peso molecular que se observaron al realizar un SDS-PAGE de los mismos extractos. Sin embargo para confirmar esta teoría se realizaron Native-PAGE y se analizó el efecto del DTT y del calor sobre las proteínas de los extractos, mismos que se muestran posteriormente.

En el zimograma (fig. 6.13b) se pudo observar la presencia de bandas blancas correspondientes a las bandas de proteínas con actividad proteolítica, así mismo se apreció una menor intensidad en las bandas blancas de los carriles correspondientes a los extractos inhibidos con respecto a los carriles con los extractos que no se encontraban inhibidos, lo cual implica que solo se logró una inhibición parcial de los extractos enzimáticos diafiltrados de ambas frutas, posiblemente debido a la concentración de los extractos o al tipo de proteasa. Según la ficha técnica del coctel de inhibidores cOplete, solo inhibe un 73% una solución de papaína (1 mg/ml) después de incubarla por 60 min a una temperatura entre 15 °C y 25 °C.

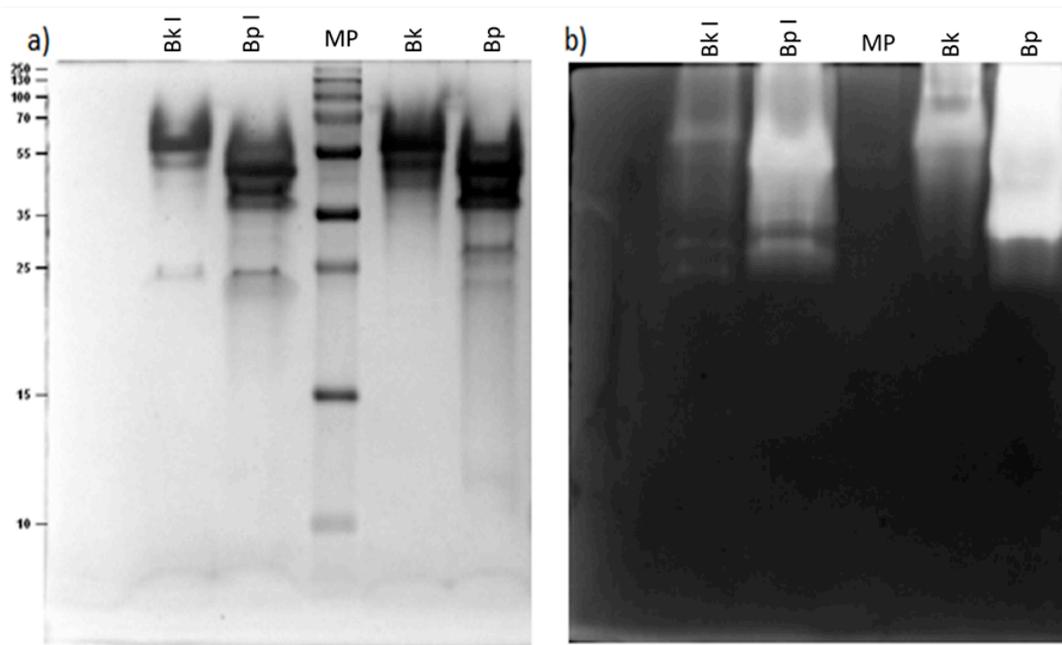


Figura 6.14 SDS-PAGE semidesnaturalizante (a) y zimograma (b) comparando la inhibición de extractos diafiltrados de *B. pinguin* y *B. karatas*. Bk I, *B. karatas* con inhibidor; Bp I, *B. pinguin* con inhibidor; MP, Marcador de peso molecular; Bk, *B. karatas*; y Bp, *B. pinguin*.

### 6.9 Isoelectroenfoque

En la fig. 6.14 se muestra el isoelectroenfoque en el cual se apreció que en los extractos diafiltrados de ambas frutas existen una gran cantidad de bandas lo cual significa que los extractos diafiltrados están conformados por una mezcla compleja de proteínas con puntos isoeléctricos diferentes. El extracto de la fruta de *B. karatas* presentó pI's de 3.5 a 6.5, mientras que el extracto de la fruta de *B. pinguin* presentó pI's de 3.9 a 8.6 observándose bandas con pI's similares a los reportados por Payrol y cols., (2005) para extractos de *B. pinguin* en frutas de Cuba. La diferencia entre los puntos isoeléctricos en las proteínas de

los extractos enzimáticos de ambos frutos permite la posibilidad de purificar las proteínas por medio de una cromatografía de intercambio iónico. Además, en el mismo trabajo Payrol y cols., (2005) reportaron que varias de esas proteínas presentan actividad proteolítica y las proteasas con diferentes pI's presentaron diferente afinidad hacia los sustratos evaluados (Payrol y cols., 2008).

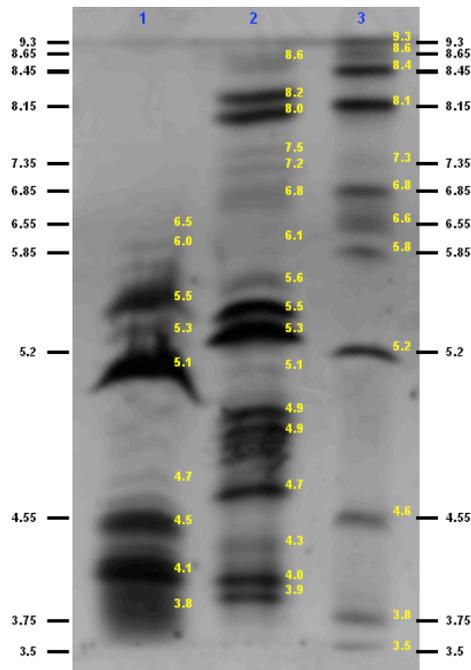


Figura 6.15 Isoelectroenfoque. Carril: 1) Extracto precipitado-dializado *B. karatas*; 2) Extracto precipitado-dializado *B. pinguin*; 3) Marcadores de pI

### 6.10 Cromatografía de intercambio iónico de los extractos diafiltrados de *B. karatas*

En la fig. 6.15 se muestra el cromatograma obtenido a partir de la cromatografía de intercambio iónico de los extractos enzimáticos diafiltrados de los frutos de *B. karatas*. En este cromatograma (fig. 6.15) se apreciaron al menos cuatro grupos de proteínas eluidos a distintas concentraciones de cloruro de sodio. Se realizaron isoelectroenfoces de las fracciones correspondientes a esos picos de absorbancia para verificar si estos grupos consisten en una sola proteína o en varias.

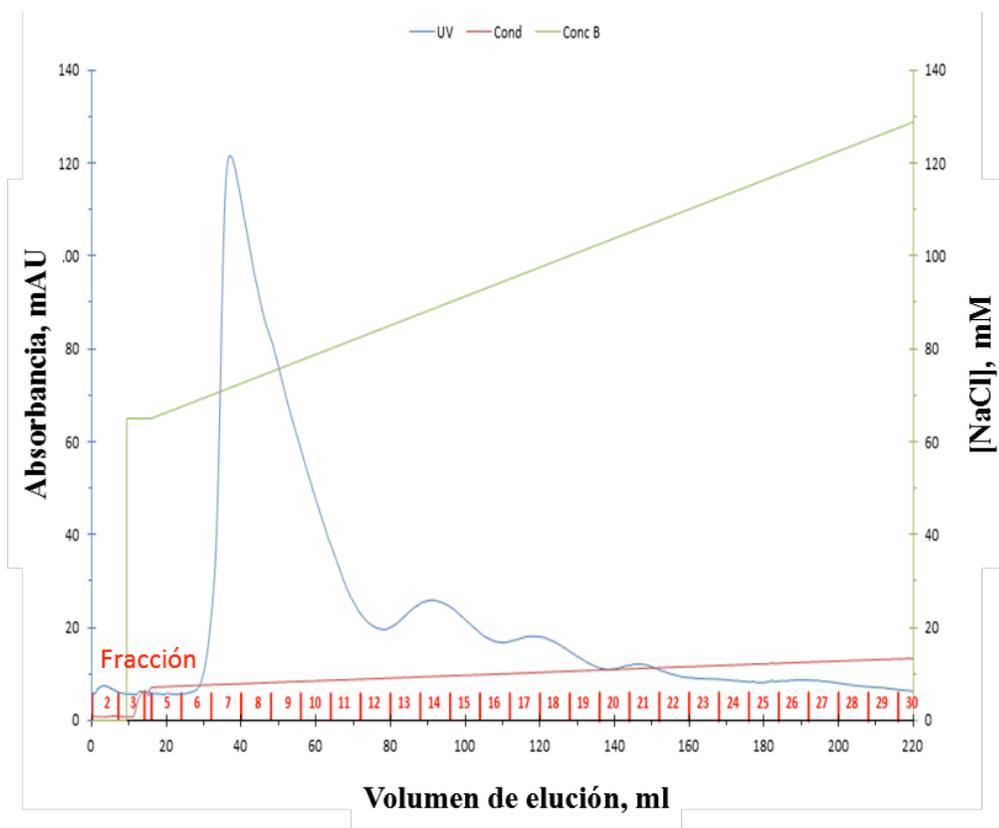


Figura 6.15 Cromatografía de intercambio aniónico *B. karatas* con el nuevo gradiente de NaCl para mejorar la separación de las proteínas.

En el cromatograma (fig. 6.15) se apreciaron picos anchos y en ocasiones encimados, esto es debido a que los puntos isoeléctricos de algunas proteínas de los extractos de las frutas son relativamente cercanos, sin embargo esto fue suficiente para dilucidar respecto al número de enzimas proteolíticas en los extractos de *B. karatas* como se explica con los resultados posteriores. En caso de requerir las proteínas separadas sería necesario realizar varias etapas de cromatografía de intercambio iónico variando el pH de la fase móvil en cada una de ellas.

Las fracciones correspondientes a los picos de absorbancia se cargaron en seminative-PAGE y zimograma dando como resultado los geles de la fig. 6.16. En el seminative-PAGE (fig. 6.16a) se observó que las proteínas presentes en las fracciones muestran pesos moleculares relativamente altos y en el zimograma (fig. 6.16b) se observaron bandas blancas a las alturas correspondientes de las bandas del seminative-PAGE (fig. 6.16a) lo cual confirmó que las fracciones obtenidas durante la cromatografía de intercambio iónico presentan actividad y que existen dos o más proteasas diferentes en los extractos de *B. karatas*.

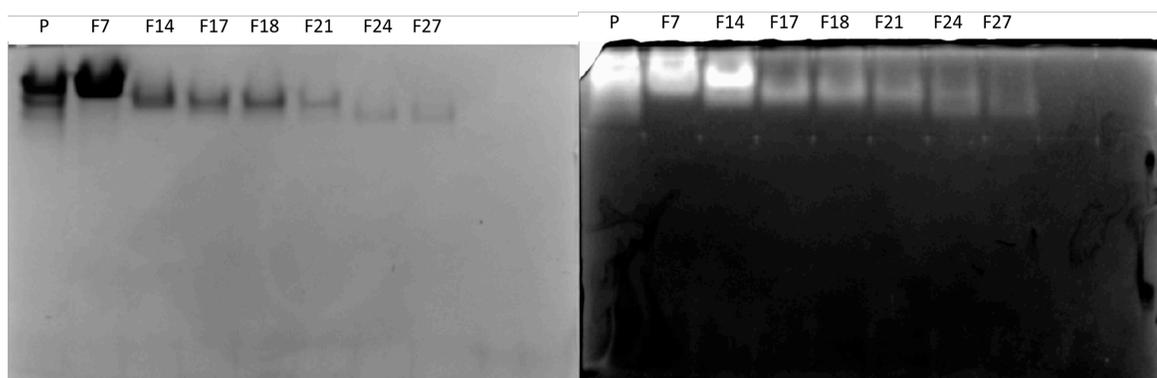


Figura 6.166 Seminative-PAGE y zimograma de las fracciones obtenidas a partir de la cromatografía de intercambio anionico de los extractos diafiltrados de *B. karatas*. P, Precolumna; y F, Fracción.

En la fig. 6.17 se observó que los diferentes carriles están conformados por diversas bandas de proteínas con pI's diferentes, repitiéndose en algunos casos las bandas en más de un carril, lo que implica que las muestras correspondientes a las fracciones 7, 14, 17, 18, 21, 24 y 27 obtenidas de la cromatografía de intercambio iónico del extracto de *B. karatas* consisten en proteínas con pI's distintos, sin embargo en el caso de las fracciones 7, 14, 17 y 18 parece tratarse de varias proteínas, algunas de ellas con actividad proteolítica (fig. 6.16b). Al analizar el zimograma (fig. 6.16b) y los isoelectroenfoques (fig. 6.17) se observó que de las fracciones 7, 14, 17 y 18, únicamente se repiten las bandas de pI en las fracciones 17 y 18, por lo que los extractos de *B. karatas* están compuestos por al menos tres proteasas distintas.

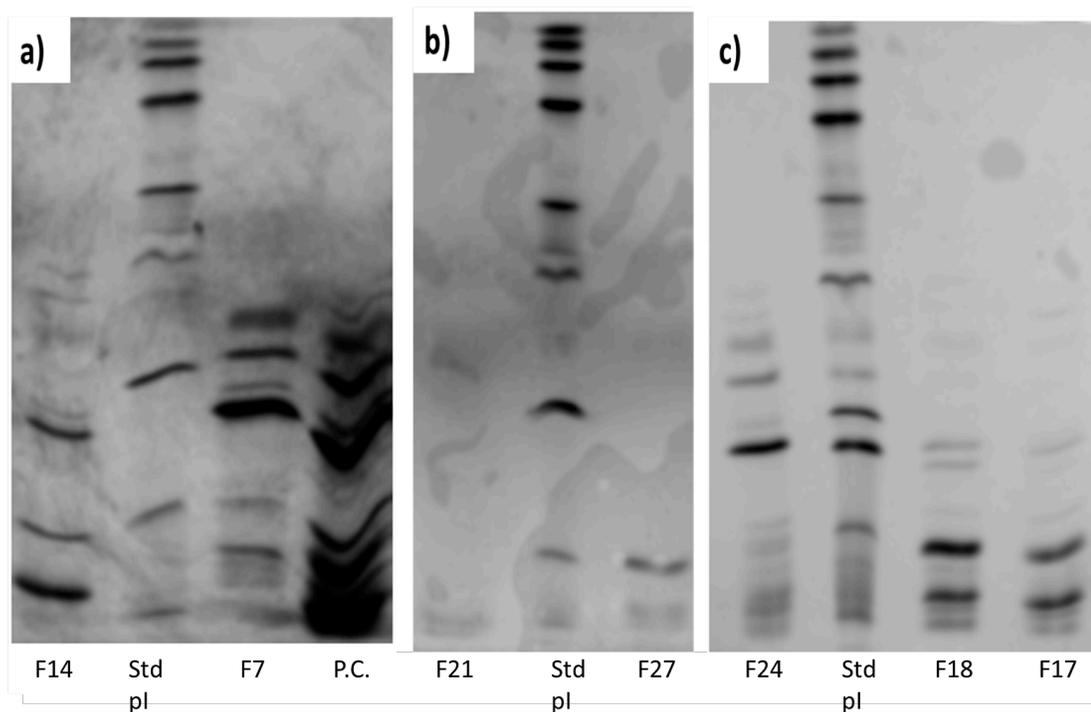


Figura 6.17 Isoelectroenfocos de las fracciones obtenidas por intercambio iónico de los extractos diafiltrados de *B. karatas*. F, fracción.

### 6.11 Cromatografía de intercambio iónico de los extractos diafiltrados de *B. pinguin*

En la fig. 6.18 se muestra el cromatograma obtenido a partir de la cromatografía de intercambio iónico de los extractos enzimáticos diafiltrados de los frutos de *B. pinguin*. En este cromatograma (fig. 6.18) se apreciaron al menos cinco grupos de proteínas eluidos a distintas concentraciones de cloruro de sodio. Se realizaron isoelectroenfocos de las fracciones correspondientes a los picos de absorbancia para verificar si estos grupos consisten en más de una proteína.

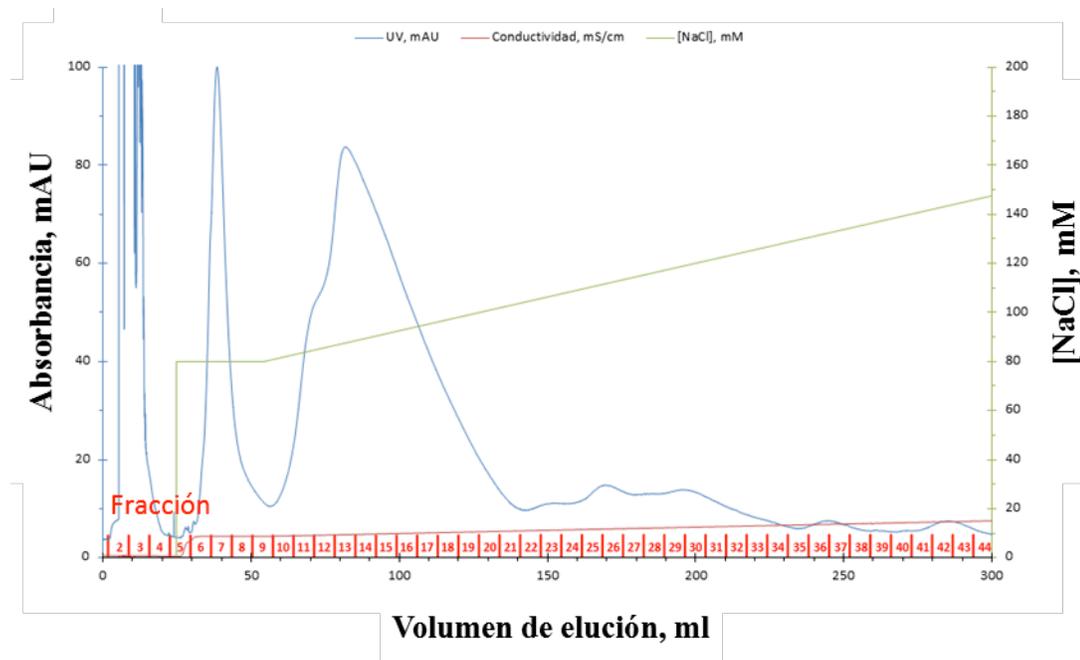


Figura 6.18 Cromatografía de intercambio aniónico *B. pinguin* con el nuevo gradiente de NaCl para mejorar la separación de las proteínas.

En el cromatograma anterior (fig. 6.18) aparecen picos anchos y en ocasiones encimados debido a que los puntos isoeléctricos de las proteínas de los extractos de las frutas son relativamente cercanos, sin embargo esto fue suficiente para dilucidar respecto al número de proteasas presentes en los extractos de *B. pinguin* como se explica con los resultados posteriores.

Las fracciones correspondientes a los picos de absorbancia se cargaron en seminative-PAGE y zimograma dando como resultado los geles de la fig. 6.19. En el seminative-PAGE (fig. 6.19a) se apreció que las proteínas presentes en las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico muestran pesos moleculares relativamente altos y en el zimograma (fig. 6.19b) se observaron bandas blancas a las alturas correspondientes de las bandas del seminative-PAGE lo cual confirma que las fracciones obtenidas presentan actividad proteolítica y por lo tanto los extractos proteolíticos pueden conformarse por varias proteasas con estructuras moleculares distintas.

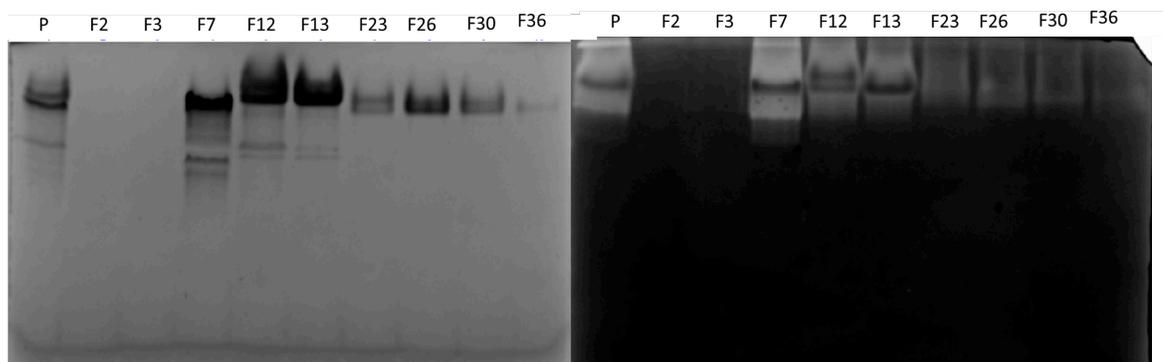


Figura 6.19 Seminative-PAGE y zimograma de las fracciones obtenidas a partir de la cromatografía de intercambio aniónico de los extractos diafiltrados de *B. pinguin*. P, Precolumna; y F, Fracción.

En la fig. 6.20 se observó que las fracciones 7, 12, 36 y 30 obtenidas de la cromatografía de intercambio iónico de los extractos de la fruta de *B. pinguin* consisten en proteínas con distintos pI, solo coincidiendo en la fracción 12 y 30 una banda con pI de 6.0. Además se observó que, al igual que en el fruto de *B. karatas*, algunas fracciones están compuestas por más de una banda de proteína por lo que no se puede afirmar si la actividad observada en el zimograma (fig. 6.19b) es producto de una sola enzima o de un conjunto de estas con pI relativamente cercanos.

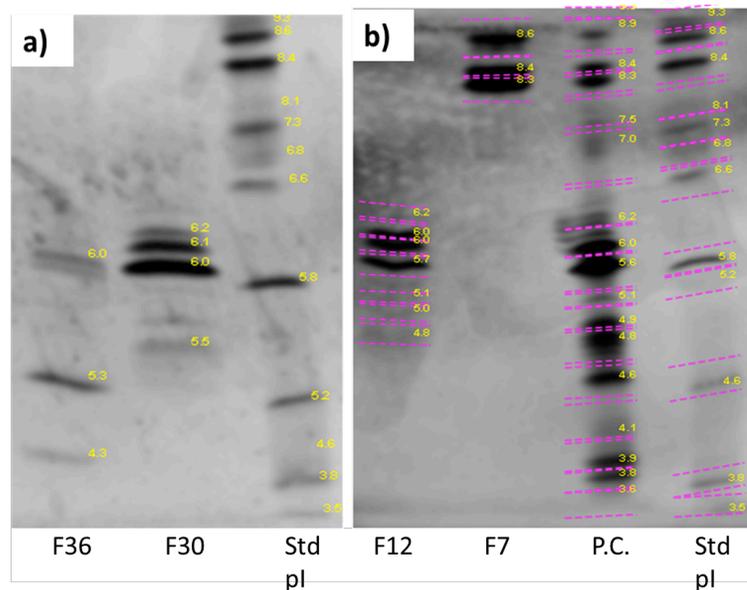


Figura 6.20 Isoelectroenfoque de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico del fruto de *B. pinguin*. F, Fracción.

En los isoelectroenfoques, tanto de *B. karatas* como *B. pinguin*, se observó que las fracciones analizadas que presentaron actividad realmente se tratan de distintas enzimas proteolíticas lo cual coincide con lo reportado por Payrol y cols. (2005) en el caso de *B. pinguin*, además en otro trabajo los autores demuestran que estas presentan distintos sitios de hidrólisis (Payrol y cols., 2008), lo cual fue benéfico para este proyecto ya que las enzimas pueden hidrolizar en distintos sitios de corte en una misma proteína sustrato y, finalmente, se traduce en péptidos de menor peso molecular (Bamdad y cols., 2011) (en la fig. 6.21 se ejemplifica ésta propuesta), los cuales presentan mayor probabilidad de tener actividad biológica.



Figura 6.21 Ejemplo de hidrólisis con proteasas de sitios de corte distintos

### 6.12 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (native-PAGE) de los extractos diafiltrados de *B. karatas* y *B. pinguin*

El gel obtenido se muestra en la fig. 6.22 en la cual se observaron bandas de proteínas de pesos moleculares cercanos a los 60 kDa según el marcador de peso molecular empleado. Realizando un análisis de las bandas se observó que las proteínas que componen los complejos de proteína presentan pesos moleculares cercanos a los 66 kDa. Este resultado confirmó la teoría propuesta referente a proteínas con estructuras cuaternarias conformadas por subunidades de pesos moleculares de 20 y 10 kDa debido a que en condiciones nativas, como se apreció en la fig. 6.22, estas bandas no aparecen en el gel.

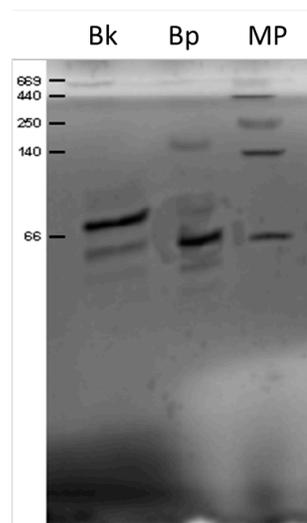


Figura 6.22 Native-PAGE en gel homogéneo 20% de los extractos diafiltrados. Bk, *B. karatas*; Bp, *B. pinguin*; y MP, Marcador de peso molecular.

### **6.13 Efecto del DTT y el calor sobre las proteínas de los extractos diafiltrados de *B. karatas* y *B. pinguin***

En la fig. 6.23 se muestra los geles obtenidos para el efecto del DTT y el calor sobre las proteínas presentes en los extractos enzimáticos diafiltrados de los frutos de *B. karatas* y *B. pinguin*. Al analizar los carriles correspondientes a las muestras en condiciones no desnaturizantes se observaron bandas con pesos moleculares relativamente altos, los cuales además presentan bandas blancas en el zimograma (fig. 6.23b) lo que indica que estas presentan actividad proteolítica. Al prestar atención en los carriles correspondientes a las muestras con la adición de DTT y sin calentar se observó la aparición de barridos y bandas de bajo peso molecular en el PAGE (fig. 6.23a) mientras que en el zimograma (fig. 6.23b) se apreció una disminución de la actividad proteolítica con respecto a las muestras sin DTT, además se observó que las bandas de bajo peso molecular no presentaron bandas blancas por lo que en estas condiciones no presentaron actividad proteolítica. Finalmente al enfocar la atención en los carriles correspondientes a las muestras en condiciones desnaturizantes se pudo apreciar que las bandas de alto peso molecular desaparecieron permaneciendo únicamente bandas con pesos moleculares menores a 15 kDa y al observar su equivalente en el zimograma (fig. 6.23b) se pudo apreciar que no existieron bandas blancas por lo que no presenta actividad proteolítica.

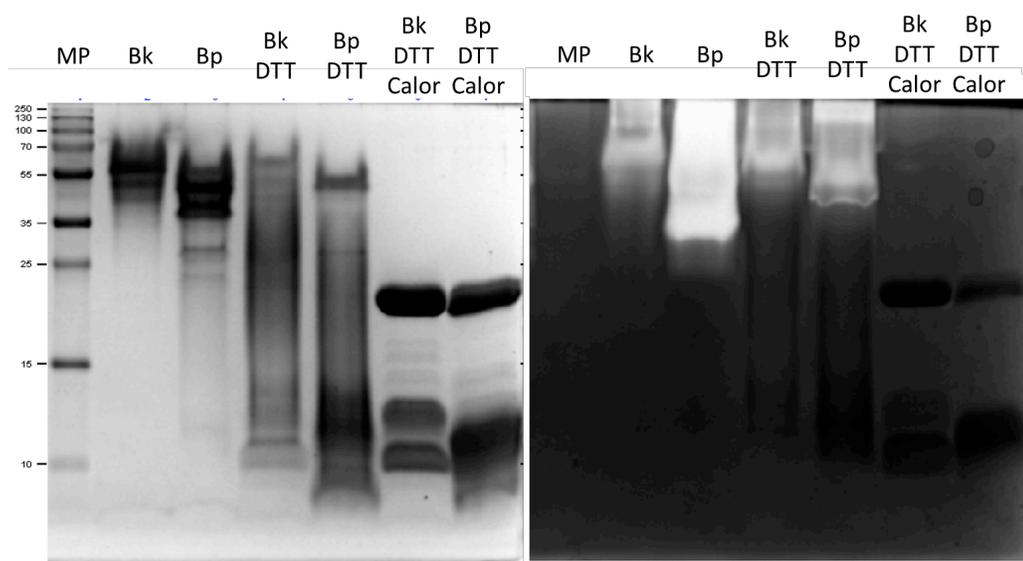


Figura 6.23 SDS-PAGE y zimograma para comprobar el efecto del DTT sobre las proteínas presentes en los extracotos diafiltrados de *B. karatas* y *B. pinguin*. MP, Marcador de peso molecular; Bk, *B. karatas*; y Bp, *B. pinguin*.

Esos resultados se deben a que el DTT es un agente reductor de grupos sulfhidrilo empleado para eliminar los puentes disulfuro entre una o varias cadenas polipeptídicas, y el efecto observado al combinar el DTT y el calor es debido a que, al emplear condiciones reducidas (agente reductor y calor) en una electroforesis, las proteínas con estructuras cuaternarias se separan en sus respectivas subunidades tras desaparecer las interacciones que estabilizan dichas estructuras como los puentes de hidrógeno y los puentes disulfuro (Jones y Thornton, 1995).

Es importante mencionar que la concentración de DTT empleada en esta prueba es la misma que empleó (Payrol y cols., 2005) y con la cual reportaron actividad proteolítica en los extractos de *B. pinguin*, esto debido a que estas enzimas son cisteín proteasas por lo que el DTT en concentración bajas favorece la formación del grupo sulfhidrilo (-SH) permitiendo que el sitio activo de la enzima se encuentre más reactivo.

Los resultados obtenidos son similares a lo reportado por Singh y cols. (2008), quienes realizaron una electroforesis en condiciones reductoras (desnaturalizante) y no reductoras (no desnaturalizante) de una serín proteasa extraída de *Morus indica* cv. K2 apreciando que en condiciones no desnaturalizantes esta presenta un peso molecular de aproximadamente 120 kDa y en condiciones desnaturalizantes un peso molecular de aproximadamente 66 kDa, comprobando por MALDI-TOF MSES+ que realmente se trata de un dímero conformado por una subunidad de 67.195 kDa y otra de 67.302 kDa. Adicionalmente muestran por medio de un zimograma que la serín proteasa presenta actividad solo cuando se encuentra en su conformación de dímero.

Al comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo con el de Singh y cols. (2008), se confirma que las proteasas presenten en los extractos diafiltrados analizados presentan estructuras cuaternarias, siendo estas últimas necesarias para la actividad proteolítica.

## **Etapas 2: Hidrólisis de las proteínas de cabeza de camarón**

### **6.14 Actividad proteolítica de los extractos enzimáticos empleados en las hidrólisis**

Se determinó la actividad proteolítica de los extractos concentrados previamente a su empleo en las hidrólisis obteniendo: 21.93 U<sub>T</sub> para el extracto de *B. karatas*, 43.58 U<sub>T</sub> para el extracto de *B. pinguin* y 27.83 U<sub>T</sub> bromelina. Para el caso de *B. karatas* y *B. pinguin* se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford, sin embargo para el caso de la bromelina se consideró como pura.

### **6.15 Concentración de las proteínas de camarón previo a la hidrólisis enzimática**

Previo a la hidrólisis se determinó la concentración de proteína soluble de camarón en el medio (Anexo D). Los valores obtenidos mostraron que la concentración de proteína total aumenta con la concentración de sustrato empleado y a mayor pH de la solución (fig. 6.24). El efecto de la cantidad de sustrato sobre la concentración de proteína total se explica considerando que al adicionar una mayor cantidad de sustrato en un volumen constante el valor de la concentración aumenta. El efecto del pH observado en este trabajo

es similar a lo reportado por la investigación realizada por Gómez-Estaca y cols. (2014) donde se desarrolló una electroforesis de la proteína del músculo del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en soluciones a distintos pH dando lugar a cambios en los perfiles proteicos lo cual indica que los diferentes pH empleados no solo modifica la concentración de proteína sino que además puede modificar la solubilización, secuencias y pesos moleculares.

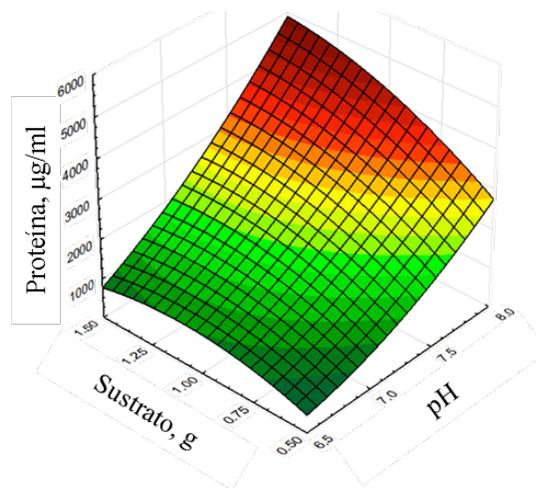


Figura 6.24 Efecto de la cantidad de sustrato y el pH sobre la concentración de proteína total.

### 6.16 Concentración de grupos $\alpha$ -NH<sub>2</sub>

Los valores obtenidos para cada una de las enzimas empleadas se presentan en el Cuadro 6.1, en estos valores se observó una variación entre los tratamientos de Taguchi y, en algunos tratamientos, se observó diferentes valores entre la enzima empleada.

Las ANOVAS y las gráficas generadas por el análisis del diseño de Taguchi se presentan en el Anexo D. Es importante mencionar que la significancia ( $p < 0.05$ ) de los factores solo puede ser considerada dentro del rango de los niveles empleados en cada factor.

El análisis mostró que para *B. karatas* todas las variables fueron significativas ( $p < 0.05$ ) (Anexo D1), lo cual se esperaba ya que las enzimas presentan diferentes actividades en diferentes valores de pH y temperatura, factores que también afectan al sustrato empleado por ser proteínas (Somero, 1995; Casal y Mantsch, 1988). En el caso de los factores cantidad de sustrato y cantidad de enzima existe una relación entre ellas ya que la teoría enzimática establece que la velocidad de la actividad enzimática depende de la concentración de sustrato y enzima empleados (Michaelis y Menten, 1913).

Cuadro 6.1 Concentración de  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> en hidrolizados de cabeza de camarón por efecto de pH, temperatura, tiempo, cantidad de sustrato y cantidad de enzima.

pH	Temperatura °C	Tiempo h	Sustrato g	Enzima* µg	Concentración de grupos $\alpha$ -NH <sub>2</sub> , meq de L-leucina/g		
					<i>B. karatas</i>	<i>B. pinguin</i>	Bromelina**
6.5	25	0.5	0.5	50	68.4 ± 2.7	39.8 ± 0.4	43.6 ± 2.7
6.5	30	1	0.75	100	37.1 ± 1.3	38.6 ± 2.2	36.1 ± 0.4
6.5	35	2	1	150	35.3 ± 1.0	40.1 ± 1.7	37.7 ± 1.4
6.5	40	4	1.5	250	38.2 ± 1.5	38.2 ± 2.7	35.4 ± 2.2
7	25	1	1.5	150	37.3 ± 1.0	40.4 ± 1.3	33.3 ± 2.0
7	25	1	1.5	150	36.8 ± 1.5	38.4 ± 3.7	-
7	25	1	1.5	150	39.7 ± 1.5	37.8 ± 2.3	-
7	30	0.5	1	250	32.6 ± 5.0	36.7 ± 2.0	47.0 ± 3.4
7	35	4	0.75	50	31.7 ± 1.2	34.7 ± 1.0	40.1 ± 5.7
7	40	2	0.5	100	30.7 ± 1.8	38.5 ± 1.9	38.5 ± 2.3
7.5	25	2	0.75	250	40.2 ± 2.5	37.0 ± 1.4	40.0 ± 0.2
7.5	30	4	0.5	150	37.4 ± 3.9	38.6 ± 5.4	37.3 ± 1.3
7.5	35	0.5	1.5	100	30.2 ± 0.3	38.2 ± 0.3	43.5 ± 2.5
7.5	40	1	1	50	33.7 ± 2.6	37.1 ± 0.8	30.9 ± 1.8
8	25	4	1	100	31.5 ± 2.6	36.0 ± 0.0	36.5 ± 1.1
8	30	2	1.5	50	36.0 ± 0.9	36.4 ± 1.8	47.2 ± 0.7
8	35	1	0.5	250	37.6 ± 5.17	46.9 ± 0.30	40.2 ± 2.1
8	40	0.5	0.75	150	28.6 ± 2.58	47.3 ± 1.24	30.6 ± 2.9

\*La concentración se determinó por el método de Bradford empleando como proteína estándar BSA, excepto para el caso de la bromelina que se obtuvo comercialmente y se preparó considerándola pura.

\*\*La bromelina se empleó como control positivo, para lo cual se mantuvo en todas las corridas su pH y temperatura óptimas, 7.0, 37°C respectivamente (Hernández y cols., 2005).

Para *B. pinguin* solo las variables pH, tiempo de hidrólisis y cantidad de sustrato fueron significativas ( $p < 0.05$ ) (Anexo D2), esto puede deberse a que según lo reportado por Payrol y cols. (2005) esta enzima presenta actividad en un amplio rango de temperatura por lo que puede no existir mucha diferencia en la actividad dentro del rango de temperaturas evaluadas. En el caso del factor cantidad de enzima puede no ser significativo debido a que con todas las concentraciones alcanza su velocidad máxima o una velocidad similar en todos los tratamientos ya que esta enzima presenta una actividad proteolítica alta comparada con las otras enzimas empleadas en el trabajo (Payrol y cols. 2005). El efecto del pH puede deberse al efecto de este sobre la concentración de la proteína sustrato que se mostró en el apartado anterior.

En el caso de bromelina solo se evaluaron las variables cantidad de sustrato, tiempo de hidrólisis y cantidad de enzima, de las cuales solo la cantidad de sustrato no fue significativa (Anexo D3), esto puede deberse a que la cantidad de sustrato fue demasiada en comparación con la cantidad de enzima empleada ya que, a diferencia de los otros extractos enzimáticos empleados, la bromelina presenta menos sitios de hidrólisis posibles por tratarse de una sola enzima (Inagami y Murachi, 1963; Xia y cols., 2012).

No existen reportes que emplearan las mismas variables para determinar su efecto sobre la concentración de grupos  $\alpha\text{-NH}_2$  durante la hidrólisis enzimática de proteínas de camarón, sin embargo Cheung y Li-Chan (2010) reportaron valores significativos para el efecto de porcentaje de enzima y casi significativo ( $p = 0.054$ ) para el tiempo de hidrólisis. Cabe señalar que durante dicho trabajo se emplearon otras proteasas y cocteles de proteasas comerciales, algunas de origen bacteriano, por lo que son poco comparables los resultados ya que las proteasas presentan diferentes sitios de hidrólisis además de poder ser de tipo endoproteasas y exoproteasas. Además en dicho artículo se puede observar que las proteasas microbianas empleadas generan grados de hidrólisis considerablemente mayores que la bromelina, proteasa empleada también en este trabajo.

### **6.17 Capacidad antioxidante por ABTS**

Los valores obtenidos para cada una de las enzimas empleadas se presentan en el Cuadro 6.2 donde se observó variación de los valores entre tratamientos y, en algunos tratamientos, se observó variación de los valores entre enzimas. Las ANOVAS y las gráficas generadas por el análisis del diseño de Taguchi se presentan en el Anexo E.

Cuadro 6.2 Capacidad antioxidante por el método ABTS en hidrolizados de cabeza de camarón por efecto de pH, temperatura, tiempo, cantidad de sustrato y cantidad de enzima.

pH	Temperatura, °C	Tiempo, h	Sustrato, g	Enzima*, µg	ABTS, mM Trolox		
					<i>B. karatas</i>	<i>B. pinguin</i>	Bromelina**
6.5	25	0.5	0.5	50	07.3 ± 0.5	08.0 ± 0.1	07.5 ± 0.1
6.5	30	1	0.75	100	10.3 ± 0.2	09.8 ± 0.2	08.8 ± 0.4
6.5	35	2	1	150	11.0 ± 0.2	11.1 ± 0.2	09.9 ± 0.2
6.5	40	4	1.5	250	12.0 ± 0.1	12.2 ± 0.1	11.1 ± 0.1
7	25	1	1.5	150	11.7 ± 0.1	12.1 ± 0.2	10.7 ± 0.2
7	25	1	1.5	150	13.2 ± 0.2	13.5 ± 0.1	-
7	25	1	1.5	150	12.9 ± 1.0	13.4 ± 0.1	-
7	30	0.5	1	250	10.9 ± 0.1	11.1 ± 0.2	09.9 ± 0.4
7	35	4	0.75	50	10.0 ± 0.1	09.7 ± 0.2	10.9 ± 0.3
7	40	2	0.5	100	08.1 ± 0.7	08.1 ± 0.2	06.9 ± 0.3
7.5	25	2	0.75	250	10.2 ± 0.1	09.8 ± 0.7	09.4 ± 0.0
7.5	30	4	0.5	150	08.2 ± 0.0	07.7 ± 0.6	07.5 ± 0.1
7.5	35	0.5	1.5	100	11.8 ± 0.1	12.9 ± 0.2	08.8 ± 0.4
7.5	40	1	1	50	11.1 ± 0.1	12.0 ± 0.2	09.9 ± 0.2
8	25	4	1	100	10.6 ± 0.2	11.7 ± 0.2	11.1 ± 0.1
8	30	2	1.5	50	12.1 ± 0.1	13.0 ± 0.0	10.7 ± 0.2
8	35	1	0.5	250	08.6 ± 0.1	07.0 ± 0.0	09.9 ± 0.4
8	40	0.5	0.75	150	08.9 ± 0.3	11.3 ± 0.1	10.9 ± 0.3

\*La concentración se determinó por el método de Bradford empleando como proteína estándar BSA, excepto para el caso de la bromelina que se obtuvo comercialmente y se preparó considerándola pura.

\*\*La bromelina se empleó como control positivo, para lo cual se mantuvo en todas las corridas su pH y temperatura óptimas, 7.0, 37°C respectivamente (Hernández y cols., 2005).

El análisis mostró que para *B. karatas* las variables tiempo, sustrato y enzima fueron significativas ( $p < 0.05$ ) (Anexo E1), lo cual se puede explicar considerando que en todos los niveles evaluados de pH y temperatura la enzima se encuentra activa por lo que puede hidrolizar la proteína sustrato y según los reportes existentes se propone que las proteasas presentes son del tipo exoproteasas (Montes y cols., 1990) por lo que con cada hidrólisis genera secuencias cortas de péptidos que permiten tener actividades antioxidantes. En el caso de los factores de cantidad de sustrato y cantidad de enzima pueden ser significativas porque estas dos están directamente relacionadas con la producción de péptidos, entre mayor es la concentración de sustrato también es mayor la concentración de péptidos y entre mayor la cantidad de enzimas mayor es la cantidad de hidrólisis posibles, así mismo entre mayor es el tiempo de hidrólisis mayor probabilidad de hidrolizar los enlaces adecuados para generar secuencias de aminoácidos con actividad antioxidante.

Para *B. pinguin* solo las variables pH, tiempo de hidrólisis, cantidad de sustrato y temperatura fueron significativas ( $p < 0.05$ ) (Anexo E2), esto puede deberse a que estos factores resultaron significativos en la concentración de grupos  $\alpha\text{-NH}_2$  lo que implica la generación de polipéptidos de secuencias variadas, solo la temperatura no mostró significancia en la variable concentración de grupos  $\alpha\text{-NH}_2$ , sin embargo su significancia en la actividad antioxidante puede explicarse debido a que aunque se hidrolice un número de enlaces similar provocando una liberación de un número de grupos  $\alpha\text{-NH}_2$  similares, esto no implica que los sitios de hidrólisis sean iguales y por lo tanto las secuencias obtenidas varíen, así como su capacidad de inhibir los radicales (Yao-wang, y cols., 2011; Yao-wang y Bo, 2013).

En el caso de bromelina las variables cantidad de sustrato y tiempo de hidrólisis fueron significativas (Anexo E3), lo cual puede deberse a que la cantidad de enzima por tratarse de una sola enzima, a diferencia de las otras dos empleadas que se tratan de complejos de proteasas, como se comprobó en la primer etapa de éste trabajo, siempre realiza la hidrólisis en los mismo sitios y esto implica secuencias similares en cada enlace hidrolizado por lo que la capacidad antioxidante depende de la concentración de dichas

secuencias y estas a su vez dependen directamente de la cantidad de sustrato y tiempo de reacción.

### **6.18 Capacidad antioxidante por el método de FRAP**

Los valores obtenidos para cada una de las enzimas empleadas se presentan en el Cuadro 6.3 y se pudo apreciar que en varios de los tratamientos no presentaron actividad antioxidante por este método, además se observó una variación entre tratamientos y, en algunos tratamientos, diferencia de valores entre enzimas. Las ANOVAS y las gráficas generadas por el análisis del diseño de Taguchi se presentan en el Anexo F.

El análisis mostró que para *B. karatas* todas las variables fueron significativas ( $p < 0.05$ ) (Anexo F1). Para *B. pinguin* solo las variables temperatura y tiempo de hidrólisis no fueron significativas ( $p < 0.05$ ) (Anexo F2). En el caso de bromelina las variables cantidad de sustrato y cantidad de enzimas fueron significativas (Anexo F3).

Cuadro 6.3 Capacidad antioxidante por el método FRAP en hidrolizados de cabeza de camarón por efecto de pH, temperatura, tiempo, cantidad de sustrato y cantidad de enzima.

pH	Temperatura, °C	Tiempo, h	Sustrato, g	Enzima*, µg	FRAP, µM Trolox		
					<i>B. karatas</i>	<i>B. pinguin</i>	Bromelina**
6.5	25	0.5	0.5	50	101.7 ± 5.7	ND	ND
6.5	30	1	0.75	100	33.7 ± 8.2	41.3 ± 9.3	73.5 ± 17.8
6.5	35	2	1	150	70.1 ± 14.6	66.8 ± 7.8	70.3 ± 14.7
6.5	40	4	1.5	250	139.7 ± 15.0	136.8 ± 15.1	155.4 ± 10.8
7	25	1	1.5	150	132.9 ± 18.1	104.0 ± 15.6	117.3 ± 9.8
7	25	1	1.5	150	126.9 ± 24.1	129.1 ± 20.9	-
7	25	1	1.5	150	158.4 ± 19.4	158.7 ± 13.7	-
7	30	0.5	1	250	27.8 ± 9.7	31.6 ± 23.3	56.2 ± 8.7
7	35	4	0.75	50	02.7 ± 6.4	ND	10.7 ± 1.8
7	40	2	0.5	100	ND	ND	ND
7.5	25	2	0.75	250	ND	ND	ND
7.5	30	4	0.5	150	ND	ND	ND
7.5	35	0.5	1.5	100	124.0 ± 18.7	145.7 ± 36.4	180.7 ± 15.3
7.5	40	1	1	50	61.9 ± 17.5	38.6 ± 9.5	69.9 ± 5.0
8	25	4	1	100	127.2 ± 4.8	80.9 ± 9.8	77.4 ± 10.9
8	30	2	1.5	50	ND	161.7 ± 44.6	210.3 ± 14.4
8	35	1	0.5	250	ND	ND	ND
8	40	0.5	0.75	150	ND	ND	ND

ND, No detectada

\*La concentración se determinó por el método de Bradford empleando como proteína estándar BSA, excepto para el caso de la bromelina que se obtuvo comercialmente y se preparó considerándola pura.

\*\*La bromelina se empleó como control positivo, para lo cual se mantuvo en todas las corridas su pH y temperatura óptimas, 7.0, 37°C respectivamente (Hernández y cols., 2005).

En esta determinación se encontraron tratamientos que no mostraban diferencia significativa con respecto al blanco por lo que fueron reportados como “No detectada”, esto puede deberse a que el medio en el cual se extraen los péptidos es un medio acuoso de pH relativamente neutro (6.5-8.0), mientras que en la determinación se lleva a cabo en un pH ácido (3.4) lo cual provocó que los aminoácidos que constituyen los péptidos se encontraban protonados impidiendo que estos donen un electrón al complejo TPTZ-Fe como se explica a continuación.

El estado protonado de los aminoácidos podría ser debido a que los aminoácidos presentan dos  $pK$ 's (excepto: tirosina, cisteína, lisina, histidina, arginina, aspartato y glutamato; que presentan tres  $pK$ 's). El  $pK_1$  es considerado el punto de inflexión observado en una curva de titulación del aminoácido en un pH ácido que corresponde al momento en el cual el grupo carbonilo ( $\alpha$ -COOH) se protona/desprotona y considerando el  $pK_2$  al punto de inflexión observado en una curva de titulación del aminoácido en un pH básico que corresponde al momento en el cual el grupo amino ( $\alpha$ -NH<sub>2</sub>) se protona/desprotona (Bai y cols., 1993; Amersham Biosciences, 2004; Nelson y Cox, 2005).

En el caso del pH empleado en la determinación de FRAP se analiza el  $pK_1$ , observando este valor de los distintos aminoácidos se puede observar valores entre 1.8 y 2.4, sin embargo, por efecto de la propiedad amortiguadora de los aminoácidos el grupo carbonilo permanecen protonado en pH cercanos a los valores de  $pK_1$ , además el estado protonado de los aminoácidos no impide que estos puedan donar un H<sup>+</sup>, si no que en este estado es más estable en dichas condiciones dificultando la donación.

### **6.19 Condiciones óptimas de hidrólisis**

Para la determinación de las condiciones óptimas de hidrólisis de las proteínas de la cabeza de camarón se consideraron en el diseño de Taguchi solo las variables de respuesta de capacidad antioxidante por el método ABTS y FRAP, debido al objetivo general del proyecto.

### 6.19.1 Condiciones óptimas de hidrólisis empleando proteasas de *B. karatas*

Las condiciones óptimas de hidrólisis empleando extractos de *B. karatas* se muestran en el Cuadro 6.4. El nivel óptimo para los factores pH y temperatura se eligieron considerando que estos solo eran significativos para la variable FRAP, para el caso del factor cantidad de sustrato coincidió el mismo nivel para ambos factores.

Cuadro 6.4 Valores óptimos obtenidos en el análisis de Taguchi L'16 de los hidrolizados con *B. karatas*

Factor	TNBS	ABTS	FRAP	Óptimo
pH	6.5	7.0	6.5	6.5
Temperatura, °C	25	30	25	25
Tiempo, h	0.5	2	4	4
Sustrato, g	0.5	1.5	1.5	1.5
Enzima, µg	50	250	100	100

Se muestran con rojo los valores correspondientes a factores significativos ( $p < 0.05$ )

Para determinar los valores óptimos de los factores tiempo de hidrólisis y cantidad de enzima se graficaron estas variables con respecto a otros valores óptimos como se muestra en la fig. 6.25.

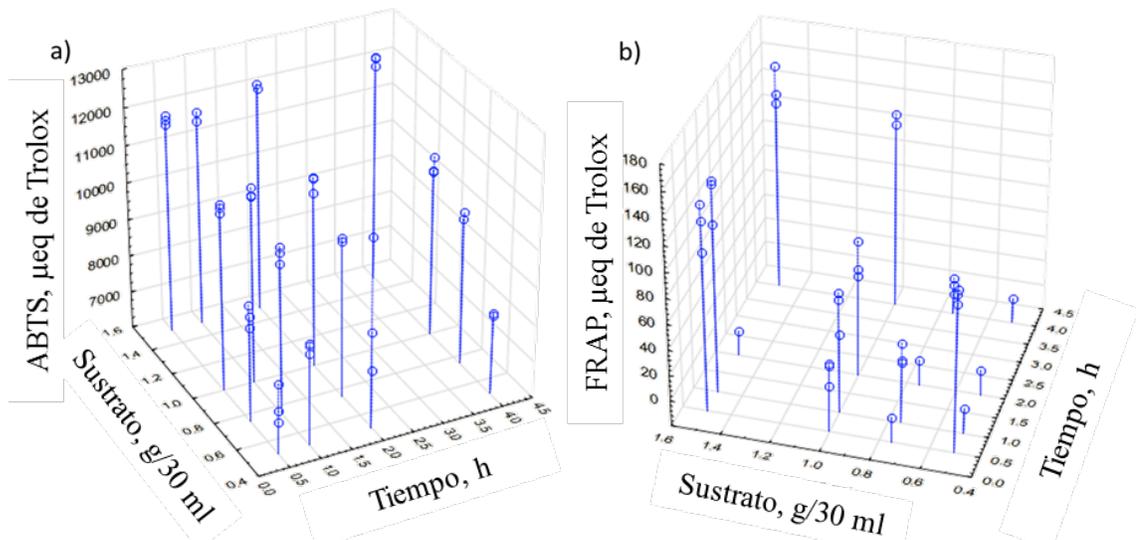


Figura 6.25 Gráfica para determinar el nivel óptimo del factor tiempo en los hidrolizados con *B. karatas*. Variable de respuesta: a) ABTS y b) FRAP

En la fig. 6.25a se puede observar que para el caso de ABTS no hay diferencia entre el tiempo de hidrólisis de 2h y 4h (equivalentes a los niveles 3 y 4 de dicho factor) en lo correspondiente al nivel más alto de cantidad de sustrato (1.5 g) que ya se había definido como óptimo anteriormente, mientras que para el caso de FRAP (fig. 6.25b) se observa una diferencia entre los dos niveles de tiempo de hidrólisis a seleccionar (3 y 4) manteniendo el nivel más alto de cantidad de sustrato (1.5g). Esta elección fue determinada principalmente por que como se puede observar en la fig. 6.25b para el caso de FRAP en tiempo de 2h y 1.5g de sustrato no se aprecia actividad antioxidante por este método, considerando que esto es debido a la protonación de los péptidos como se explicó anteriormente. En base a lo anterior se decidió elegir el nivel 4 correspondiente a un tiempo de 4h.

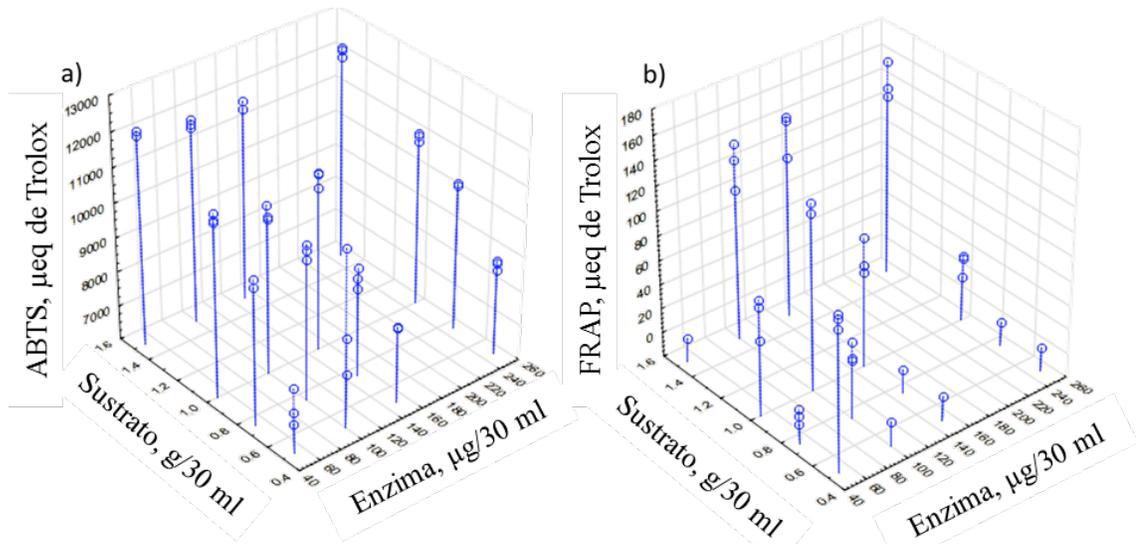


Figura 6.26 Gráfica para determinar el nivel óptimo del factor cantidad de enzima en los hidrolizados con *B. karatas*. Variable de respuesta: a) ABTS y b) FRAP

En la fig. 6.26 se puede observar que cuando se tiene una cantidad de 1.5g, previamente determinada como óptimo (correspondiente al nivel 4 de dicho factor), los valores para ABTS y FRAP no muestran una gran diferencia entre los niveles 2 y 4 de cantidad de enzima (equivalentes a 100 µg y 250 µg, respectivamente), sin embargo el ANOVA para ABTS y FRAP (Anexo E y Anexo F) muestra que para el caso de ABTS este factor es apenas significativo ( $p=0.418$ ), mientras que para el caso de FRAP este factor altamente significativo principalmente por que varios tratamientos no mostraron actividad con esta determinación. Por lo anterior se eligió el nivel 2 correspondiente a 100 µg.

### 6.19.2 Condiciones óptimas de hidrólisis empleando proteasas de *B. pinguin*.

Las condiciones óptimas de hidrólisis empleando extractos de *B. pinguin* se muestran en el Cuadro 6.5.

Cuadro 6.5 Valores óptimos obtenidos en el análisis de Taguchi L'16 de los hidrolizados con *B. pinguin*

Factor	TNBS	ABTS	FRAP	Óptimo
pH	8.0	7.5	6.5	6.5
Temperatura, °C	40	40	30	40
Tiempo, h	0.5	0.5	2	0.5
Sustrato, g	0.5	1.5	1.5	1.5
Enzima, µg	150	50	100	100

Se muestran con rojo los valores correspondientes a factores significativos ( $p < 0.05$ )

Se consideraron solo las variables correspondientes a la capacidad antioxidante para determinar el óptimo debido a que este era el objetivo del trabajo. A partir de estos datos se seleccionaron como óptimos los niveles que se muestran en el Cuadro 6.5. El nivel óptimo para los factores tiempo y temperatura se eligieron considerando que estos solo eran significativos para la determinación de actividad antioxidante por el método de ABTS, mientras que el nivel óptimo para el factor cantidad de enzima se determinó considerando que este factor solo fue significativo para la misma variable de respuesta pero por el método FRAP. Para el caso del factor cantidad de sustrato coincidió el mismo nivel para ambos factores. Para determinar el nivel óptimo para el factor pH se graficó esta variable con respecto a los otros valores óptimos establecidos.

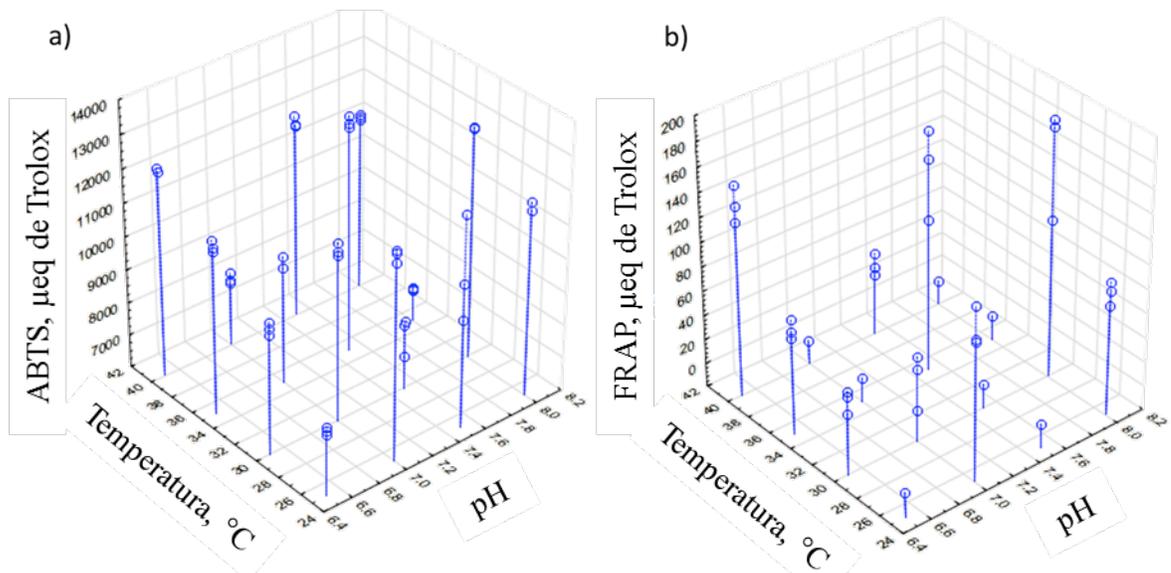


Figura 6.27 Gráfica para determinar el nivel óptimo del factor pH en los hidrolizados con *B. pinguin*. Variable de respuesta: a) ABTS y b) FRAP

Se observó que los valores de ABTS y FRAP (fig. 6.27) a una temperatura de 40°C (correspondiente al nivel 4 de dicho factor el cual se había determinado previamente como óptimo) y comparar los valores de estas variables de respuesta en los pH's 6.5 y 7.5 (niveles 1 y 3) se puede observar que en el caso de ABTS no existe diferencia, sin embargo al observar la gráfica de FRAP se aprecia una menor actividad a pH 7.0 por lo que se decidió emplear un pH de 6.5 (nivel 1) como óptimo.

### 6.19.3 Condiciones óptimas de hidrólisis empleando bromelina

Las condiciones óptimas de hidrólisis empleando extractos de *B. karatas* se muestran en el Cuadro 6.6.

Cuadro 6.6 Valores óptimos obtenidos en el análisis de Taguchi L'16 de los hidrolizados con bromelina

Factor	TNBS	ABTS	FRAP	Óptimo
Tiempo, h	0.5	4	2	4
Sustrato, g	1.5	1.5	1.5	1.5
Enzima, µg	250	100	100	100

Se muestran con rojo los valores correspondientes a factores significativos ( $p < 0.05$ )

Al igual que en las otras proteasas empleadas se consideraron los valores correspondientes a la actividad antioxidante para determinar el óptimo. A partir de estos datos se seleccionaron como óptimos los niveles que se muestran en el Cuadro 6.6. El nivel óptimo para los factores tiempo y cantidad de enzima se eligieron considerando que estos solo eran significativos para la variable ABTS y FRAP, respectivamente. El nivel óptimo para el factor cantidad de sustrato se determinó considerando que coincidió el mismo nivel para ambos factores

### **Etapas 3: Producción de hidrolizados de proteínas de la cabeza de camarón en las condiciones óptimas**

Se generaron nuevos hidrolizados empleando las condiciones óptimas de cada una de las enzimas en base a los resultados de la Etapa 2.

#### **6.20 Hidrólisis en condiciones óptimas**

##### **6.20.1 Hidrólisis en condiciones óptimas empleando extractos enzimáticos de *B. karatas***

En base a la etapa anterior se determinó que las condiciones óptimas para *B. karatas* eran pH de 6.5, temperatura de 25°C, tiempo de hidrólisis de 4 horas, cantidad de sustrato de 1.5 g y cantidad de enzima de 100 µg. A los hidrolizados en condiciones óptimas

empleando *B. karatas* se les determinó la concentración de grupos  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> (48.93 mM L-Leucina) y actividad antioxidante por los métodos ABTS (13.24 mM Trolox) y FRAP (47.74  $\mu$ M Trolox).

### **6.20.2 Hidrólisis en condiciones óptimas empleando extractos enzimáticos de *B. pinguin***

En base a la etapa anterior se determinó que las condiciones óptimas para *B. pinguin* eran pH de 6.5, temperatura de 40°C, tiempo de hidrólisis de 0.5 horas, cantidad de sustrato de 1.5 g y cantidad de enzima de 100  $\mu$ g. A los hidrolizados en condiciones óptimas se les determinó la concentración de grupos  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> (53.32 mM de L-Leucina) y actividad antioxidante por los métodos ABTS (13.4 mM Trolox) y FRAP (47.75  $\mu$ M Trolox).

### **6.20.3 Hidrólisis en condiciones óptimas empleando extractos enzimáticos de bromelina**

En base a la etapa anterior se determinó que las condiciones óptimas para bromelina eran pH de 7.0, temperatura de 37°C, tiempo de hidrólisis de 4 horas, cantidad de sustrato de 1.5 g y cantidad de enzima de 100  $\mu$ g. A los hidrolizados en condiciones óptimas se les determinó la concentración de grupos  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> (50.82 mM de L-Leucina) y actividad antioxidante por los métodos ABTS (13.39 mM Trolox) y FRAP (91.73  $\mu$ M Trolox).

## **6.21 Separación de péptidos y oligopéptidos de los hidrolizados por exclusión molecular**

### **6.21.1 Determinación de la concentración de grupos $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de las fracciones**

En la fig. 6.28 se muestran los cromatogramas generados durante la cromatografía de exclusión molecular de los hidrolizados en condiciones óptimas empleando las enzimas de los extractos de *B. karatas* (6.28a), *B. pinguin* (6.28b) y bromelina (6.28c) analizando la concentración de  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>. En los cromatogramas se observó que la mayor concentración de polipéptidos corresponden a volúmenes de elución bajos, además se puede observar un perfil diferente entre la absorbancia a 280 nm y la concentración de grupos  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>, esto debido a que la absorbancia a 280 nm determina solo la concentración de tirosina y

triptófano, mientras que la concentración de grupos  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> determina la concentración de polipéptidos y péptidos, es decir, puede existir una gran concentración de tirosina y triptófano en una sola cadena polipeptídica o existir varios péptidos y polipéptidos sin tirosina y/o triptófano (Pace y cols., 1995).

Además se puede apreciar un comportamiento similar entre los hidrolizados obtenidos con los extractos enzimáticos de *B. pinguin* (fig. 6.28b) y bromelina (fig. 6.28c), sin embargo los perfiles observados en los cromatogramas no implican que las secuencias de aminoácidos sean iguales.

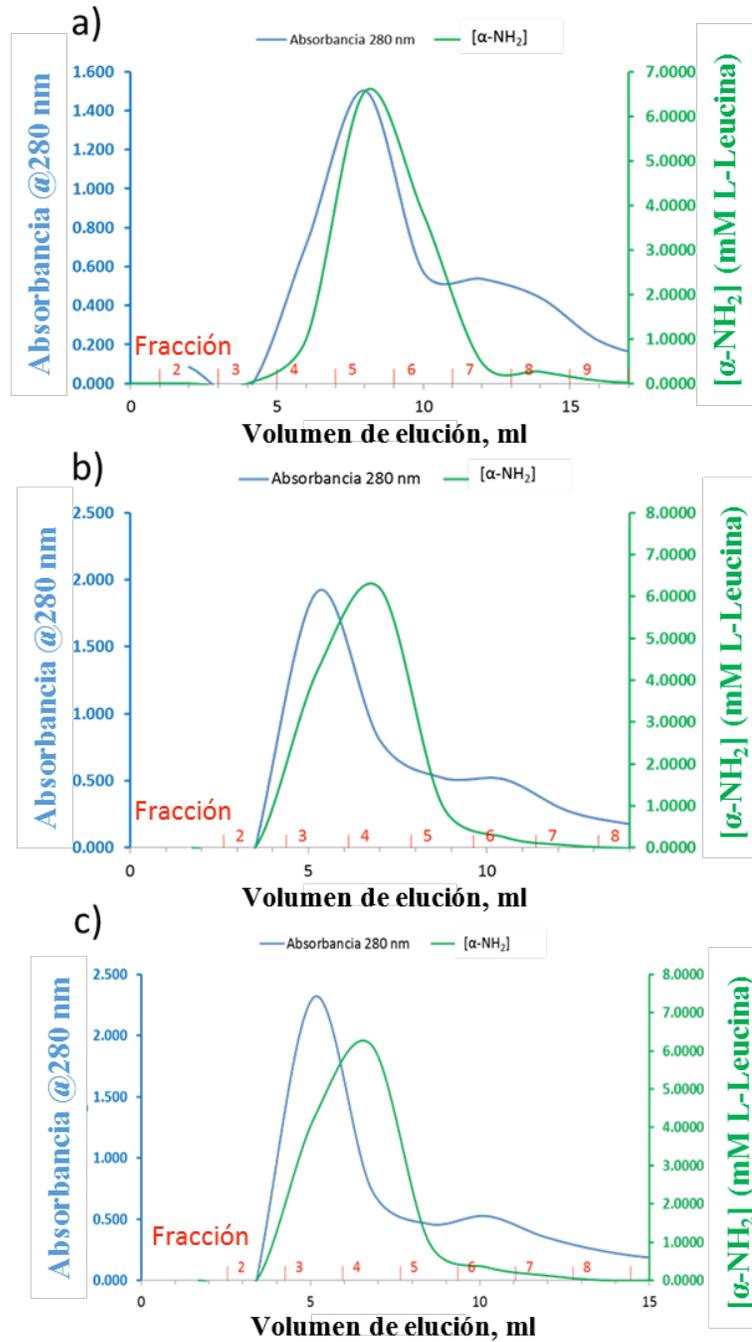


Figura 6.28 Separación por medio de exclusión molecular de los oligopeptidos y péptidos de los hidrolizados obtenidos en condiciones óptimas empleando: a) extractos enzimáticos de *B. karatas*; a) extractos enzimáticos de *B. pinguin*; y c)

bromelina. Comparación de la absorbancia a 280nm con la concentración de grupos  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> (mM L-Leucina).

### 6.21.2 Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS de las fracciones

En la fig. 6.29 se muestran los cromatogramas generados durante la cromatografía de exclusión molecular de los hidrolizados en condiciones óptimas empleando las enzimas de los extractos de *B. karatas* (6.29a), *B. pinguin* (6.29b) y bromelina (6.29c) analizando la capacidad antioxidante por el método ABTS y se comparó con la absorbancia a 280 nm.

Se observó que la actividad antioxidante determinada por ABTS es mayor en las fracciones 7, 8 y 9 para los hidrolizados con *B. karatas* (fig. 6.29a); en las fracciones 6 y 7 para los hidrolizados con *B. pinguin* (fig. 6.29b); y en las fracciones 6 y 7 para los hidrolizados con bromelina (fig. 6.29c). En todos estos se puede apreciar que la actividad antioxidante aumenta al alcanzar volúmenes de elución grandes y correspondientes a las últimas fracciones de la cromatografía de exclusión molecular. La actividad antioxidante se ha relacionado con polipéptidos de bajo peso molecular (Yao-wang, y cols., 2011; Yao-wang y Bo, 2013) los cuales atraviesan la cromatografía de exclusión molecular a una velocidad menor que los de alto peso molecular (Cheung y Li-Chan, 2010; Cheung y cols., 2012; Roblet y cols., 2012; Wiriyaphan y cols., 2015). Además al emplear una columna de exclusión molecular con un volumen de columna de aproximadamente 14 ml se observó que las fracciones con mayor actividad corresponden a las últimas fracciones de la columna y por lo tanto las de menor peso molecular.

Resultados similares fueron reportados por Nalinanon y cols. (2011), quienes hidrolizaron músculo de pescado empleando pepsina y al fraccionar los hidrolizados por cromatografía de exclusión molecular empacada con Sephadex G-25 observaron un aumento en la actividad antioxidante en las fracciones de los volúmenes de elución correspondientes al final de la columna de exclusión molecular.

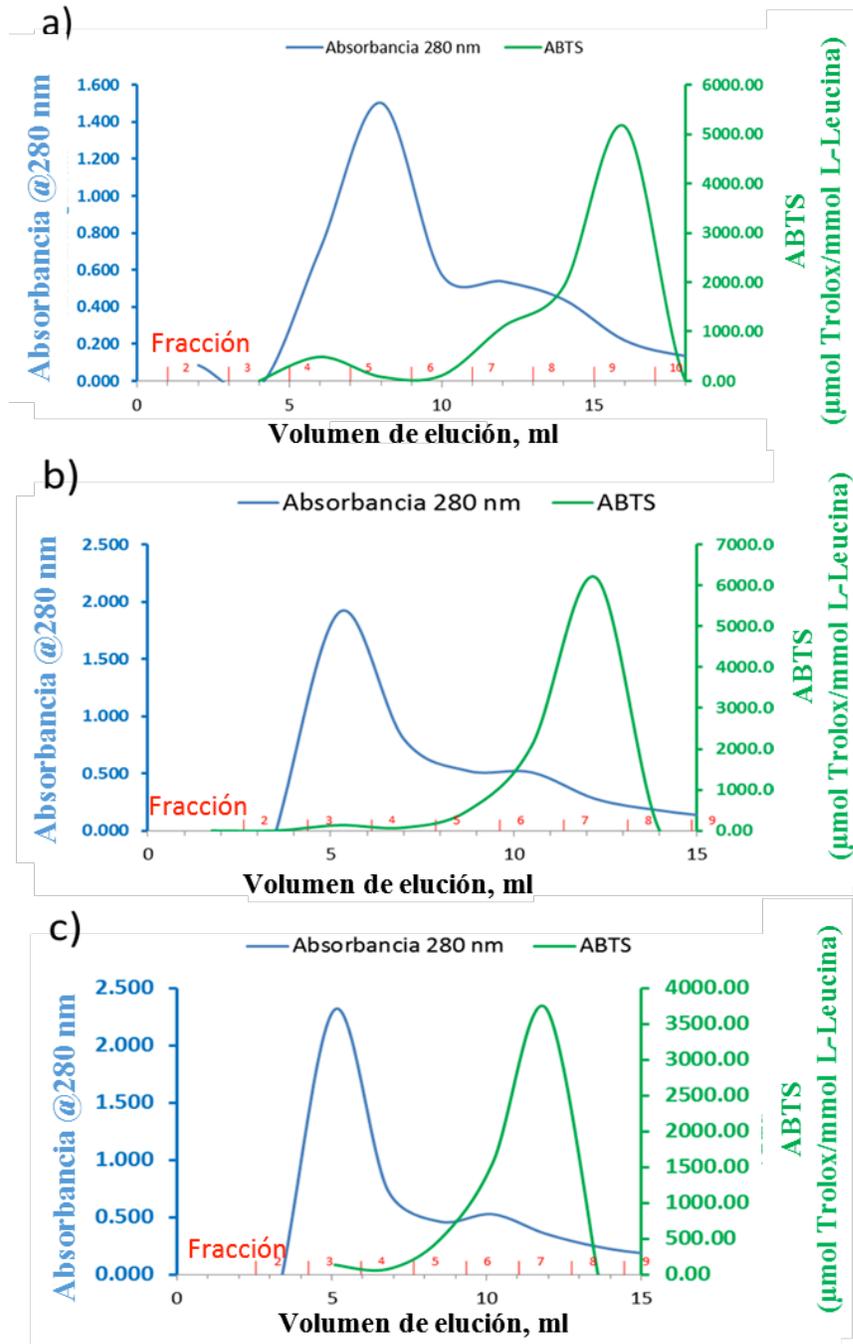


Figura 6.29 Separación por medio de exclusión molecular de los oligopéptidos y péptidos de los hidrolizados obtenidos en condiciones óptimas empleando: a) extractos enzimáticos de *B. karatas*; a) extractos enzimáticos de *B. pinguin*; y c)

bromelina. Comparación de la absorbancia a 280nm con la actividad antioxidante por el método ABTS.

### 6.21.3 Determinación de la actividad antioxidante por el método FRAP de las fracciones

Se determinó la actividad antioxidante por el método FRAP a cada una de las fracciones obtenidas, sin embargo no se detectó actividad para reducir el complejo TPTZ-Fe<sup>+3</sup>. Esto puede deberse al efecto explicado previamente, que debido al pH bajo de la determinación los aminoácidos de los polipéptidos se encuentren protonados dificultando que estos donen un electrón y reduzcan el complejo a TPTZ-Fe<sup>+2</sup> como se explicó anteriormente. Además durante la cromatografía de exclusión molecular existe un efecto de dilución de las fracciones en el buffer empleado como fase móvil (GE Healthcare Life Sciences, Size Exclusion Chromatography Principles and Methods).

### 6.21.4 Análisis electroforético de los hidrolizados

En la fig. 6.30 se muestran los resultados de las electroforesis de bajo peso molecular de las fracciones obtenidas durante la cromatografía de exclusión molecular de los hidrolizados en condiciones óptimas empleando los extractos enzimáticos de *B. karatas* (fig. 6.30a), los extractos enzimáticos de *B. pinguin* (fig. 6.30b) y bromelina (fig. 6.30c).

En la fig. 6.30 se observaron barridos y bandas tenues en la parte inferior de cada gel, las cuales corresponden a polipéptidos de bajo peso molecular, menores a los 1400 Da lo cual equivale a aproximadamente entre 7 y 14 aminoácidos. La presencia de estos polipéptidos de bajo peso molecular en las últimas fracciones obtenidas de las cromatografías de exclusión molecular realizadas para los hidrolizados con cada uno de los extractos enzimáticos puede explicar las capacidades antioxidantes determinadas y mostradas anteriormente, además esto es confirmado al considerar que el límite inferior reportado para el Sephadex G-10 es de 700 Da.

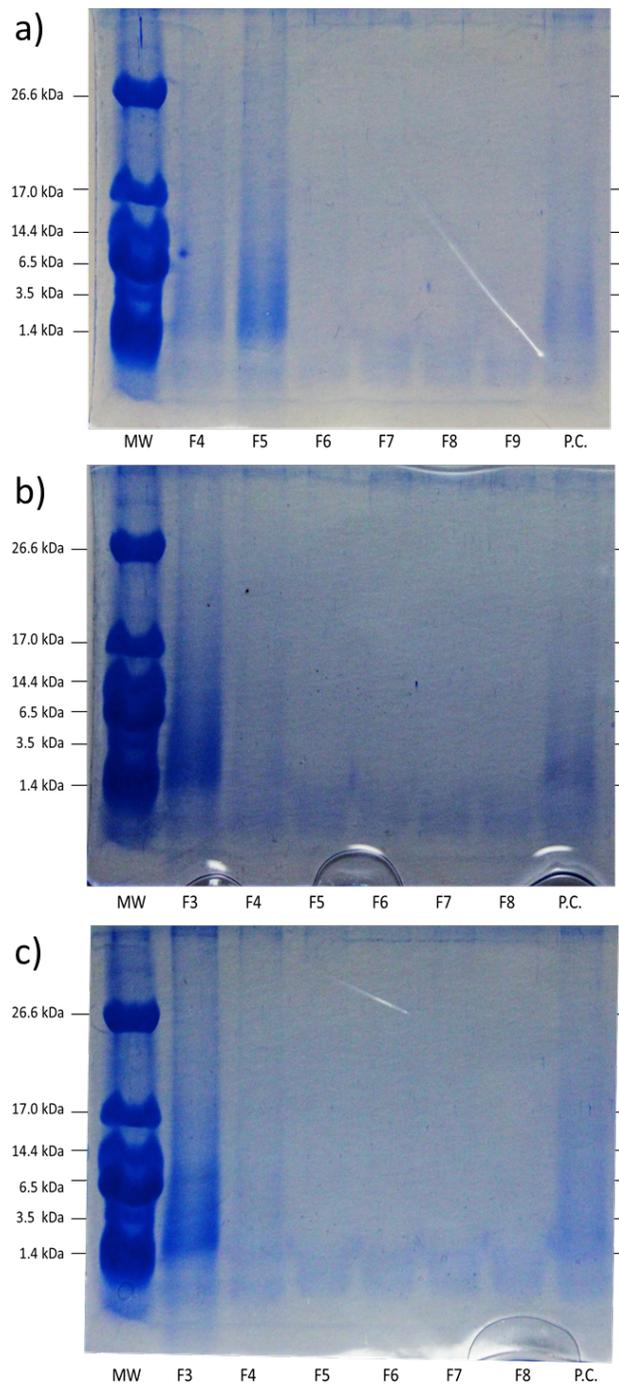


Figura 6.30 Electroforesis Tricine-SDS-PAGE (16.5%T, 5%C) de las fracciones de los hidrolizados producidos en condiciones óptimas empleando: a) extractos

enzimáticos de *B. karatas*; b) extractos enzimáticos de *B. pinguin*; y c) bromelina.

Es importante mencionar que no todas las secuencias que se encuentran en las últimas fracciones de cada cromatografía de exclusión molecular pueden presentar capacidad antioxidante sin embargo para conocer los pesos moleculares y secuencias que presentan esta capacidad es necesario recurrir a técnicas más adecuadas como una cromatografía de fase reversa.

## CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

Se obtuvieron extractos de enzimas proteolíticas prepurificado por medio de una precipitación con sulfato de amonio al 20% y 30% de *B. karatas* y *B. pinguin*, respectivamente.

Los extractos enzimáticos obtenidos permiten hidrolizar la proteína de la cabeza de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) encontrando las condiciones óptimas de hidrólisis para los extractos de *B. karatas* (pH 6.5, 25°C, 4 h, 1.5 g de sustrato y 100 µg de enzima), los extractos de *B. pinguin* (pH 6.5, 40°C, 0.5 h, 1.5 g de sustrato y 100 µg de enzima) y bromelina (pH 7.0, 37°C, 4 h, 1.5 g de sustrato y 100 µg de enzima)

Los hidrolizados producidos empleando los extractos enzimáticos de *B. pinguin* y *B. karatas* presentan actividad antioxidante por los método ABTS (13.40 mM Trolox y 13.24 mM Trolox en condiciones óptimas, respectivamente) y el método FRAP (47.75 µM Trolox y 47.74 µM Trolox en condiciones óptimas, respectivamente).

Las fracciones de los hidrolizados de camarón con mayor actividad antioxidante (aprox 5 mM trolox/mmol L-leucina para *B. karatas* y 6 mM trolox/mmol L-leucina para *B. pinguin*) presentaron oligopéptidos de aproximadamente 1400 Da, lo cual equivale aproximadamente a secuencias de 10 aminoácidos.

## CAPÍTULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez-Parrilla, E., De LA Rosa, L., Legarreta, P., Saenz, L., Rodrigo-Gacía, J., González-Aguilar, G. 2010. Daily consumption of apple, pear and orange juice differently affects plasma lipids and antioxidant capacity of smoking and non-smoking adults. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 61(4):368-380
- Amersham Biosciences 2004. Ion Exchange Chromatography y Chromatofocusing - Principals and Methods.
- Armenta, R.E. y Guerrero-Legarreta, I. 2009. Amino acid profile and enhancement of the enzymatic hydrolysis of fermented shrimp carotenoproteins. *Food Chemistry* 112 (2): 310–315.
- Badui Dergal, S. 2006. Química de alimentos (Cuarta ed.). Edo de México, México: Pearson Educación de México S.A. de C.V.
- Bamdad, F., Wu, J., y Chen, L. 2011. Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein. *Journal of Cereal Science* 54 (1): 20-28.
- Barbosa, M., Díaz, C., Toral, M.I., Retuert, J., y Martínez, Y. 2005. Synthesis and characterization of organocyclophosphazene-silica composites: new materials able to retain metal complexes. *Journal of Materials Chemistry* 15 (13): 1360–1368.
- Bai, Y., Milne, J.S., Mayne, L., y Englander, S.W. 1993. Primary Structure Effects on Peptide Group Hydrogen Exchange. *Proteins* 17 (1): 75-86.
- Benzie I., Strain J. 1996. The ferric reducing ability of Plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239(1):70-76.
- Beynon R., Bond J. 2001. Proteolytic Enzymes: A practical approach. Tercer edición. Oxford University Press. New York, Estados Unidos.
- Bhaskar, N., Suresh, P. V., Sakhare, P. Z., y Sachindra, N. M. 2007. Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: Optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized

- conditions on deproteination/demineralization and carotenoid recovery. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5): 1427–1434.
- 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.
- Bueno-Solano, C., López Cervantes, J., Campas Baypoli, O., Lauterio García, R., Adan Bante, N., y Sánchez Machado, D. 2009. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. *Food Chemistry*, 112(3): 671-675.
- Caffini, N. O., López, L. M., Natalucci, C. L., y Priolo, N. S. 1988. Proteasas de Plantas Superiores. I. Características Generales, Rol Fisiológico y Aplicaciones. *Acta Farm. Bonaerense*, 7(3): 195-213.
- Cao, W., Tan, C., Zhan, X., Li, H., y Zhang, C. 2014. Ultraviolet irradiation and gradient temperature assisted autolysis for protein recovery from shrimp head waste. *Food chemistry* 164 136–41.
- Cao, W., Zhang, C., Hong, P., y Ji, H. 2008. Response surface methodology for autolysis parameters optimization of shrimp head and amino acids released during autolysis. *Food Chemistry* 109 (1): 176–183.
- Cao, W., Zhang, C., Hong, P., Ji, H., Hao, J., y Zhang, J. 2009. Autolysis of shrimp head by gradual temperature and nutritional quality of the resulting hydrolysate. *LWT - Food Science and Technology* 42 (1): 244–249.
- Casal, H.L., Ki, U., y Mantsch, H.H. 1988. Structural and conformational changes of beta-Lactoglobulin B: an infrared spectroscopic study of the effect of pH and temperature. *Biochimica et biophysica acta*. 957: 11-20.
- Castillo L., Robert M., Larqué A., Higuera I. 2010. CICY: Treinta años de labor científica y educativa. Centro de investigación científica de Yucatán, A.C. Yucatán, México.
- Cheung, I.W.Y. y Li-CHAN, E.C.Y. 2010. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity and bitterness of enzymatically-produced hydrolysates of shrimp (*Pandalopsis dispar*) processing byproducts investigated by Taguchi design. *Food Chemistry* 122 (4): 1003–1012.
- Cheung, I.W.Y., Cheung, L.K.Y., Tan, N.Y., y Li-Chan, E.C.Y. 2012. The role of molecular size in antioxidant activity of peptide fractions from Pacific hake (*Merluccius productus*) hydrolysates. *Food chemistry* 134 (3): 1297–306.

- Cheung, I. W., y Li-Chan, E. C. 2014. Application of taste sensing system for characterisation of enzymatic hydrolysates from shrimp processing by-products. *Food Chemistry*, 145: 1076-1085.
- Clavijo D., Portilla M., Maghdriel C., Quijano P. 2012. Cinética de la bromelina obtenida a partir de la piña perolera (*Ananas Comosus*) de Lebrija-Santander Bistua. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas* 10(2): 41-49
- CONAPESCA, C. N. 2011. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca del 2011. Sinaloa, México.
- CONAPESCA-SAGARPA. 2013. SAGARPA. Recuperado el 22 de Enero de 2014, de <http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx>
- Cosio, I. G., Fisher, R. A., y Carroad, P. A. 1982. Bioconversion of shellfish chitin waste: waste pretreatment, enzyme production, process and design economic analysis. *Journal Of Food Science* 47: 901-905.
- Curoto, E., González, G., O'Reilly, S., y Tapia, G. 1989. Isolation and partial characterization of a protease from Cucurbita ficifolia. *FEBS letters* 243 (2): 363–365.
- De Oliveira, S., De Souza, G.A., Eckert, C.R., Silva, T.A., Sobral, E.S., Fávero, O.A., Ferreira, M.J.P., Romoff, P., Baader, W.J. 2014. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Quimica Nova* 37 (3): 497–503.
- Dimitrov, Z. 2012. Peptidase activities of starter lactic acid bacteria for traditional bulgarian cheeses resulting in production of peptides with bioactive effects. *Advances in Bulgarian Science* 1: 53-56.
- Durán C., Jaramillo L. 2006. Diseño y construcción de una estación de ultrafiltración para separación de proteínas. *Universitas Odontológica* 25(1):41-48.
- Espejo Serna, A., López Ferrari, A. R., Ramírez Morillo, I. 2010. *Bromeliaceae. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes* 1-3: 8-14.
- Fennema, O. 2000. Química de los alimentos. Segunda edición. Editorial Acribia.
- Ferrer, J., Paez, G., Marmol, Z., Ramones, E., Garcia, H., y Forster, C. F. 1996. Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate. *Bioresource Technology* 57: 55-60.
- GE Healthcare Life Sciences. Size Exclusion Chromatography Principles and Methods. Capítulo 1: Size exclusion chromatography (SEC) in practice.

- Gildberg, A., Stenberg, E. 2001. A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochemistry* 36: 809–812.
- Givnish, T. J., Millam, K. C., Berry, P. E., Sytsma, K. J. 2007. Phylogeny, Adaptive Radiation, and Historical Biogeography of *Bromeliaceae* Inferred from ndhF Sequence Data. *ALISO* 23(1): 3-26.
- Gomes-da-Silva J., Ferreira C. A. 2013. An Updated Overview of Taxonomy and Phylogenetic History of Tillandsioideae Genera (*Bromeliaceae*: Poales). *Global Journal of Botanical Science* 1(1): 1-8
- Gómez-Estaca, J., Montero, P., y Gómez-Guillén, M.C. 2014. Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) muscle proteins as source to develop edible films. *Food Hydrocolloids* 41 86–94.
- González R. N., Badillo C. J., Aranda B. J. Oliver S. M. 2011. Production of plant proteases *in vivo* and *in vitro* - A review. *Biotechnology Advances journal* 29(6): 983-996.
- Guerard, F., Sumaya-Martinez, M.T., Laroque, D., Chabeaud, A., y Dufossé, L. 2007. Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. *Process Biochemistry* 42 (11): 1486–1491.
- Hai-Lun, H., Xiu-La, C., Cai-Yun, S., Yu-Zhong, Z., Bai-Cheng, Z. 2006. Analysis of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from protease-hydrolyzed marine shrimp *Acetes chinensis*. *Journal of Peptide Science* 12(11): 726–733.
- Harnedy, P., FitzGerald, R. 2012. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods* 4(1): 6-24.
- Hernández, M., Carvajal, C., Márquez, M., Báez, R., Morris, H., Santos, R., y Chávez, M.D.L.Á. 2005. Obtención de Preparados Enzimáticos a Partir de Tallos de Piña (*Ananas Comosus*) Potencialidades de uso en la Biotecnología y la Medicina. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 36.
- Hornung-Leoni, C. T. 2011a. Avances sobre usos etnobotánicos de las *Bromeliaceae* en Latinoamérica. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10(4): 297-314.
- Hornung-Leoni, C. T. 2011b. Bromeliads: Traditional plant food in latin America since prehispanic times. *Polibotánica* (32): 219-229.
- Inagami, T. y Murachi, T. 1963. Kinetic Studies of Bromelain Catalysis. *Biochemistry* 2 1439-1444.

- INIFAP, Nayarit. 2010. Guía PROGAN. Nayarit México.
- Je, J. Y., Qian, Z. J., Byun, H. G., Kim, S. K. 2007. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry* 42(5): 840–846.
- Jones, S. y Thornton, J.M. 1995. Protein-protein interactions: A review of protein dimer structures. *Progress in Biophysics y Molecular Biology* 63 (1): 31-65.
- Katano, S., Oki, T., Matsuo, Y., Yoshihira, K., Nara, Y., Miki, T., Matsui, T., y Matsumoto, K. 2003. Antihypertensive effect of alkaline protease hydrolysate of the pearl oyster *Pinctada fucata martencii* and separation and identification of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides. *Nippon Suisan Gakkaishi* 69(6): 975–980.
- Kim, S.-K., y Mendis, E. 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts A review. *Food Research International* 39(4): 383-393.
- Le, Q., y Katunuma, N. 2004. Detection of protease inhibitors by a reverse zymography method, performed in a tris(hydroxymethyl)aminomethane–Tricine buffer system. *Analytical Biochemistry* 324 (2): 237–240.
- Lee, S. H., Qian, Z. J., Kim, S. K. 2010. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry* 118(1): 96–102.
- López, L. M., Sequeiros, C., Natalucci, C. L., Brullo, A., Maras, B., Barra, D., y cols. 2000. Purification and Characterization of Macrodontain I, a Cysteine Peptidase from Unripe Fruits of *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*). *Protein Expression and Purification* 18(2): 133-140.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Madhu Babu, C., Chakrabarti, R., y Sambasivarao, K. R. 2008. Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids. *Food Science and Technology* 41(2): 227-235.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H. G., Kim, S. K. 2005. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sciences* 77(17) 2166–2178.
- Messing, R. 1961. Isolation of electrophoretically pure pinguinain A. *Enzimologia* 23: 49-51.

- Michaelis, L. y Menten, M.L. 1913. Die kinetik der invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift* 49 (352): 333-369.
- Mondragón Chaparro, D. M., Ramírez Morillo, I. M., Flores Cruz, M., y García Franco, J. G. 2011. La familia *Bromeliaceae* en México (1er ed.). Estado de México, México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- Montes, C., Amador, M., Cuevas, D., y Cordoba, F. 1990. Subunit structure ok karatasin, the proteinase isolated from *Bromelia plumieri* (*karatas*). *Agricultural and Biological Chemistry* 54(1): 17-24.
- Monti R., Basilio C. A., Trevisan H. C., Contiero J. 2000. Purification of Papain from Fresh Latex of *Carica papaya*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 43(5): 501-507
- Moyano D., D., Osorio R., M., Murillo P., E., Murillo A., W., Solanilla D., J., Méndez A., J., y otros. 2012. Evaluación de parámetros bromatológicos, fitoquímicos y funcionalidad antioxidante de frutos de *Bromelia karatas* (*Bromeliaceae*). *Vitae* 19(1): S439-S441.
- Muñoz de Chávez M., Ledesma S. J., Chávez V. A., Pérez-Gil R. F., Mendoza M. E., Calvo C. C. 2010. Composición de alimentos: Valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo. Segunda edición. McGrawHill Interamericana Editores S.A. de C.V. México.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H., y Shahidi, F. 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry* 124 (4): 1354–1362.
- Nelson, D.L. y Cox, M.M. 2005. Lehninger. Principios de bioquímica (4ª ED.) OMEGA. Capítulo 3: Aminoácidos, péptidos y proteínas. Pag: 75-84.
- Nilsang, S., Lertsir, S., Suphantharika, M., y Assavanig, A. 2005. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble. *Journal of Food Engineering* 70(4): 571–578.
- Nelson, D.L. y Cox, M.M. 2005. Lehninger. Principios de bioquímica (4ª ED.) OMEGA. Capítulo 3: Aminoácidos, péptidos y proteínas. Pag: 75-84.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., y Gray, T. 1995. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science* 4 (11): 2411–2423.
- Payrol, J. A., Obregón, W. D., Natalucci, C. L., y Caffini, N. O. 2005. Reinvestigation of the proteolytically active components of *Bromelia pinguin* fruit. *Fitoterapia* 76(6): 540-548.

- Payrol, J.A., Obregón, W.D., Trejo, S.A., y Caffini, N.O. 2008. Purification and characterization of four new cysteine endopeptidases from fruits of *Bromelia pinguin* L. grown in Cuba. *The Protein Journal* 27 (2): 88–96. doi:10.1007/s10930-007-9111-2.
- Pío León, J. F., López, A. G., Paredes, L. O., Uribe Beltrán, M., Díaz Camacho, S. P., y Delgado Vargas, F. 2009. Physicochemical, Nutritional and Antibacterial Characteristics of the Fruit of *Bromelia pinguin* L. *Plant Foods Hum Nutr* 181-187.
- Ponce-Palafox, J.T., Ruiz-Luna, A., Castillo-Vargasmachuca, S., García-Ulloa, M., Arredondo-Figueroa, J.L. 2011. Technical, economics and environmental analysis of semi-intensive shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farming in Sonora, Sinaloa and Nayarit states, at the east coast of the Gulf of California, México. *Ocean y Coastal Management* 54(7): 507-513
- Re R., Pellegrini, N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology y Medicine* 26(9): 1231-1237.
- Reyes N. L. 2010. Optimización y caracterización de la microencapsulación de la proteasa hemisfericina refinada. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. D.F., México.
- Roblet, C., Amiot, J., Lavigne, C., Marette, A., Lessard, M., Jean, J., Ramassamy, C., Moresoli, C., y Bazinet, L. 2012. Screening of in vitro bioactivities of a soy protein hydrolysate separated by hollow fiber and spiral-wound ultrafiltration membranes. *Food Research International* 46 (1): 237–249.
- Rowan, A. D., Buttle, D. J., y Barrett, A. J. 1990. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochemical Journal* 266: 869–875.
- Sánchez-Moreno C., Larrauri J.A. 1998. Main methods used in lipid oxidation determination. *Food Science and Technology International*, 4(1): 391–399
- Sarmadi, B.H. y Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* 31 (10): 1949–1956.
- Schägger, H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols* 1 (1): 16–22.
- Schägger H. y von Jagow, G. 1987. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166 (2): 368-379.

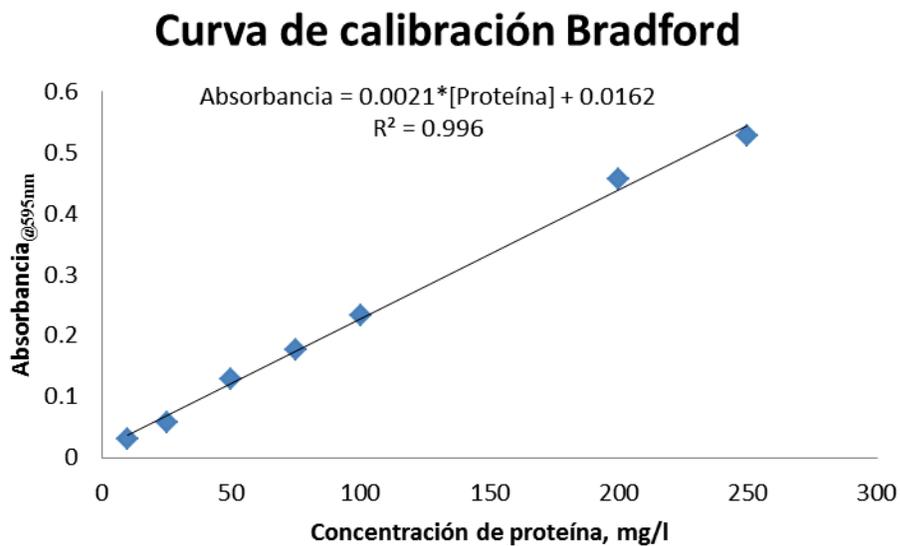
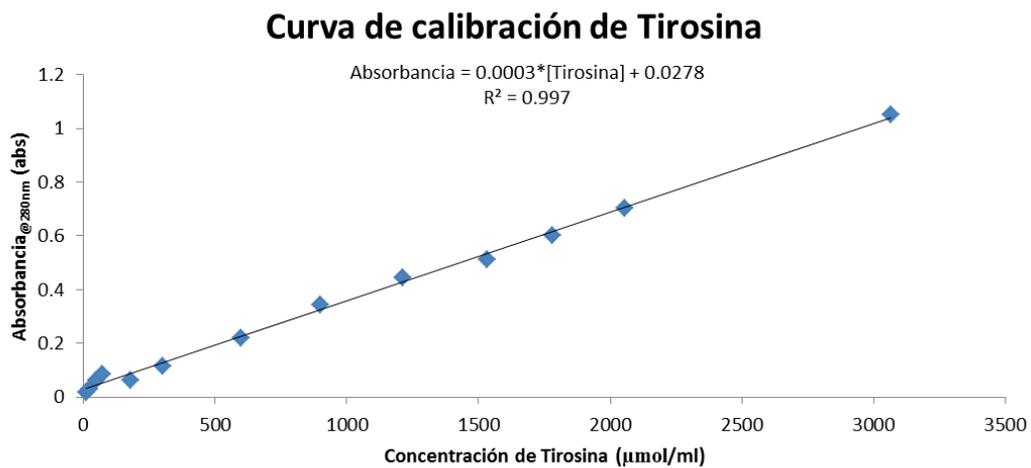
- Shahidi, F., y Kamil, J. 2001. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry Fereidoon. *Food Science and Technology* 12(1): 435-464.
- Shahidi, F., Han, X.-Q., y Synowiecki, J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry* 53: 285-293.
- Silvestre, M. C. 1997. Review of methods for the analysis of proteinhydrolysates. *Food chemistry* 60(2): 263-271.
- Simpson, B. K., Nayeri, G., Yaylayan, V., y Ashie, I. 1998. Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. *Food Chemistry* 61(1-2): 131-138.
- Singh, V.K., Patel, A.K., Moir, a. J., y Jagannadham, M. V. 2008. Indicain, a dimeric serine protease from *Morus indica* cv. K2. *Phytochemistry* 69 2110–2119.
- Somero, G.N. 1995. Proteins and Temperature. *Annual Review of Physiology* 57 43-68.
- Spellman, D., O'Cuinn, G., y FitzGerald, R. J. 2009. Bitterness in *Bacillus* proteinase hydrolysates of whey proteins. *Food Chemistry* 114: 440–446.
- Suetsuna, K. 2000. Antioxidant peptides from the protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle. *Marine Biotechnology* 2(1); 5–10.
- Tsai, J. S., Chen, J. L., y Pan, B. S. 2008. ACE-inhibitory peptides identified from the muscle protein hydrolysate of hard clam (*Meretrix lusoria*). *Process Biochemistry* 43(7): 743–747.
- Toro-Goyco, E., y Matos, M. 1964. Purification of Pinguinain by Gel Filtration. *Nature* 203(49-40): 82-83.
- Toro-Goyco, E., Marezki, A., y Matos, M. L. 1968. Isolation, purification, and partial characterization of pinguinain, the proteolytic enzyme from *Bromelia pinguin* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 126(1): 91-104.
- Toro-Goyco, E., Rodríguez-Costas, I., Ehrig H. 1980. Structural studies on pinguinain. Changes induced by carboxamidomethylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 622(1): 151-159
- Verma M. K., Xavier F., Verma Y. K., Sobha K. 2013. Evaluation of cytotoxic and anti-tumor activity of partially purified serine protease isolate from the Indian earthworm *Pheretima posthuma*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 3(11): 896-901.

- Voet D., Voet J., Pratt C. 2009. Fundamentos de bioquímica: La vida a nivel molecular. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp:101-106
- Xia, Y., Bamdad, F., Gänzle, M., y Chen, L. 2012. Fractionation and characterization of antioxidant peptides derived from barley glutelin by enzymatic hydrolysis. *Food chemistry* 134 (3): 1509-18.
- Yao-wang, L., Bo, L., Jiguo, H., y Ping, Q. 2011. Quantitative structure-activity relationship study of antioxidative peptide by using different sets of amino acids descriptors. *Journal of Molecular Structure* 998 53–61.
- Yao-wang, L. y Bo, L. 2013. Characterization of structure–antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using QSAR models : Key sequence positions and their amino acid properties. *Journal of Theoretical Biology* 318:29-43.
- Wang, R., Liu, S., Wang, J., Dong, Q., Xu, L., y Rui, Q. 2013. Purification, characterization and identification of a senescence related serine protease in dark-induced senescent wheat leaves. *Phytochemistry* 95: 118–126.
- Wiriyaphan, C., Xiao, H., Decker, E. a, y Yongsawatdigul, J. 2015. Chemical and cellular antioxidative properties of threadfin bream (*Nemipterus spp.*) surimi byproduct hydrolysates fractionated by ultrafiltration. *Food chemistry* 167 7–15.

## CAPÍTULO 9. ANEXOS

**Anexo A. Nomenclatura empleada para aminoácidos de polipéptidos**

Abreviatura		Nombre
1 letra	3 letras	
A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutámico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina

**Anexo B. Curvas de calibración****B1. Curva de calibración de Bradford****B2. Curva de calibración de Tirosina**

**Anexo C. ANOVA de la precipitación con sulfato de amonio**Proteína del sobrenadante de *B. karatas*

Effect	Univariate Results for Each DV (Análisis de precipitación con sulfato de amonio) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	Degr. of Freedom	[Proteína] B. karatas SS	[Proteína] B. karatas MS	[Proteína] B. karatas F	[Proteína] B. karatas p
Intercept	1	53704.57	53704.57	98.82780	0.000575
[NH <sub>4</sub> SO <sub>3</sub> ]	1	5924.54	5924.54	10.90240	0.029881
Error	4	2173.66	543.42		
Total	5	8098.20			

Proteína del sobrenadante de *B. pinguin*

Effect	Univariate Results for Each DV (Análisis de precipitación con sulfato de amonio) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	Degr. of Freedom	[Proteína] B. pinguin SS	[Proteína] B. pinguin MS	[Proteína] B. pinguin F	[Proteína] B. pinguin p
Intercept	1	116587.9	116587.9	406.0129	0.000001
[NH <sub>4</sub> SO <sub>3</sub> ]	2	14850.7	7425.4	25.8586	0.001123
Error	6	1722.9	287.2		
Total	8	16573.7			

Cell No.	LSD test; variable [Proteína] B. pinguin (Análisis de precipitación con sulfato de amonio) Homogenous Groups, alpha = .05000 Error: Between MS = 287.15, df = 6.0000				
	[NH <sub>4</sub> SO <sub>3</sub> ]	[Proteína] B. pinguin Mean	1	2	3
3	30%S	61.8095	****		
2	20%S	118.6878		****	
1	0%S	160.9524			****

Actividad del sobrenadante de *B. karatas*

Univariate Results for Each DV (Análisis de precipitación con sulfato de amonio) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	Degr. of Freedom	Actividad B. karatas SS	Actividad B. karatas MS	Actividad B. karatas F	Actividad B. karatas p
Intercept	1	336.6755	336.6755	159.4765	0.000226
[NH <sub>4</sub> SO <sub>3</sub> ]	1	247.7480	247.7480	117.3533	0.000412
Error	4	8.4445	2.1111		
Total	5	256.1925			

Actividad del sobrenadante-precipitado 20% de *B. karatas*

Univariate Results for Each DV (Análisis de precipitación con sulfato de amonio) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	Degr. of Freedom	Actividad B. karatas SS	Actividad B. karatas MS	Actividad B. karatas F	Actividad B. karatas p
Intercept	1	293.9300	293.9300	204.8416	0.000138
[NH <sub>4</sub> SO <sub>3</sub> ]	1	211.2860	211.2860	147.2465	0.000265
Error	4	5.7397	1.4349		
Total	5	217.0257			

Actividad del sobrenadante de *B. pinguin*

Univariate Results for Each DV (Análisis de precipitación con sulfato de amonio) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	Degr. of Freedom	Actividad B. pinguin SS	Actividad B. pinguin MS	Actividad B. pinguin F	Actividad B. pinguin p
Intercept	1	1937.222	1937.222	612.8999	0.000000
[NH <sub>4</sub> SO <sub>3</sub> ]	2	628.601	314.301	99.4387	0.000025
Error	6	18.964	3.161		
Total	8	647.566			

LSD test; variable Actividad B. pinguin (Análisis de precipitación con sulfato de amonio) Homogenous Groups, alpha = .05000 Error: Between MS = 3.1607, df = 6.0000					
Cell No.	[NH <sub>4</sub> SO <sub>3</sub> ]	Actividad B. pinguin Mean	1	2	3
3	30%S	3.03333	****		
2	20%S	18.70556		****	
1	0%S	22.27500			****

Actividad del sobrenadante-precipitado 20% de *B. pinguin*

Univariate Results for Each DV (Análisis de precipitación con sulfato de amonio) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	Degr. of Freedom	Actividad B. pinguin SS	Actividad B. pinguin MS	Actividad B. pinguin F	Actividad B. pinguin p
Intercept	1	2387.749	2387.749	454.0084	0.000029
[NH <sub>4</sub> SO <sub>3</sub> ]	1	9.275	9.275	1.7636	0.254886
Error	4	21.037	5.259		
Total	5	30.312			

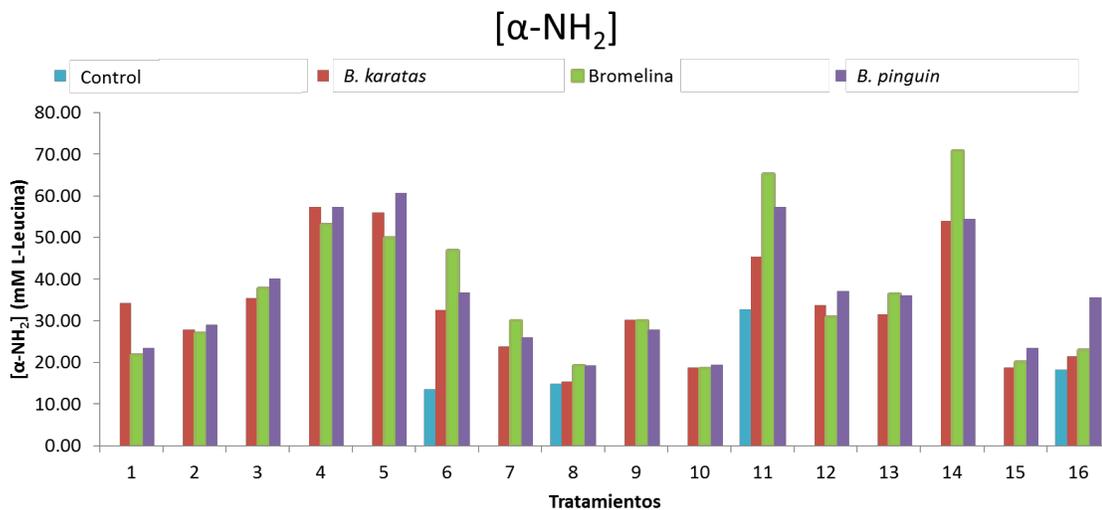
Actividad del sobrenadante-precipitado 30% de *B. pinguin*

Effect	Univariate Results for Each DV (Análisis de precipitación con sulfato de amonio) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	Degr. of Freedom	Actividad B. pinguin SS	Actividad B. pinguin MS	Actividad B. pinguin F	Actividad B. pinguin p
Intercept	1	741.7781	741.7781	222.3221	0.000118
[NH <sub>4</sub> SO <sub>3</sub> ]	1	392.2573	392.2573	117.5654	0.000411
Error	4	13.3460	3.3365		
Total	5	405.6033			

**Anexo D. Concentración de proteína del sustrato previa a la hidrólisis enzimática**

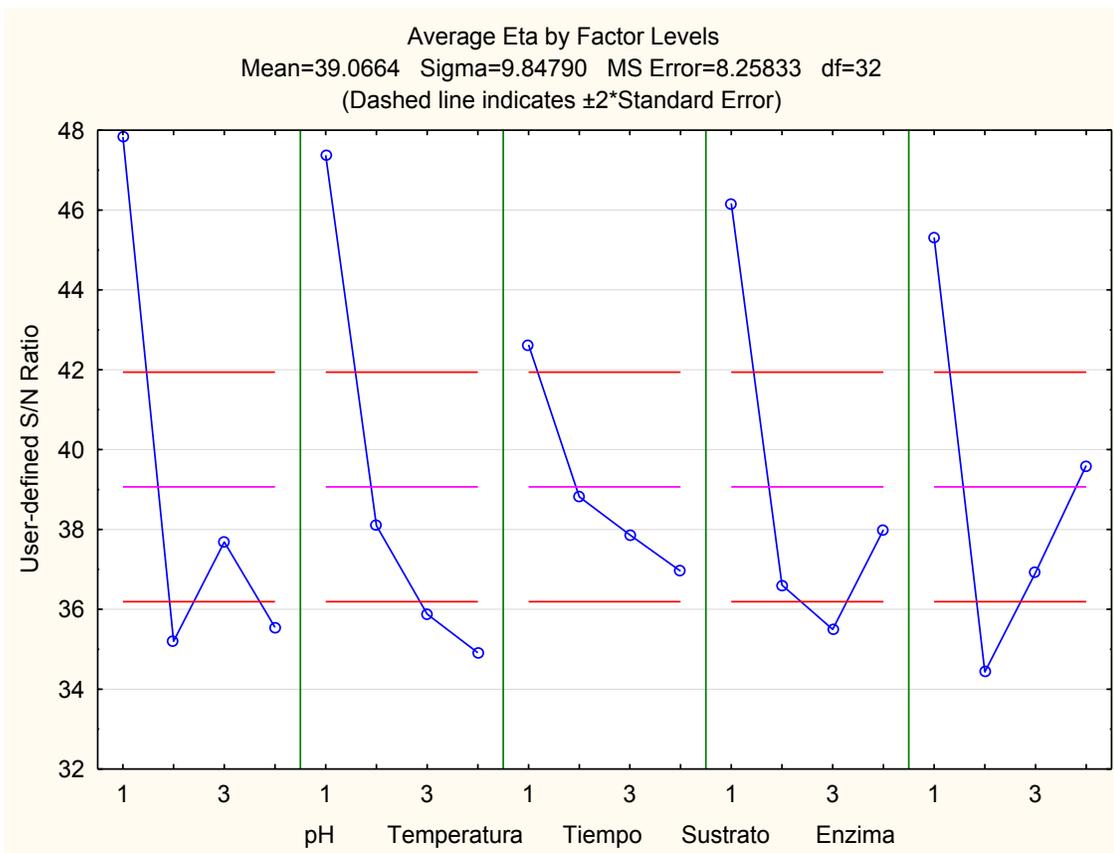
pH	Sustrato, g	Bradford, μg/ml
6.5	0.50	386.4
6.5	0.75	840.3
6.5	1.00	986.4
6.5	1.50	1091.1
7.0	1.50	1429.2
7.0	1.00	1119.7
7.0	0.75	1292.7
7.0	0.50	1224.4
7.5	0.75	2156.2
7.5	0.50	1765.7
7.5	1.50	3490.2
7.5	1.00	3458.4
8.0	1.00	4548.6
8.0	1.50	4662.9
8.0	0.50	2547.3
8.0	0.75	3375.9

Anexo E. Análisis Taguchi  $L'_{16}$  para la concentración de grupos  $\alpha\text{-NH}_2$



E1 *B. karatas*

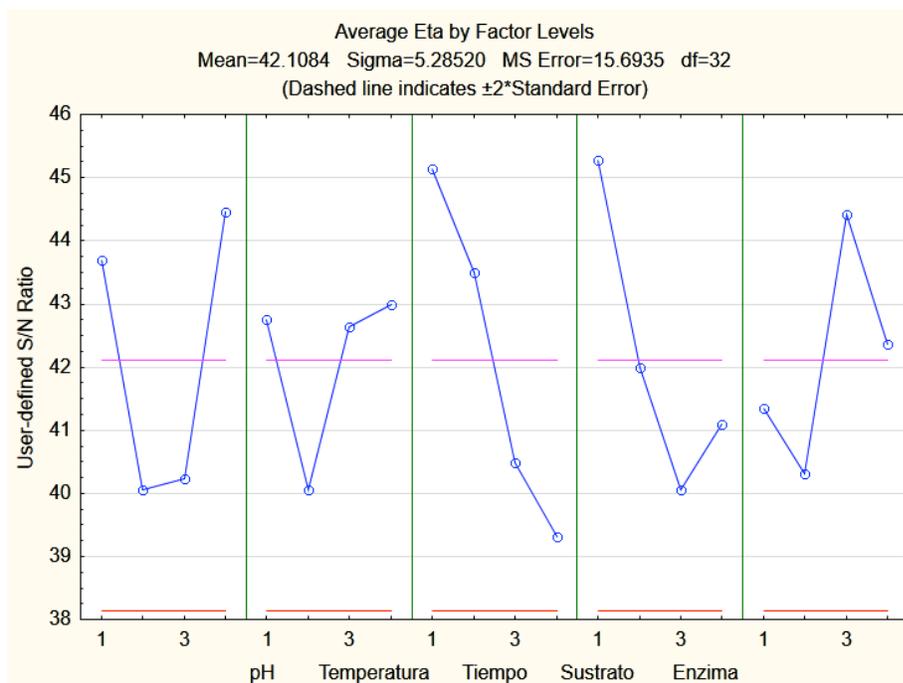
Analysis of Variance ( <i>B karatas</i> ) Mean = 39.0664 Sigma = 9.84790					
	SS	df	MS	F	p
{1}pH	1272.980	3	424.3267	51.38166	0.000000
{2}Temperatura	1168.504	3	389.5013	47.16467	0.000000
{3}Tiempo	223.255	3	74.4183	9.01130	0.000180
{4}Sustrato	844.301	3	281.4337	34.07877	0.000000
{5}Enzima	784.803	3	261.6009	31.67721	0.000000
Residual	264.267	32	8.2583		



Expected S/N Ratio under Optimum Conditions ( <i>B karatas</i> ) Mean = 39.0664 Sigma = 9.84790			
	Level	Effect - Size	Standard - Error
<b>{1}pH</b>	1	8.76581	1.436865
<b>{2}Temperatura</b>	1	8.30853	1.436865
<b>{3}Tiempo</b>	1	3.55748	1.436865
<b>{4}Sustrato</b>	1	7.10178	1.436865
<b>{5}Enzima</b>	1	6.24690	1.436865
<b>Expected S/N</b>		73.04688	

**E2 *B. pinguin***

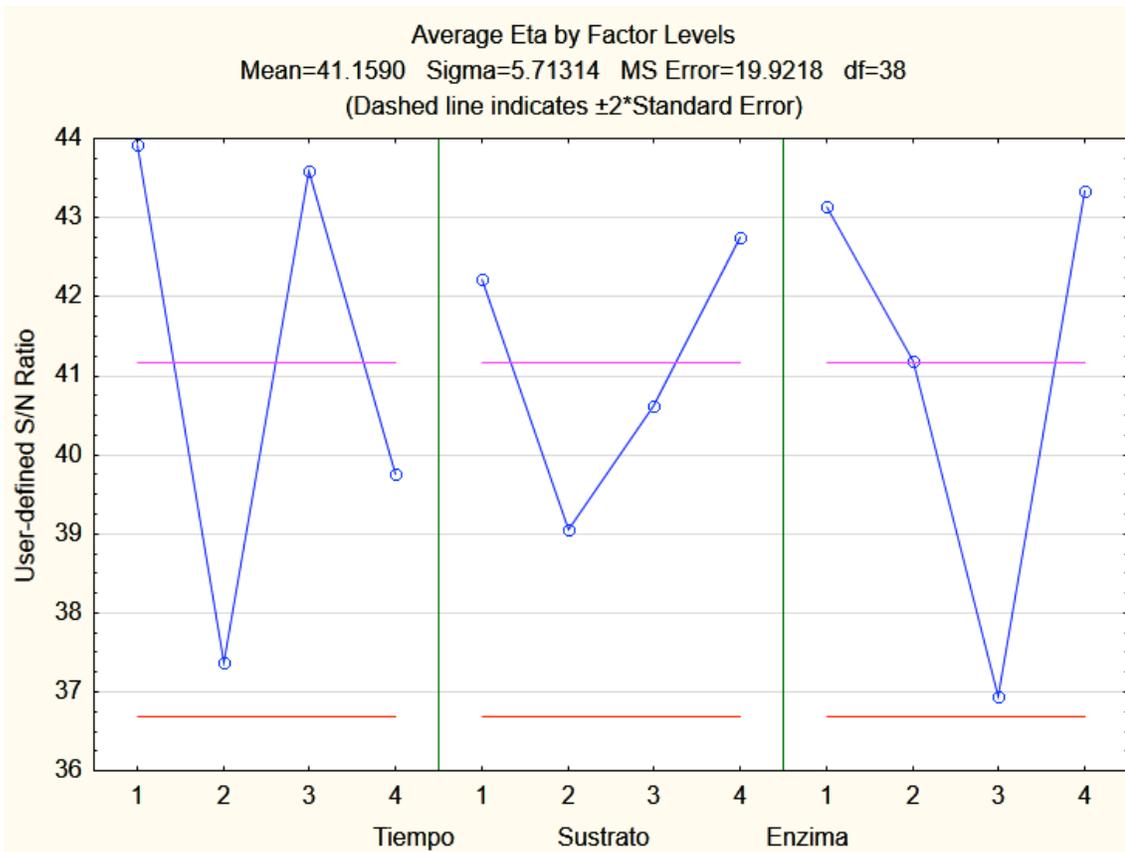
Analysis of Variance ( <i>B pinguin</i> ) Mean = 42.1084 Sigma = 5.28520					
	SS	df	MS	F	p
{1}pH	189.6053	3	63.20177	4.027268	0.015428
{2}Temperatura	68.5298	3	22.84325	1.455591	0.245116
{3}Tiempo	258.2497	3	86.08322	5.485294	0.003714
{4}Sustrato	184.1071	3	61.36905	3.910486	0.017375
{5}Enzima	110.1858	3	36.72860	2.340376	0.091896
Residual	502.1906	32	15.69346		



Expected S/N Ratio under Optimum Conditions ( <i>B pinguin</i> ) Mean = 42.1084 Sigma = 5.28520			
	Level	Effect - Size	Standard - Error
{1}pH	4	2.34453	1.980748
{2}Temperatura	4	0.87968	1.980748
{3}Tiempo	1	3.02657	1.980748
{4}Sustrato	1	3.17615	1.980748
{5}Enzima	3	2.30577	1.980748
Expected S/N		53.84114	

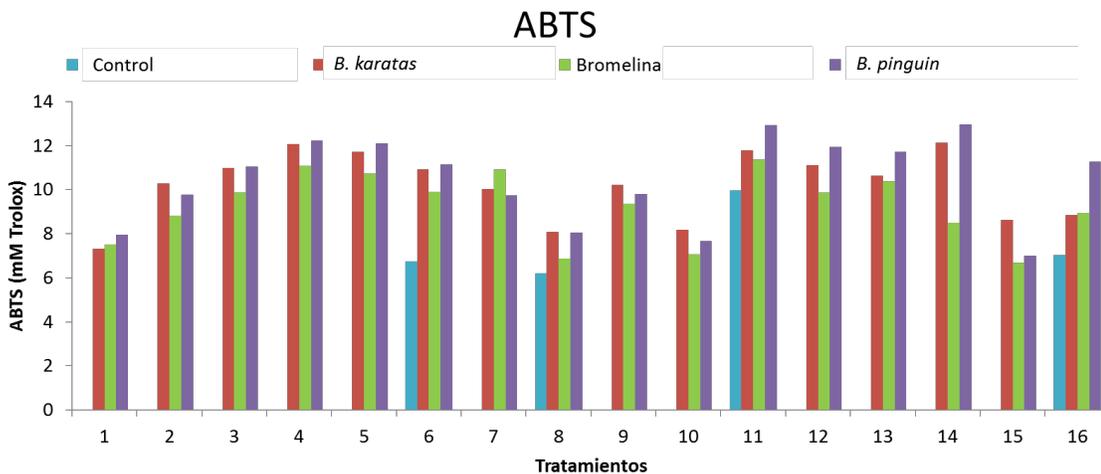
**E3 Bromelina**

Analysis of Variance (Bromelina) Mean = 41.1590 Sigma = 5.71314					
	SS	df	MS	F	p
<b>{1}Tiempo</b>	359.2519	3	119.7506	6.011034	0.001866
<b>{2}Sustrato</b>	100.3134	3	33.4378	1.678453	0.187879
<b>{3}Enzima</b>	317.4863	3	105.8288	5.312208	0.003711
<b>Residual</b>	757.0286	38	19.9218		



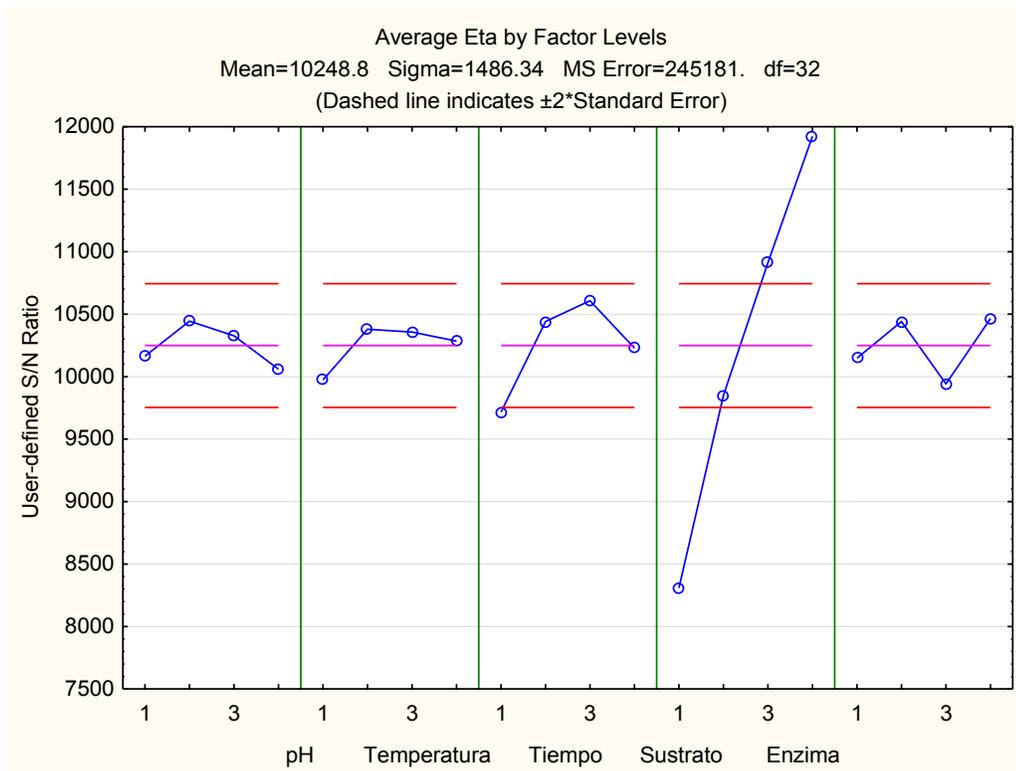
Expected S/N Ratio under Optimum Conditions (Bromelina) Mean = 41.1590 Sigma = 5.71314			
	Level	Effect - Size	Standard - Error
<b>{1}Tiempo</b>	1	2.77468	2.231692
<b>{2}Sustrato</b>	4	1.58963	2.231692
<b>{3}Enzima</b>	4	2.18564	2.231692
<b>Expected S/N</b>		47.70895	

**Anexo F. Análisis Taguchi L<sub>16</sub> para capacidad antioxidante por ABTS**



**F1 B. karatas**

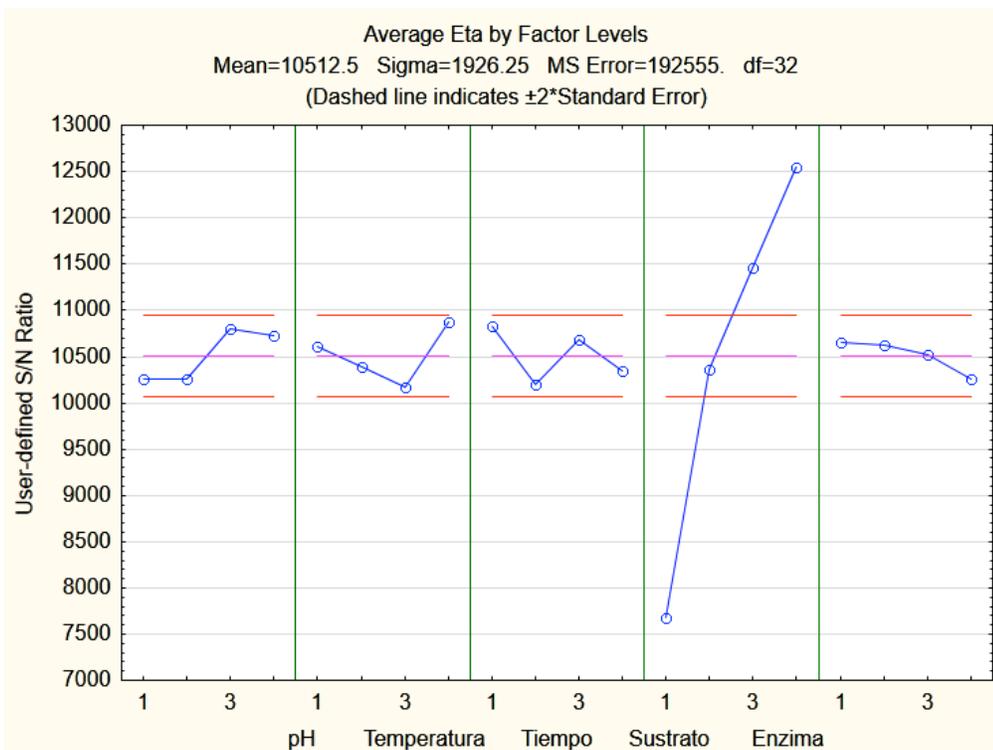
Analysis of Variance ( <i>B karatas</i> ) Mean = 10248.8 Sigma = 1486.34					
	SS	df	MS	F	p
{1}pH	1051498	3	350500	1.4296	0.252322
{2}Temperatura	1262668	3	420890	1.7166	0.183274
{3}Tiempo	5399040	3	1799680	7.3402	0.000706
{4}Sustrato	86016300	3	28672100	116.9425	0.000000
{5}Enzima	2256831	3	752277	3.0682	0.041822
Residual	7845796	32	245181		



Expected S/N Ratio under Optimum Conditions ( <i>B karatas</i> ) Mean = 10248.8 Sigma = 1486.34			
	Level	Effect - Size	Standard - Error
{1}pH	2	195.95	247.5788
{2}Temperatura	2	130.63	247.5788
{3}Tiempo	3	359.23	247.5788
{4}Sustrato	4	1675.33	247.5788
{5}Enzima	4	215.54	247.5788
Expected S/N		12825.46	

F2 *B. pinguin*

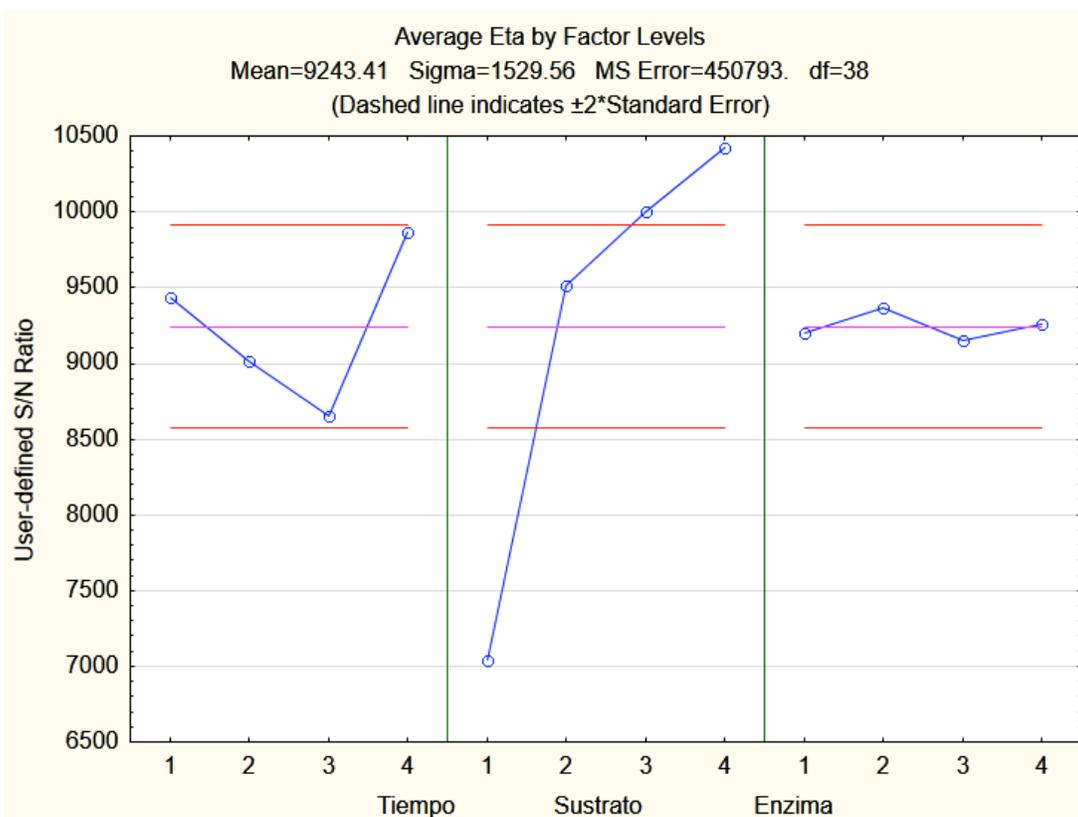
Analysis of Variance ( <i>B pinguin</i> ) Mean = 10512.5 Sigma = 1926.25					
	SS	df	MS	F	p
{1}pH	3084456	3	1028152	5.3395	0.004262
{2}Temperatura	3244441	3	1081480	5.6165	0.003285
{3}Tiempo	2969560	3	989853	5.1406	0.005150
{4}Sustrato	157765500	3	52588480	273.1084	0.000000
{5}Enzima	1164134	3	388045	2.0152	0.131530
Residual	6161772	32	192555		



Expected S/N Ratio under Optimum Conditions ( <i>B pinguin</i> ) Mean = 10512.5 Sigma = 1926.25			
	Level	Effect - Size	Standard - Error
{1}pH	3	287.16	219.4057
{2}Temperatura	4	364.53	219.4057
{3}Tiempo	1	311.96	219.4057
{4}Sustrato	4	2041.05	219.4057
{5}Enzima	1	137.44	219.4057
Expected S/N		13654.65	

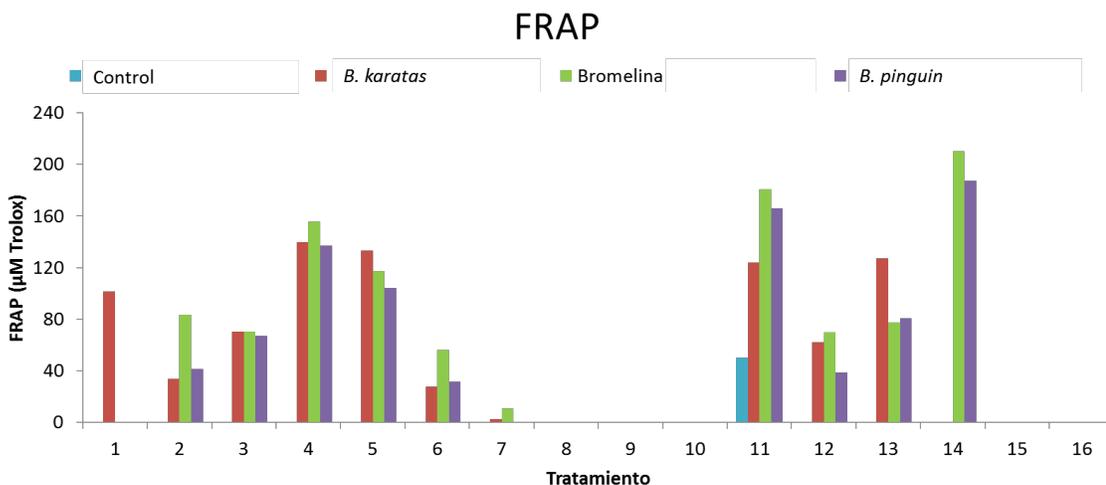
**F3 Bromelina**

Analysis of Variance (Bromelina) Mean = 9243.41 Sigma = 1529.56					
	SS	df	MS	F	p
<b>{1}Tiempo</b>	9871477	3	3290492	7.29934	0.000555
<b>{2}Sustrato</b>	82654980	3	27551660	61.11823	0.000000
<b>{3}Enzima</b>	302243	3	100748	0.22349	0.879474
<b>Residual</b>	17130130	38	450793		



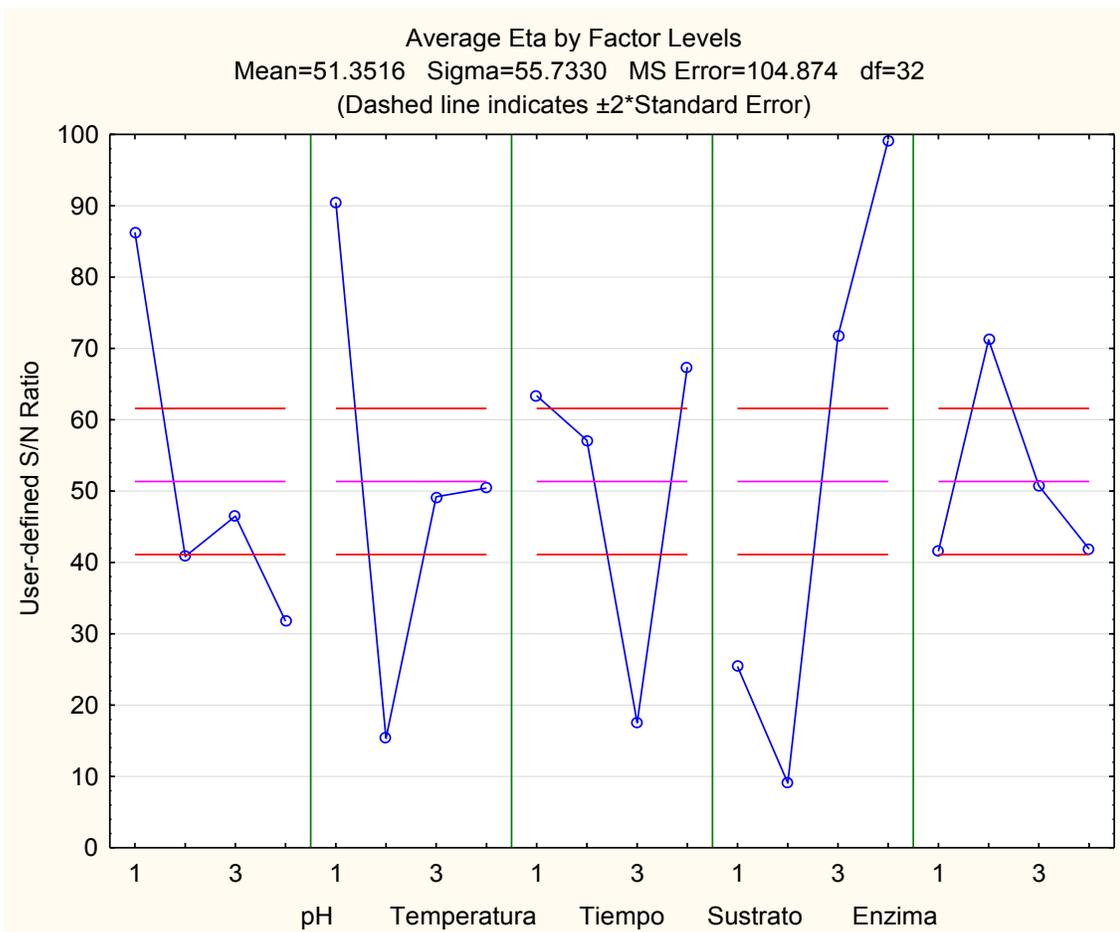
Expected S/N Ratio under Optimum Conditions (Bromelina) Mean = 9243.41 Sigma = 1529.56			
	Level	Effect - Size	Standard - Error
<b>{1}Tiempo</b>	4	624.24	335.7055
<b>{2}Sustrato</b>	4	1175.72	335.7055
<b>{3}Enzima</b>	2	119.93	335.7055
<b>Expected S/N</b>		11163.30	

**Anexo G. Análisis Taguchi L<sub>16</sub> para capacidad antioxidante por FRAP**



**G1 *B. karatas***

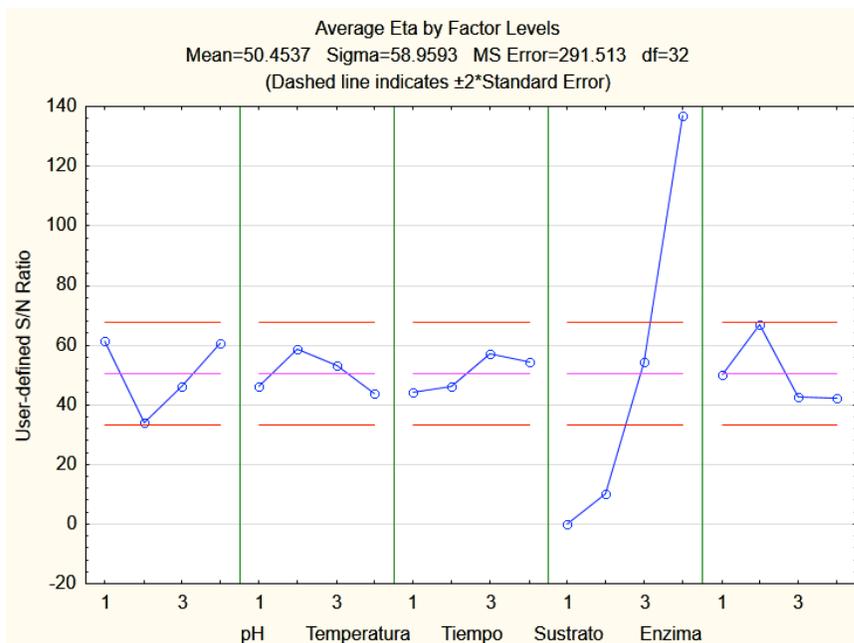
Analysis of Variance ( <i>B karatas</i> ) Mean = 51.3516 Sigma = 55.7330					
	SS	df	MS	F	p
{1}pH	20855.28	3	6951.76	66.2870	0.000000
{2}Temperatura	33942.29	3	11314.10	107.8831	0.000000
{3}Tiempo	18945.71	3	6315.24	60.2176	0.000000
{4}Sustrato	61930.88	3	20643.63	196.8428	0.000000
{5}Enzima	6959.81	3	2319.93	22.1212	0.000000
Residual	3355.96	32	104.87		



Expected S/N Ratio under Optimum Conditions ( <i>B karatas</i> ) Mean = 51.3516 Sigma = 55.7330			
	Level	Effect - Size	Standard - Error
<b>{1}pH</b>	1	34.9425	5.120393
<b>{2}Temperatura</b>	1	39.0814	5.120393
<b>{3}Tiempo</b>	4	16.0357	5.120393
<b>{4}Sustrato</b>	4	47.8072	5.120393
<b>{5}Enzima</b>	2	19.8546	5.120393
<b>Expected S/N</b>		209.0731	

**G2 *B. pinguin***

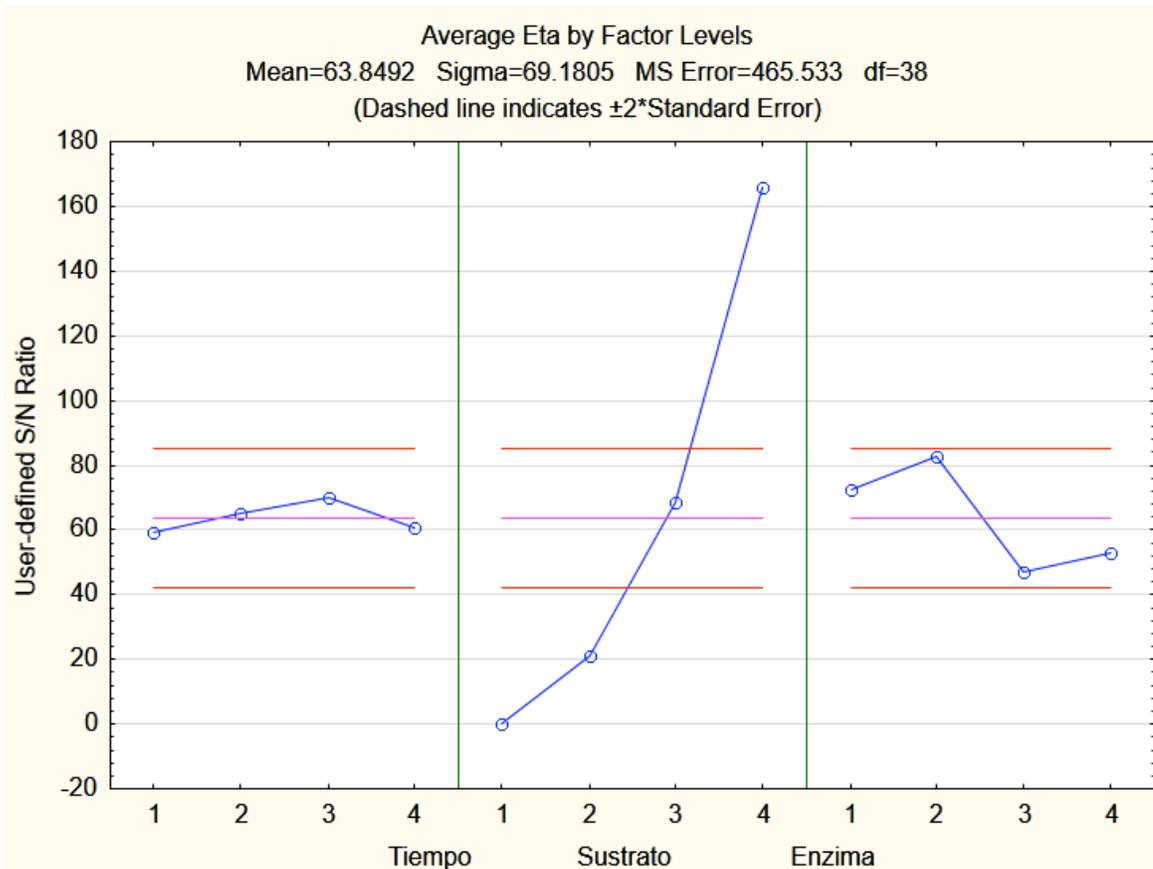
Analysis of Variance ( <i>B pinguin</i> ) Mean = 50.4537 Sigma = 58.9593					
	SS	df	MS	F	p
{1}pH	6157.3	3	2052.44	7.0407	0.000913
{2}Temperatura	1626.0	3	542.01	1.8593	0.156381
{3}Tiempo	1414.2	3	471.38	1.6170	0.204779
{4}Sustrato	140019.4	3	46673.14	160.1068	0.000000
{5}Enzima	4836.3	3	1612.09	5.5301	0.003561
Residual	9328.4	32	291.51		



Expected S/N Ratio under Optimum Conditions ( <i>B pinguin</i> ) Mean = 50.4537 Sigma = 58.9593			
	Level	Effect - Size	Standard - Error
{1}pH	1	10.7620	8.536869
{2}Temperatura	2	8.1754	8.536869
{3}Tiempo	3	6.6591	8.536869
{4}Sustrato	4	86.5809	8.536869
{5}Enzima	2	16.5123	8.536869
Expected S/N		179.1434	

**G3 Bromelina**

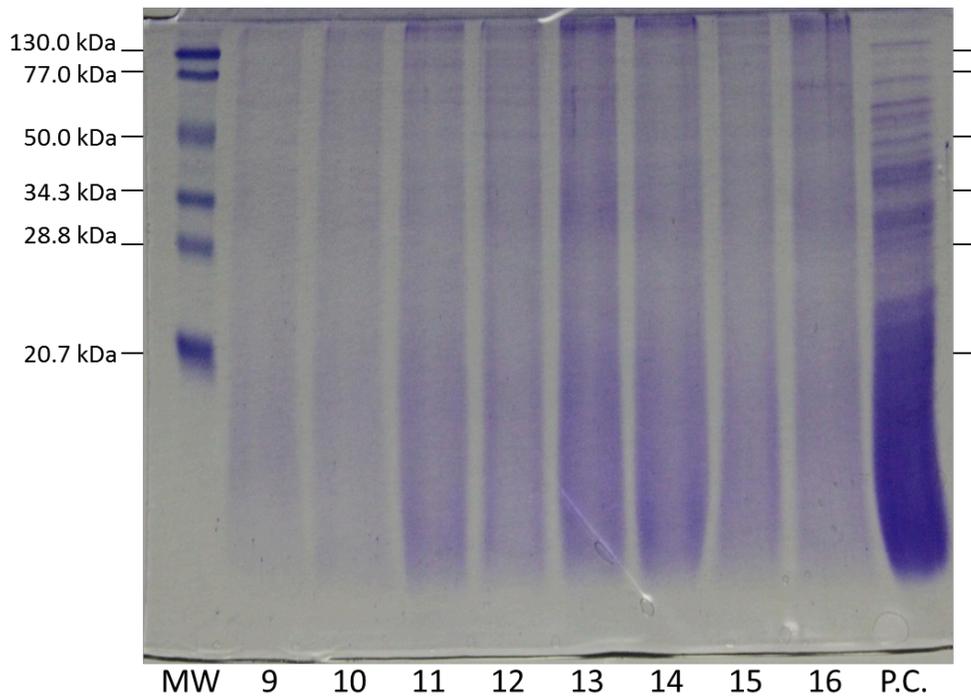
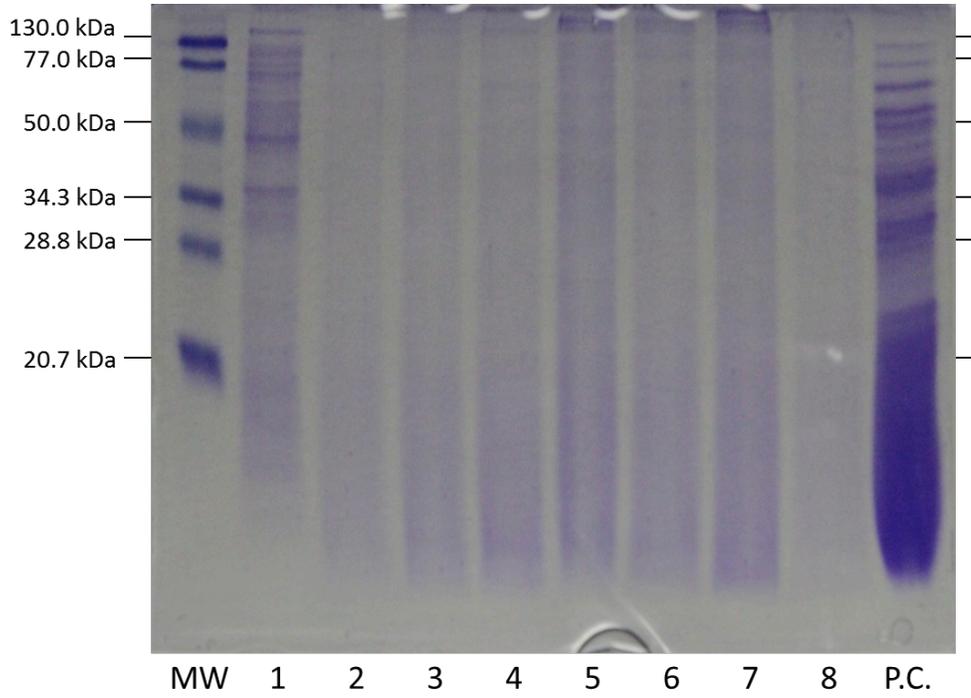
Analysis of Variance (Bromelina) Mean = 63.8492 Sigma = 69.1805					
	SS	df	MS	F	p
{1}Tiempo	861.0	3	287.00	0.6165	0.608573
{2}Sustrato	196225.5	3	65408.50	140.5025	0.000000
{3}Enzima	10162.5	3	3387.51	7.2766	0.000567
Residual	17690.2	38	465.53		



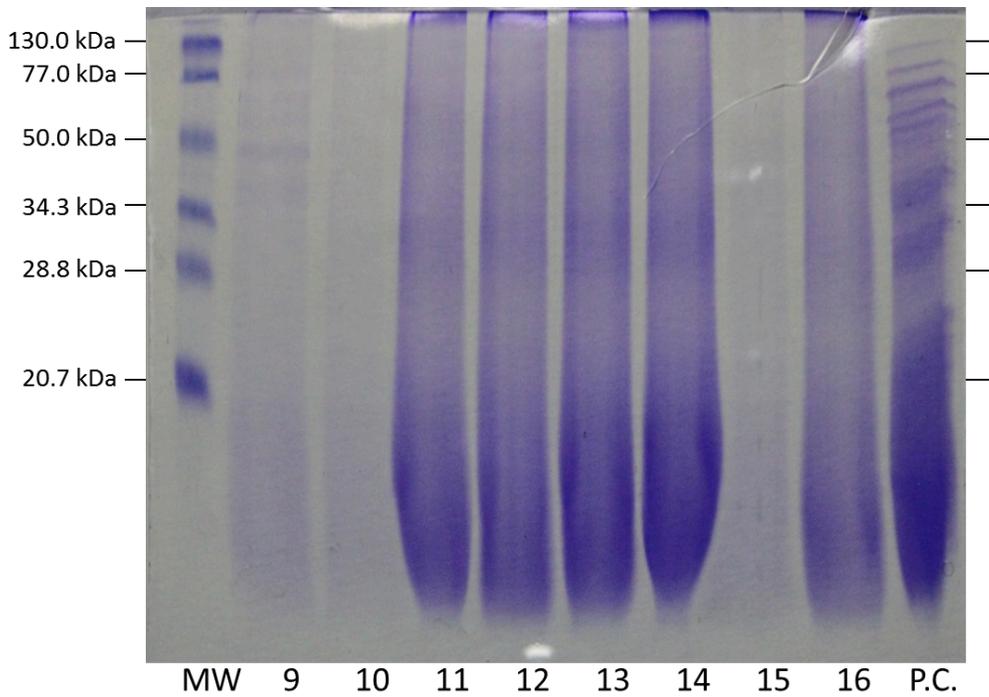
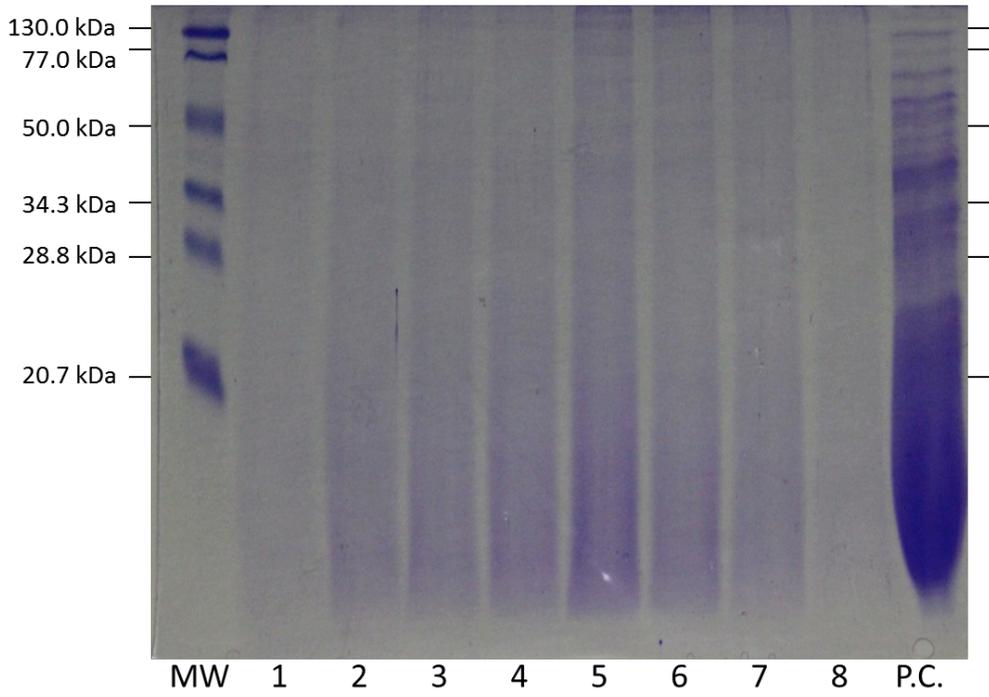
Expected S/N Ratio under Optimum Conditions (Bromelina) Mean = 63.8492 Sigma = 69.1805			
	Level	Effect - Size	Standard - Error
{1}Tiempo	3	6.3027	10.78810
{2}Sustrato	4	102.0825	10.78810
{3}Enzima	2	19.0236	10.78810
Expected S/N		191.2581	

**Anexo H. Electroforesis (SDS-PAGE) de los hidrolizados de la Etapa 2**

**H1 Hidrolizados con *B. karatas***



**H2 Hidrolizados con *B. pinguin***



**H3 Hidrolizados con bromelina**

