



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PROGRAMA DE POSTGRADO EN
PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA
AMINOPEPTIDASA (tcAPE) DE LA SEMILLA DE CACAO
(*Theobroma cacao* L.)**

IVANNA DE LIZETH ALVAREZ CONTRERAS

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO

2011

La presente Tesis titulada Purificación y caracterización bioquímica de la aminopeptidasa (CAPE) de la semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.), realizada por la alumna Ivanna de Lizeth Alvarez Contreras, bajo la dirección del Consejo Particular indicada, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

EN PRODUCCION AGROALIMENTARIA DEL TROPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:

DRA. CONSUELO OÑE C. BAUTISTA M.L.C.7

ASESOR:

DR. LUIS MANUEL VARGAS MILLAMÍ

ASESORA

DRA. MARÍA EUGENIA JARAMILLO FLORES

ASESORA:

DRA. ADRIANA DELGADO ALVARADO

H. Cárdenas Tabasco a 15 de Diciembre de 2011

RESUMÉN GENERAL

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA AMINOPEPTIDASA (TCAPE) DE LA SEMILLA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.)

Ivanna de Lizeth Alvarez Contreras, MC.

Colegio de Postgraduados, 2011

La aminopeptidasa tcAPE fue parcialmente purificada de semillas germinadas de cacao (*Theobroma cacao* L.) de diez días de germinación, en cuatro pasos de purificación 1) Homogenización y extracción de la enzima, 2) Precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación, 3) Concentración con el sistema de ultrafiltración Amicon® Millipore empleando una membrana de 10 kDa de corte de peso molecular y 4) Cromatografía de intercambio iónico. La enzima fue parcialmente purificada 6.37 veces con un rendimiento de 56.56%. La tcAPE parcialmente purificada presento cuatro bandas de 131.82 kDa, 122.99 kDa, 80.61 kDa y 22.69 kDa, el cual fue estimado por electroforesis en gel de poliacrilamida a 12%, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), con tinción de plata, el cual hidroliza péptidos a temperatura de 50°C con un pH óptimo de 7.0. El sustrato H-Leu-pNA fue hidrolizado a una mayor proporción a 10 mM (4.889 UAE/mg de proteína total), seguido de H-Lys- pNA a 1 mM (1.778 UAE/mg de proteína total) confirmando la presencia de una aminopeptidasa (APE) (E.C. 3.4.11). Sin embargo, también se detectó actividad enzimática de Xaa-Pro-DAP (4.800 UAE/mg de proteína total) con el sustrato H-Ala-Pro-pNA. No se detectó actividad de la enzima tcCP, con el sustrato Bz-Tyr-pNA. El sitio activo contiene una serina metaloproteasa, debido a que la actividad enzimática de tcAPE fue inhibida en un 100% por Leupeptina y 81.82% por el agente quelante EDTA. Sin embargo, la actividad de tcAPE parcialmente purificada fue inhibida por los iones de cadmio, mercurio, bario y calcio, lo que nos indica que en su sitio activo está presente un grupo sulfidrilo.

Palabras claves: *Theobroma cacao* L., H-Leu-pNA, aminopeptidasa tcAPE.

ABSTRACT

PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF AMINOPEPTIDASE (tcAPE) OF THE COCOA BEAN (*Theobroma cacao* L.)

Ivanna de Lizeth Alvarez Contreras, MC.

Colegio de Postgraduados, 2011

tcAPE aminopeptidase was partially purified from germinated seeds of cacao (*Theobroma cacao* L.) ten days of germination, in four purification steps 1) Homogenization and extraction of the enzyme, 2) precipitation with ammonium sulfate to 60% saturation, 3) Concentration with Amicon ® ultrafiltration system Millipore membrane using a 10 kDa molecular weight cutoff and 4) ion exchange chromatography. The partially purified enzyme was 6.37 times with a yield of 56.56%. The partially purified tcAPE has four bands 131.82 kDa, 122.99 kDa, 80.61 kDa and 22.69 kDa, which was estimated by polyacrylamide gel electrophoresis on 12% denaturing conditions (SDS-PAGE) with silver staining, which peptides hydrolyzed at 50°C with an optimum pH of 7.0. The substrate H-Leu-pNA was hydrolyzed to a greater share to 10 mM (4.889 UAE / mg of total protein), followed by H-Lys-pNA to 1 mM (1.778 UAE / mg of total protein), confirming the presence of a aminopeptidase (APE) (E.C.3.4.11). However, enzyme activity was also detected in Xaa-Pro-DAP (4.800 UAE / mg of total protein) with the substrate H-Ala-Pro-pNA. No activity was detected tcCP enzyme with the substrate Bz-Tyr-pNA. The active site contains a serine metalloprotease, because the enzyme activity was inhibited tcAPE 100% by leupeptin and 81.82% for the chelating agent EDTA. However, the partially purified tcAPE activity was inhibited by ions of cadmium, mercury, barium and calcium, which indicates that its active site sulfhydryl group is present.

Keywords: *Theobroma cacao* L., H-Leu-pNA, aminopeptidase tcAPE.

DEDICATORIA

A mi madre **Nelis Contreras Juárez**, por darme la oportunidad de realizar un sueño más en mi vida y sobre todo por el gran amor, dedicación, cuidado y desvelos que ha tenido que aguantar día a día hasta la obtención de este gran éxito. Te amo mami.

A mi padre **Benito Almendra Palma**, por darme la gran dicha de tenerte como un ejemplo paterno, gracias por que en todo momento me has apoyado y has tenido palabras de aliento en los momentos más difíciles de mi vida. Gracias por permitir dejarnos entrar tu vida.

A mi gordo **Sahury Sael Palomeque Alvarez**, porque tú fuiste el motor principal que me impulso a lograr este gran éxito. Te amo bebe y agradezco tu apoyo incondicional. Este sacrificio y esfuerzo también es tuyo.

A un ser especial que día a día crece dentro de mí y que me ha dado la fortaleza para seguir luchando contra las adversidades que se presenta en el camino. Gracias **Gustavo Alberto** por elegirme y darme nuevamente ese don tan maravilloso de ser... mamá. Te Amo.

A **José Alberto Naranjo González**, por haber llegado a mi vida inesperadamente, y porque me has brindado amor, cariño, comprensión y sobre todo por la paciencia que me has tenido durante esta nueva etapa de nuestras vidas, por eso y por muchas cosas más... Te amo Ogrin.

A mi hermosa **familia**, que directa o indirectamente me han apoyado y me han demostrado su amor, cariño y comprensión. Y muy en especial a mi hermana **Yolanda**, a mis tíos **Aurelia, Fredy, Josefina**, a mi gordo **Bryant**, a mi abue **Elena Contreras** y como olvidarme de mi Primis **Naty Sansores**. Gracias por levantarme en los momentos de debilidad, a todos los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

En especial a **Dios** por darme la salud, fortaleza, serenidad y sabiduría necesaria para afrontar cada reto y obstáculo que se me presenta a lo largo de la vida.

Al **Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT)**, por haber financiado mis estudios en el posgrado en Producción Agroalimentaria en el Trópico.

Al **Proyecto fondo sectorial CONACYT 40704**. Proteasas implicadas en los procesos de germinación y fermentación de la semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.), por haber financiado este proyecto.

A la **Línea Prioritaria de Investigación** Agroecosistemas Tropicales (LPI-2), por haber contribuido con recursos para la realización de este trabajo de investigación.

Al **colegio de Postgraduados**, por abrirme las puertas a un nuevo conocimiento científico, al **personal administrativo, académico, técnicos, personal de apoyo** y a todas las personas que laboran en esta importante institución. En especial a la **Lic. Elsy, Sra. Celia, Teacher Juanita, Anita, Maggy, MC. Gina, Ing. José Manuel, Lic. Martin, Arnulfo** y como olvidarme de **Dn. José Luis**. Gracias por todas las facilidades prestadas.

A la **Dra. Consuelo Bautista Muñoz**, por haberme brindado un voto de confianza y haberme permitido trabajar en la realización de esta tesis. Gracias por todos los consejos, aportación, dedicación y por la amistad brindada durante el transcurso de mi formación profesional.

A la **Dra. Adriana Delgado Alvarado**, por haberme brindado el apoyo, consejos y asesorías, siempre que lo necesite.

A la **Dra. Ma. Eugenia Flores Jaramillo**, por haberme asesorado y haberme brindado sus instalaciones para la capacitación en la realización de la parte experimental de este trabajo.

Al **Dr. Luis Manuel Vargas Villamil**, por confiar en mi persona y por ser parte de mi consejo. Gracias por su contribución.

A la **Dra. María de la Luz Sánchez Mundo**, porque parte de este trabajo te lo debo. Gracias por tus valiosas aportaciones, amistad, y confianza.

Al **Dr. Juan Manuel Zaldívar Cruz**, porque siempre tuvo palabras de aliento en los momentos más difíciles de esta investigación. Gracias por su valiosa amistad y por su confianza.

Al **Dr. Armando Guerrero Peña**, por las facilidades prestadas en sus instalaciones y por el apoyo brindado para la realización de esta investigación.

A **mis compañeros y amigos de la generación 2009-2010**. A los tres mosqueteros (Eve, Erika y Charly), Josué, Betty, Lorena, Isai, Francis, Dn. Héctor, Cristóbal, Pacheco, Chabe, Adrian. Gracias por los buenos y malos momentos que compartimos.

A mis amiguitas **Blanquita** y **Karencho**. Gracias por haberme brindado lo más hermoso... La amistad.

Y a todos aquellos que contribuyeron en este trabajo

CONTENIDO

| | |
|---|-----|
| ABSTRACT | II |
| DEDICATORIA | III |
| AGRADECIMIENTOS | IV |
| INDICE DE FIGURAS | X |
| ABREVIATURAS | XII |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II.- OBJETIVOS | 3 |
| 2.1. OBJETIVO GENERAL | 3 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS | 3 |
| III.- HIPÓTESIS | 4 |
| 3.1. Hipótesis general..... | 4 |
| VI. REVISION DE LITERATURA | 5 |
| 4.1. Descripción botánica del cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)..... | 5 |
| 4.2. Clasificación botánica y distribución de los cultivares de <i>Theobroma cacao</i> L. | 7 |
| 4.2.1. Cacao criollo | 8 |
| 4.2.2. Cacao forastero..... | 8 |
| 4.2.3. Cacao Trinitario..... | 9 |
| 4.3. Composición química de <i>Theobroma cacao</i> L. | 10 |
| 4.4. Producción de cacao | 11 |
| 4.5. Proceso de germinación de la semilla..... | 12 |
| 4.5. Definición y clasificación de proteasas..... | 16 |
| 4.6. Purificación de las proteínas | 19 |
| 4.6.1. Técnicas en la purificación de proteínas | 19 |
| 4.6.1.1. Obtención del extracto crudo | 19 |
| 4.6.1.2. Fraccionamiento del extracto crudo por precipitación selectiva con sulfato de amonio y diálisis..... | 20 |
| 4.6.1.3. Cromatografía en gel o exclusión molecular | 21 |
| 4.6.1.4. Cromatografía de afinidad..... | 23 |

| | |
|---|-----------|
| 4.6.1.5. Cromatografía de interacción hidrofóbica | 24 |
| 4.6.1.6. Cromatografía de intercambio iónico | 24 |
| 4.6.1.7. Electroforesis | 25 |
| 4.7. Función de las Aminopeptidasas (APE´s) | 27 |
| 4.7.1. Clasificación y nomenclatura de las aminopeptidasas (APE´s) | 29 |
| 4.7.2. Propiedades de las aminopeptidasas descritas en plantas..... | 30 |
| 4.7.3. Leucina aminopeptidasas (LAP´s) especie especifica de plantas con importantes papeles de defensa. | 32 |
| 4.7.4. Enzimas hidrolíticas descritas en la semilla de <i>Theobroma cacao</i> L. | 34 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS | 37 |
| 5.1 Material biológico | 37 |
| 5.1.1. Muestreo | 37 |
| 5.2. Métodos | 37 |
| 5.2.1. Preparación de polvos secos de acetona | 37 |
| 5.2.2. Preparación del extracto enzimático | 38 |
| 5.3. Purificación de la enzima tcAPE..... | 38 |
| 5.3.1. Precipitación con sulfato de amonio..... | 38 |
| 5.3.2. Diálisis y concentración de proteínas..... | 38 |
| 5.3.3. Determinación de la actividad enzimática de tcAPE | 39 |
| 5.3.4. Determinación de proteína total | 39 |
| 5.3.5. Cromatografía de Intercambio iónico | 40 |
| 5.3.6. Determinación del peso molecular mediante SDS-PAGE..... | 40 |
| 5.4. Caracterización bioquímica de la enzima tcAPE | 41 |
| 5.4.1. Determinación de actividad de las exopeptidasas tcCP y Xaa-Pro-DAP sobre la enzima tcAPE purificada. | 41 |
| 5.4.2. Determinación de actividad de la endopeptidasa aspartil proteínasa (tcAP) sobre la enzima tcAPE purificada. | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 5.4.3. Determinación de péptidos liberados por la técnica de Micro-Lowry | 42 |
| 5.4.4. Efecto de inhibidores y agentes reductores sobre la actividad enzimática ... | 42 |
| 5.4.5. Efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática | 42 |
| 5.4.6. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima | 43 |
| 5.4.7. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima..... | 43 |
| VI. RESULTADOS | 44 |
| 6.1. Condiciones de germinación | 44 |
| 6.2. Determinación de la actividad enzimática de Aminopeptidasa (tcAPE) de <i>T. cacao</i> L. | 44 |
| 6.3. Purificación y caracterización de la enzima tcAPE..... | 45 |
| 6.3.1. Purificación de la tcAPE de la semilla de cacao germinada..... | 45 |
| 6.3.2. Determinación de actividad de las exopeptidasas tcCP y Xaa-Pro-DAP sobre la enzima tcAPE purificada. | 47 |
| 6.3.3. Determinación de actividad de la endopeptidasa aspartil proteinasa (tcAP) sobre la enzima tcAPE purificada. | 48 |
| 6.3.4. Efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática de tcAPE en <i>Theobroma</i> <i>cacao</i> L. | 49 |
| 6.3.5. Efecto de iones metálicos sobre la actividad tcAPE en <i>Theobroma cacao</i> L. | 50 |
| 6.3.6. Determinación del peso molecular con Electroforesis en Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE) de tcAPE de <i>Theobroma</i> <i>cacao</i> L. | 51 |
| 6.3.7. pH óptimo de la tcAPE de <i>Theobroma cacao</i> L. | 52 |
| 6.3.8. Temperatura óptima de tcAPE de <i>Theobroma cacao</i> L. | 53 |
| VII. DISCUSIÓN | 55 |
| VIII. CONCLUSIÓN | 60 |
| IX. BIBLIOGRAFÍA | 62 |

INDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Contenido en las semillas del cacao por cada 100 g de cacao en base seca..... | 10 |
| Cuadro 2. Superficie sembrada y cosechada, producción y rendimiento de cacao en México..... | 12 |
| Cuadro 3. Técnicas de desintegración celular (Scopes, 1994)..... | 21 |
| Cuadro 4. Purificación parcial de la tcAPE de la semilla germinada de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)..... | 47 |
| Cuadro 5. Actividad de las exopeptidasas tcCP y Xaa-Pro-DAP en la fracción de la enzima tcAPE purificada frente a diferentes sustratos..... | 48 |
| Cuadro 6. Actividad de la endopeptidasa en la fracción de la enzima purificada frente al sustrato BSA..... | 48 |
| Cuadro 7. Efecto de los inhibidores y/o activadores de peptidasas sobre la actividad de tcAPE de <i>Theobroma cacao</i> L..... | 49 |
| Cuadro 8. Efecto de iones metálicos sobre la actividad de la enzima tcAPE en <i>Theobroma cacao</i> L..... | 50 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Árbol de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.). Rancho la Joya, Cunduacán, tabasco..... | 6 |
| Figura 2. Fruto y semilla de cacao (<i>T. cacao</i> L.). Rancho la Joya, Cunduacán, Tabasco..... | 7 |
| Figura 3. Tipos de cacao. a) Cacao criollo (Cultivado en la Hacienda la Joya, Cunduacán Tabasco), b) Cacao forastero (Tomada de http://www.directoalpaladar.com/ingredientes-y-alimentos/el-cacao-en-la-gastronomia.) y c) Cacao trinitario (Cultivado en la Hacienda Zaragoza, Chiapas). | 9 |
| Figura 4. a). Germinación hipógea en haba. b). Germinación epigea en frijol. (Rojas <i>et al.</i> , 1997). Fuente: http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx | 13 |
| Figura 5. Etapas de la germinación que conducen a la emergencia de la radícula. Fase I: fase de Imbibición; Fase II: fase de germinación <i>sensu stricto</i> ; Fase III: crecimiento de radícula (Rojas <i>et al.</i> , 1997 Tomado en: http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx). | 16 |
| Figura 6. Tipos de exopeptidasas. Los círculos llenos representan los fragmentos liberados. El triángulo indica el aminoácido terminal bloqueado, sustratos de algunas peptidasas omega (adaptado de Barrett, 1986). | 18 |
| Figura 7. Cromatografía en gel o exclusión molecular. La columna contiene un polímero entrecruzado con poros de tamaño seleccionado. Las proteínas mayores se desplazan más rápidamente que las de menor tamaño ya que son demasiado grandes para penetrar en los poros de las cuentas y siguen una ruta más directa a través de la columna. Las más pequeñas penetran en los poros y pasan más despacio (Lehninger, 1992). | 22 |
| Figura 8. Cromatografía de afinidad (Lehninger, 1992). | 23 |
| Figura 9. Cromatografía de intercambio iónico (Lehninger, 2000)..... | 25 |
| Figura 10. Electroforesis. a). Gel de poliacrilamida. b) Gel teñido con azul de Coomassie. El gel ilustra la purificación del enzima RNA polimerasa de la bacteria <i>E. coli</i> . El primer carril muestra las proteínas presentes en el extracto crudo. Los carriles siguientes muestran las proteínas presentes después de cada paso de purificación (Lehninger, 1992). | 27 |

Figura 11. Cotiledones de *Theobroma cacao* L. de 10 días de germinación desprovistos de la radícula y el eje embrionario..... 44

Figura 12. Purificación parcial de la tcAPE de semillas germinadas de cacao (*Theobroma cacao* L.). Las proteínas fueron detectadas por medición de la absorbencia a 280 nm (línea roja); la actividad de tcAPE fue ensayada contra H-Leu-pNA, a pH 7.0 (línea azul); cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharosa con gradiente de NaCl (línea negra punteada). 46

Figura 13. Análisis electroforético de las fracciones activas de la tcAPE de *Theobroma cacao* L. obtenidas en los diferentes pasos de purificación. La fracción con máxima actividad enzimática obtenida en cada paso de purificación fueron analizadas por PAGE-SDS en condición reductora y desnaturizante. El gel de electroforesis fue teñido con el procedimiento de nitrato plata. L1, Marcador de peso molecular; L2, extracto enzimático; L3, precipitación fraccionada con sulfato de amonio al 60%; L4, cromatografía de intercambio iónico realizada en la Columna XK 16/20 empacada con Q-Sepharosa. 52

Figura 14. Efecto del pH sobre la actividad de tcAPE parcialmente purificada a partir de *Theobroma cacao* L, sobre el substrato H-Leu-pNA. La actividad de tcAPE fue determinada a pH 4.0-5.0 con regulador de acetato de sodio 0.1 M con 1% de Tritón X-100 (Línea naranja), pH 6-7 con regulador de fosfato de sodio 0.1 M con 1% de Tritón X-100 (línea verde) y pH 7.0 a 9.0 con regulador de regulador de Tris-HCl 0.1 M con 1% de Tritón X-100 (Línea café) a 37 °C..... 53

Figura 15. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la tcAPE de *Theobroma cacao* L., sobre el substrato H-Leu-pNA. La actividad fue medida de 30-80°C y pH 7.0. H-Leu-pNA..... 54

ABREVIATURAS

APE = Aminopeptidasa.

APS = Persulfato de sodio.

BSA = Albúmina sérica bovina.

CuSO_4 = Sulfato de cobre.

DMSO = Dimetilsulfóxido.

EC = Comisión de enzimas.

EDTA = Ácido etilendiaminotetraacético.

g = Fuerza centrífuga relativa.

H-Leu-pNA = H-Leucina-p-nitroanilida.

HPLC = Cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

IEX = Cromatografía de intercambio iónico.

JA = Ácido jasmónico.

kDa = KiloDaltones.

LAP = Leucin Aminopeptidasa.

M = Molar.

mM = Milimolar.

NaOH = Hidróxido de sodio.

Na_2CO_3 = Carbonato de Sodio.

PAGE = Electroforesis en Gel de Policrilamida.

PDA = Polvos Secos de Acetona.

pI = Punto Isoeléctrico.

PM = Peso Molecular.

PMSF = Fenilmetilsulfonil fluoruro.

PVDF = Fluoruro de polivinilideno

PVPP = Polivinilpirrolidona.

SDS = Dodecil Sulfato de Sodio.

T. cacao (tc) = *Theobroma cacao*.

μg = microgramo.

UAE = Unidad de actividad enzimática

I. INTRODUCCIÓN

Theobroma cacao L., es una planta perenne, que pertenece a la clase **Dicotiledónea**, orden **Malvales** y familia **Sterculiaceae** (López, 1987), esta planta ha sido considerada por mucho tiempo, un cultivo de importancia mística para las culturas indígenas mesoamericanas y su importancia en la cultura moderna está creciendo por el potencial benéfico de los compuestos polifenólicos en la salud humana (Bennett, 2003).

En la década de los 90's se demostró que en *Theobroma cacao* L, las proteínas de reserva de la semilla, son hidrolizadas mediante proteasas, produciendo la formación de más de 80 oligopéptidos y aminoácidos libres diferentes (Biehl *et al.*, 1993; Voigt *et al.*, 1994b). También se ha descrito una aspartil proteinasa, la cual ha sido considerada una enzima clave, involucrada en la formación de los precursores del aroma del cacao, generados básicamente durante la fermentación de la semilla, los cuales calentados y en presencia de glucosa producen la formación de un aroma específico (Rohan, 1964; Biehl *et al.*, 1982b, 1985; Kirchhoff *et al.*, 1989). Sin embargo, Kirchhoff *et al.*, (1989) observaron una correlación entre la acumulación de aminoácidos libres y la generación de los precursores del aroma, por lo tanto concluyeron que los precursores del aroma específico del cacao, se forman por procesos proteolíticos dependientes del pH. Con base en lo anterior, se ha propuesto que los precursores del aroma, son derivados a partir de la degradación de la albúmina (7S) clase vicilina contenida en la semilla de *T. cacao*, y que esta degradación es realizada por enzimas con actividad de proteinasa aspártica, carboxipeptidasa y **aminopeptidasa**, las cuales están presentes en las semillas maduras del cacao no germinado (Voigt *et al.*, 1994a, b; Voigt y Biehl, 1995).

Las aminopeptidasas (APE's EC 3.4.11), son enzimas que liberan residuos de aminoácidos amino terminal, a partir de proteínas y péptidos. Estas enzimas son clasificadas dentro de muchos grupos con base en su estructura primaria (Barrett, 1998) y con respecto a su función están involucradas en el recambio proteico. Un papel fisiológico bien conocido para las APE's de plantas, es la movilización de las proteínas de reserva durante la germinación de semillas (Couton *et al.*, 1991; Mikkonen, 1992; Yamaoka *et al.*, 1994). Las APE's han sido identificadas como proteínas renacientes que albergan innumerables funciones. En bacterias y animales, además de procesar

proteolíticamente el extremo amino de proteínas y péptidos bioactivos, las APE's también tienen funciones secundarias que van desde represores transcripcionales, factores de recombinación sitio específico, receptores viral o de toxinas hasta el tráfico vesicular (Matsui *et al.*, 2006). Por otra parte, Yamauchi *et al.*, (2001), han propuesto que las APE's tienen otras funciones en los procesos biológicos fundamentales, como el mantenimiento de la vida media de las proteínas (Amrani *et al.*, 1995), respuesta de defensa a infecciones y heridas (Pautot *et al.*, 1993), maduración de proteínas (Giglione *et al.*, 2000) y transporte de auxinas (Murphy *et al.*, 2000). En plantas las APE's han sido identificadas y purificadas en chicharos (Elleman, 1974), frijol mungo (Chrispeels, 1976), maíz (Vodkin y Scandalios, 1980), cotiledones de cacahuate (Isola y Franzone, 1996), jojoba (Russell y Storey, 1958), tomate (Chao-Jung *et al.*, 2003), semilla de girasol (Tishinov *et al.*, 2009), soya (Couton *et al.*, 1991; Asano *et al.*, 2010), semilla de *Cannabis sativa* (Arima *et al.*, 2000). Sin embargo, ensayos previos efectuados en el Laboratorio de Fisiología vegetal del Colegio de Postgraduados, *campus* Tabasco, indican que la actividad de tcAPE, está presente durante la germinación y fermentación de la semilla de cacao criollo almendra blanca. Pero aún no existen reportes sobre la purificación y caracterización bioquímica de la(s) enzima(s) aminopeptidasa(s) de *T. cacao*, por lo que en este trabajo de tesis se propone realizar la purificación y caracterización bioquímica de al menos una proteasa con actividad enzimática de tcAPE(s) de *T. cacao* expresada durante el proceso de germinación de la semilla de cacao, con la finalidad de investigar posteriormente, el papel de esta(s) enzima(s) durante el proceso de germinación, así como sus posibles aplicaciones biotecnológicas.

II.- OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Purificar y caracterizar bioquímicamente al menos una proteasa con actividad de aminopeptidasa tcAPE expresada durante el proceso de germinación de la semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.).

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1. Obtener extractos enzimáticos de la semilla de cacao germinado y obtener la fracción proteica mediante precipitación fraccionada.
- 2.2.2. Identificar la actividad enzimática de aminopeptidasa (tcAPE) en el extracto enzimático obtenido de la semilla de cacao germinado.
- 2.2.3. Purificar la enzima con actividad enzimática de aminopeptidasa (tcAPE) identificada durante el proceso de germinación de la semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.).
- 2.2.4. Determinar el peso molecular de la tcAPE purificada, para su caracterización bioquímica.
- 2.2.5. Determinar el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de la enzima purificada para su caracterización bioquímica.
- 2.2.6. Probar el efecto de diferentes inhibidores específicos de proteasas sobre la actividad de la enzima tcAPE purificada.
- 2.2.7. Probar el efecto de diferentes cationes específicos de proteasas sobre la actividad de la enzima tcAPE purificada.

III.- HIPÓTESIS

3.1. Hipótesis general

Los niveles detectados de la actividad enzimática de tcAPE expresada durante el proceso de germinación de la semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.), permitirán aislar, purificar y caracterizar bioquímicamente a la proteasa tcAPE.

VI. REVISION DE LITERATURA

4.1. Descripción botánica del cacao (*Theobroma cacao* L.)

El primer nombre del árbol de cacao fue "*Amygdalae pecuniariae*" que significa "dinero-almendra" por su significado como moneda de intercambio. Sin embargo, fue el científico, naturista, botánico y zoólogo sueco, Carl Von Linne quien realizó la primera clasificación botánica del árbol, denominándolo *Theobroma cacao*, y que significa cacao, alimento de los dioses (Valenzuela, 2007). Diferentes especies de plantas tropicales pertenecen al género *Theobroma*. Se han reportado 22 especies, pero solamente una, el cacao (*Theobroma cacao* L., familia *Sterculiaceae*), presenta una significativa importancia comercial (Hunter, 1990), y por esto ha sido estudiada más profundamente (Kalvatchev *et al.*, 1998).

T. cacao L. (Figura 1) es un árbol de tamaño mediano (5-8 m) que puede alcanzar alturas de hasta 20 m cuando crece libremente bajo sombra intensa. Su corona es densa, redondeada y con un diámetro de 7-9 m. El tronco de este árbol es recto y se puede desarrollar en formas muy variadas. Su sistema radicular está compuesto por una raíz pivotante con muchas raíces secundarias, la mayoría de las cuales se encuentran en los primeros 30 cm del suelo (Toxopeus, 1969). Las hojas son simples, enteras y de color verde bastante variable (café claro, morado o rojizo, verde pálido) y de pecíolo corto. Miden de 15-50 cm de longitud y de 4-15 cm de ancho, con un ápice agudo o subagudo. Las ramas primarias se forman en un conjunto denominado "molinillo" (Urquhart, 1961). Las inflorescencias se localizan en el tallo, ramas principales (truncadas y caulífloras), en la base de las hojas, alrededor de la yema axilar y en la cicatriz que deja a la caída de la hoja. Al paso del tiempo, en los sitios de origen se produce un engrosamiento secundario que recibe el nombre de cojín floral, cuyo número de flores varía de acuerdo al genotipo y al sistema de cultivo (Hardy, 1960).



Figura 1. Árbol de cacao (*Theobroma cacao* L.). Rancho la Joya, Cunduacán, tabasco.

Los árboles de cacao florecen dos veces al año, siendo el principal periodo de floración en junio y julio. En los meses de septiembre y octubre tiene lugar una segunda floración pero más pequeña. Así la primera cosecha se concentra en los meses de octubre, noviembre y diciembre, y la segunda durante marzo y abril (López-Andrade *et al.*, 2003).

El fruto, de esta planta es una baya elíptica conocida como mazorca, y se forma por la unión de los 5 carpelos. Cada fruto contiene entre 30 y 40 semillas (Figura 2), con cotiledones de color blanco, púrpura o marrón-rojizo dependiendo del genotipo y envueltas en una pula o mucílago muy húmedo, blanco y dulce; razón por la cual al cacao fresco o recién extraído de la mazorca se le denomina “cacao en baba”. Las semillas están dispuestas en formas axiales e incrustadas en una masa mucilaginoso desarrollada en las capas externas de la testa. La forma de la mazorca varía de globosa a fusiforme, con una constricción o “cuello de botella” en el extremo del pedúnculo y el ápice es generalmente agudo (Toxopeus, 1969).

La pulpa contiene pequeñas cantidades de aminoácidos como ácido glutámico, ácido aspártico y asparagina (Hardy, 1960). Debido a estas características, su demanda aumenta cada día, ya que es importante en la elaboración del chocolate (López y Ramírez, 1987).



Figura 2. Fruto y semilla de cacao (*T. cacao* L.). Rancho la Joya, Cunduacán, Tabasco.

4.2. Clasificación botánica y distribución de los cultivares de *Theobroma cacao* L.

El género *Theobroma* está en el estrato más bajo del bosque lluvioso siempre verde. Todas las especies silvestres del género se encuentran en los bosques lluviosos del hemisferio occidental desde los 18° Norte a los 15° Sur, es decir desde México, hasta el sur de la Amazonía en Brasil y Bolivia, entre las altitudes desde los 0 a los 100 msnm (Toxopeus, 1985).

En la actualidad, desde el punto de vista botánico o genético, la especie *Theobroma cacao* L., puede clasificarse en tres grandes grupos: criollos, forastero amazónico y trinitarios, este último grupo es un híbrido producto de los dos anteriores (Burle, 1961; Braudeau, 1970).

4.2.1. Cacao criollo

El cacao criollo (Figura 3a), corresponde a una planta de poco vigor y bajo rendimiento, destacándose la alta calidad de sus semillas. Fue cultivado en América Latina durante el periodo Pre-colombiano y Colonial (Cheesman, 1944). Este tipo de cacao posee un cotiledón de color marfil parduzco a castaño muy claro, con un olor dulce unido a un aroma delicado característico (Braudeau, 1970).

Dentro de este grupo se ubican las formas de *T. cacao* subespecie **cacao** que crecen espontáneamente en el sureste de México y Centroamérica (Cuatrecasas, 1964); se consideran los primeros cacaos domesticados en las regiones cálidos-húmedas, donde se ubican asentamientos de la cultura Mesoamericana (Mora, 1959).

Este tipo de cacao fueron los primeros que se domesticaron, lo cual no fue casual o circunstancial, ya que el hombre conocía de alguna manera sus características de alta calidad por su alto contenido de grasa, sabor y aroma; sin embargo, actualmente han perdido su importancia comercial, y están en vías de extinción, debido a sus bajos rendimientos y alta susceptibilidad a enfermedades (especialmente a la pudrición de la mancha negra de la mazorca), sustituyéndolas así por cacaos forasteros (López-Andrade, 1996).

4.2.2. Cacao forastero

El cacao forastero (Figura 3b), se caracteriza por ser de mayor tolerancia a las enfermedades en comparación con el cacao criollo. Representa aproximadamente 95% de la producción mundial. (Braudeau, 1970). Este grupo corresponde a *Theobroma cacao* subespecie **sphaerocarpum**, cuyo genotipo característico es el denominado **calabacillo**, que integra poblaciones homogéneas en la Cuenca del Río Amazonas, cuyas características morfológicas y distribución geográficas se consideran opuestas a los tipos criollos y cacaos cultivados (Cuatrecasas, 1964).

Las poblaciones de cacao forastero pueden dividirse en dos tipos principales:

1. Forasteros del Alto Amazonas, se localizaron en la Cuenca del Río Amazonas.
2. Forasteros del Bajo Amazonas, presentes en las Guyanas y forman un tipo bastante uniforme denominado cacao amelonado.

4.2.3. Cacao Trinitario

Chessman (1944) clasificó a la población de cacao trinitario, como un tipo forastero (Figura 3c). Existen evidencias que demuestran su origen reciente y pueden reproducirse artificialmente (Swarbrick *et al.*, 1964). Se cree que ésta es una población segregante, originada por el cruzamiento entre cacaos forasteros de Guyana y los criollos de Venezuela, ocurrido probablemente en el estuario del Río Orinoco, y más tarde una generación temprana de la cruce se introdujo en la Isla de Trinidad (Toxopeus, 1969). La diversidad del cacao trinitario fue estudiada por Motamayor *et al.*, (2000) mediante la utilización de marcadores moleculares, quienes determinaron que la mayoría de estos son muy heterocigotos, lo cual coincide con el origen del híbrido, sin embargo, hay algunas otras poblaciones que muestran un alto grado de homocigocidad, debido posiblemente a un aislamiento geográfico (Motamayor *et al.*, 2000).



a)

b)

c)

Figura 3. Tipos de cacao. a) Cacao criollo (Cultivado en la Hacienda la Joya, Cunduacán Tabasco), b) Cacao forastero (Tomada de <http://www.directoalpaladar.com/ingredientes-y-alimentos/el-cacao-en-la-gastronomia.>) y c) Cacao trinitario (Cultivado en la Hacienda Zaragoza, Chiapas).

4.3. Composición química de *Theobroma cacao* L.

Las semillas de *Theobroma cacao* L., son la mayor cosecha económica en el mundo tropical pero, solamente cerca del 10% por peso fresco de la fruta es comercializado, aunque varios productos comerciales promisorios pueden ser obtenidos de este fruto (Kalvatchev *et al.*, 1998).

Las semillas están rodeadas por una pulpa aromática la cual procede de sus tegumentos, estas fueron tempranamente reconocidas como una rica fuente de bioelementos (Cuadro 1). La pulpa mucilaginosa está compuesta por células esponjosas parenquimatosas, que contienen células de savia ricas en azúcares (10–13%), pentosas (2–3%), ácido cítrico (1–2%), y sales (8–10%). La pulpa contiene cerca del 1% de pectina (Wood y Lass, 1985).

Cuadro 1. Contenido en las semillas del cacao por cada 100 g de cacao en base seca.

| Bioelementos | Contenido | Bioelementos | Contenido |
|----------------------------|--------------|-------------------|-------------|
| Calorías | 456 | Nicotinamida | 2.1 mg |
| Agua | 3.6 mL | Ácido pantoténico | 1.35 mg |
| Proteína | 12.0 g | Histidina | 0.04–0.08 g |
| Grasa | 46.3 g | Arginina | 0.03–0.08 g |
| Carbohidratos (totales) | 34.7 g | Treonina | 0.14–0.84 g |
| Fibra | 8.6 g | Serina | 0.88–1.99 g |
| Glucosa | 8–13 g | Ácido glutámico | 1.02–1.77 g |
| Sucrosa | 0.4–0.9 g | Prolina | 0.72–1.97 g |
| Calcio | 106 mg | Glicina | 0.09–0.35 g |
| Fósforo | 537 mg | Alanina | 1.04–3.61 g |
| Hierro | 3.6 mg | Valina | 0.57–2.60 g |
| Tiamina | 0.17–0.24 mg | Lisina | 0.08–0.56 g |
| Riboflavina | 0.14–0.41 mg | Leucina | 0.45–4.75 g |
| Niacina | 1.7 mg | Isoleucina | 0.56–1.68 g |
| Ácido ascórbico | 3.0 mg | Tirosina | 0.57–1.27 g |
| Piridoxina | 0.9 mg | Fenilalanina | 0.56–3.36 g |

Fuente: C.S.I.R., 1948-1976. Citado por Kalvatchev *et al* (1998).

El cacao contiene cerca de 300 compuestos volátiles incluyendo ésteres, hidrocarbólatonas, monocarbonilos, piroles y otros más. Los componentes importantes del sabor son ésteres alifáticos, polifenoles, carbonilos aromáticos insaturados, dicetopiperazinas, pirazinas y teobromina. También contiene cerca de 18% de proteínas

(8% digestibles); grasas (manteca de cacao); aminas y alcaloides incluyendo la theobromina (0.5 a 2.7%), cafeína (0.25 al 1.43%), tiramina, dopamina, salsolinol, trigonelina, ácido nicotínico y aminoácidos libres; taninos, fosfolípidos, entre otros (Kalvatchev *et al.*, 1998).

La manteca de cacao contiene predominantemente triglicéridos de ácidos grasos consistentes de ácido oleico (37.3%), esteraico (34.4%), y palmítico (26.2%). Más de 73% de los glicéridos están presentes como formas monoinsaturadas. En la manteca de cacao hay pequeñas cantidades de esteroides y metilesteroides; los esteroides están compuestos de β -sitosteroides, estigmasterol y campesterol, con muy pequeñas cantidades de colesterol (Leung, 1980).

Las cáscara de cacao posee un pigmento que es un poliflavonoglucosido con peso molecular sobre los 1500 KDa, este pigmento es requerido por ser resistente al calor y la luz, muy estable a pH de 3 a 11, y usado como colorante de alimentos (Leung, 1980; Kalvatchev *et al.*, 1998). En *T. cacao* L., el componente más importante es el componente graso, el cual es ampliamente usado en la industria chocolatera, farmacéutica y de cosméticos

El cacao posee también otros efectos. Los extractos de cacao son reconocidos como una fuente rica de polifenoles, flavonoides y alcaloides. Más aún, efectos contra bacterias y hongos han sido evidenciados en extractos crudos o parcialmente purificados de cacao (Pérez *et al.*, 1994; Brownlee *et al.*, 1990).

4.4. Producción de cacao

El cacao es uno de los cultivos perennes más importantes en el mundo. Los principales países productores de cacao son: Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Brasil, Camerún y Ecuador, quienes en conjunto producen 89% de la producción mundial, Costa de Marfil aporta 26% de la superficie cultivada y 38% de la producción mundial (SIAP, 2009).

México ocupa el 11^o lugar en la producción de cacao en grano, contribuyendo con 1.2% de la producción mundial (SIAP-SAGARPA, 2009). El estado de Tabasco, es el principal productor de cacao, cuenta con una superficie sembrada de 41,025 ha y aporta 67% de la producción, Chiapas 32% y Guerrero y Oaxaca con el 1% restante (Cuadro 2) (SIAP, 2009; SAGARPA, 2004).

Cuadro 2. Superficie sembrada y cosechada, producción y rendimiento de cacao en México.

| Ubicación | Superficie (ha) | | Producción (t) | Rendimiento (t/ha) |
|-----------|-----------------|-----------|----------------|--------------------|
| | Sembrada | Cosechada | | |
| Tabasco | 41,025 | 41,025 | 14,609 | 0,36 |
| Chiapas | 20,103 | 20,052 | 7,855 | 0,39 |
| Guerrero | 240 | 240 | 196 | 0,82 |
| Oaxaca | 36 | 0 | 0 | 0,00 |
| Total | 61,403 | 61,317 | 22,66 | 0,37 |

Fuente: SIAP, 2009.

Los principales países demandantes de cacao son: Estados Unidos, Alemania, Malasia, Reino Unido y Francia que en conjunto absorben 67% del comercio mundial. En cuanto a exportaciones, México ocupa el 24º lugar con una aportación del 0.2% en las exportaciones mundiales (SIAP-2009).

Los tipos de cacao que se cultivan en el estado de Tabasco son: Guayaquil, Calabacillo, Ceylán y Criollo, 80% de la producción corresponde al tipo forastero conocido como Guayaquil, 18% al Calabacillo, y el restante es Ceylan y Criollo (González, 2005).

4.5. Proceso de germinación de la semilla

La germinación involucra a aquellos eventos que inician con la toma de agua por la semilla seca quiescente y termina con la elongación del eje embrionario (Bewley y Black, 1994). El signo visible de que la germinación se ha completado es usualmente la penetración de las estructuras que rodean al embrión por la radícula; el resultado es conocido como germinación visible (Bewley, 1997).

Existen dos tipos de germinación, la germinación hipogea y epigea (Figura 5):

La semilla de cacao posee un tipo de germinación epigea, en la cual ocurre un alargamiento del hipocótilo que lleva a los cotiledones y la yema embrionaria por encima del nivel del suelo. La semilla de cacao, una vez retirada del fruto, germina rápidamente, a los 4 ó 6 días después de la siembra y usualmente es viable por corto tiempo (10 a 13 semanas), requiere hasta el 50% de humedad para germinar. Emergen

primero la raíz y el hipocótilo, lo que ocasiona que los cotiledones se eleven por encima del nivel del suelo (10 a 15 días después de la siembra). Los cotiledones se abren exponiendo a la plúmula, la cual empieza a crecer al mismo tiempo que la raíz pero es mucho más pequeña. La primera fase de crecimiento termina con la maduración de las primeras hojas (López-Andrade *et al.*, 2003).

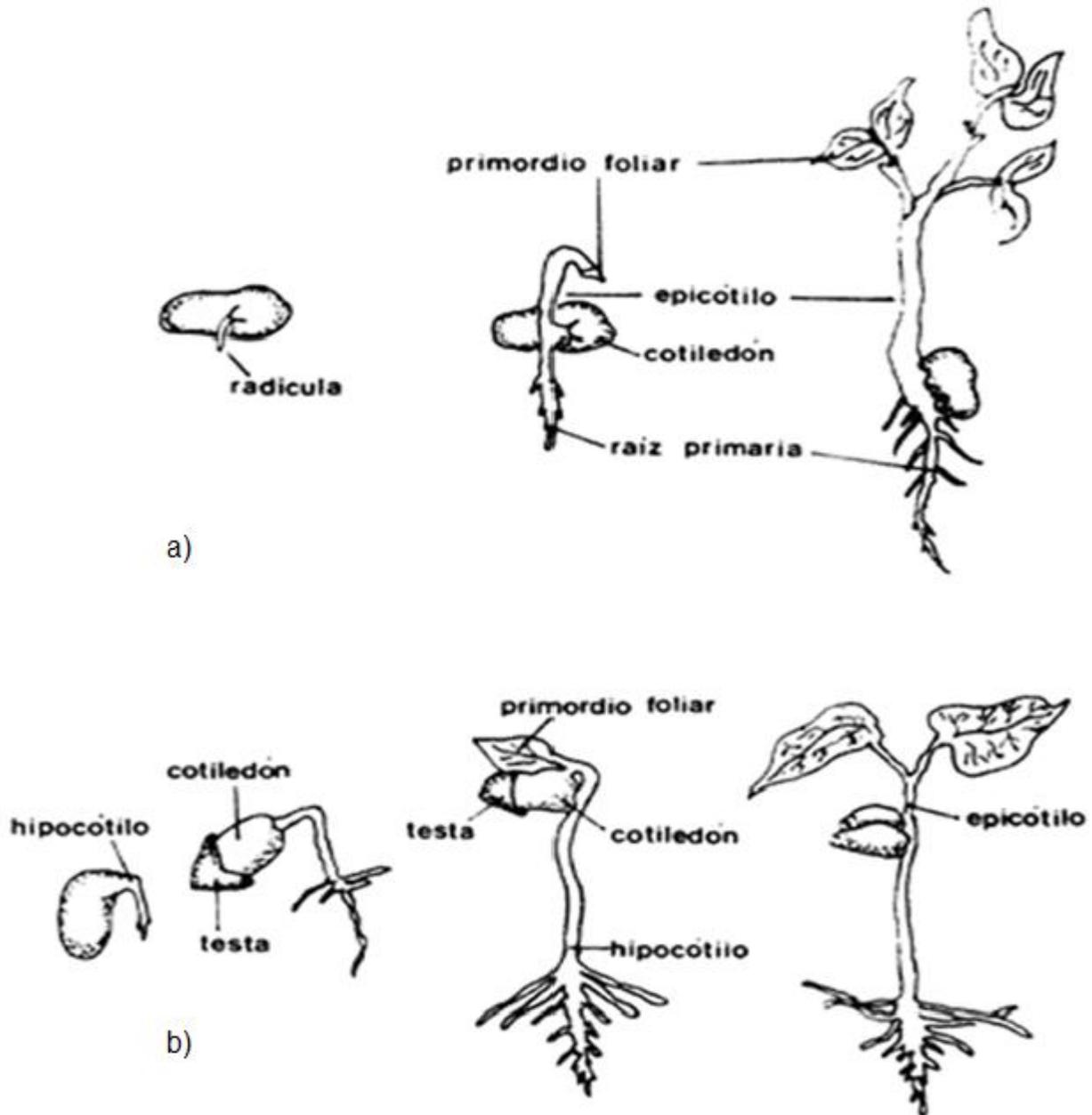


Figura 4. a). Germinación hipógea en haba. b). Germinación epigea en frijol. (Rojas *et al.*, 1997). Fuente: <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx>.

La absorción del agua por una semilla seca madura es trifásica (Bewley, 1997). Evenari (1957), citado por Herrera (2006) dividió el proceso de la germinación en tres fases (Figura 5):

Fase I: Imbibición. Con el ingreso de agua a la semilla durante la fase I, se producen en forma temporal, alteraciones estructurales importantes, en particular en las membranas. En la semilla seca, los componentes fosfolipídicos de la membrana se encuentran en fase de gel, por lo que no están en su condición normal, lo que provoca una salida inicial mayor de solutos y de metabolitos de bajo peso molecular hacia la solución que rodea a la semilla. No obstante, con la rehidratación las membranas retornan rápidamente a un estado cristalino hidratado, condición más estable, por lo que prácticamente cesa la pérdida de solutos. La rehidratación permite que las enzimas y estructuras presentes en la semilla deshidratada, necesarias para el reinicio del metabolismo, se reactiven (Bewley, 1997).

En general, se requieren varias horas antes de que el metabolismo alcance su pleno rendimiento. Durante ese período se observa la degradación o reemplazo de componentes dañados. En forma simultánea se observa la síntesis de ADN para reparar aquel que hubiese sido dañado durante la fase de maduración y deshidratación, y la síntesis de ADN mitocondrial (Bewley, 1997).

Uno de los aspectos más importantes durante las primeras horas de la germinación es la reconstitución de las membranas. El organelo que sufre mayores perturbaciones es la mitocondria. Esta, presente en la semilla seca, no es funcional al inicio de la imbibición, ya que sus membranas no están completamente reformadas. Aún así, la curva de absorción de agua (Figura 4) coincide con la del proceso respiratorio (Bewley, 1997).

Fase II: Activación metabólica o germinación sensu stricto. A diferencia de la anterior, esta fase se caracteriza por un cese en la absorción de agua y una actividad respiratoria más reducida. Durante esta fase ocurre la síntesis, a partir de las reservas disponibles, de nuevas estructuras y compuestos necesarios (síntesis de ácidos nucleídos y proteínas) para las fases siguientes del desarrollo. También se incrementan las actividades enzimáticas, así como la degradación inicial de las reservas. En este

sentido, y contrario a la fase III, la germinación *sensu stricto* es principalmente anabólica y por lo tanto endergónica, consumiendo la energía disponible. Previo a la aparición de la radícula, se producen cambios transcripcionales en la elongación y división celular. En general, los genes que codifican para el proceso de elongación tienden a ser activados en forma temprana, en relación con la división celular (Bewley, 1997).

Fase III: Crecimiento de la radícula. Tiene lugar la emergencia de la radícula (crecimiento visible), concluyendo el proceso germinativo, ya que el crecimiento subsecuente se considera un proceso separado y marca el inicio del crecimiento de la plántula. Dentro de los requerimientos ambientales necesarios para la germinación se consideran esenciales el agua, el oxígeno y la temperatura. En ausencia de alguno de estos factores, la mayoría de las semillas se mantendrían en un estado quiescente, aun sin reposo. En el caso de las semillas recalcitrantes, como el cacao, se produciría una rápida disminución de la longevidad de la semilla (Bewley, 1997).

Posterior a la hidratación de los distintos tipos de tejidos que conforman la semilla, tienen lugar en ellos una serie de reacciones metabólicas de hidrólisis que transforman las sustancias nutritivas de reservas en moléculas más sencillas y asimilables para el embrión. Entre estas sustancias nutritivas de reserva se encuentran los glúcidos, lípidos y proteínas. La hidrólisis de las proteínas de reserva es catalizada por diferentes tipos de enzimas proteolíticas, agrupados bajo el nombre de peptidasas. A medida que progresa la germinación, las fracciones proteínicas de reserva se transforman en otras de menor peso molecular, especialmente pequeños péptidos y aminoácidos. Estas proteínas de reserva acumuladas en la semilla durante su desarrollo, sirven como fuente de nitrógeno, azufre y carbono durante la germinación de la propia semilla (Shotwell y col., 1988). Se ha reportado que en las semillas dicotiledóneas, como en el caso del cacao, la degradación de las proteínas de reserva, va acompañada por consiguiente de una acumulación de aminoácidos libres en los cotiledones (Bewley y col., 1997).

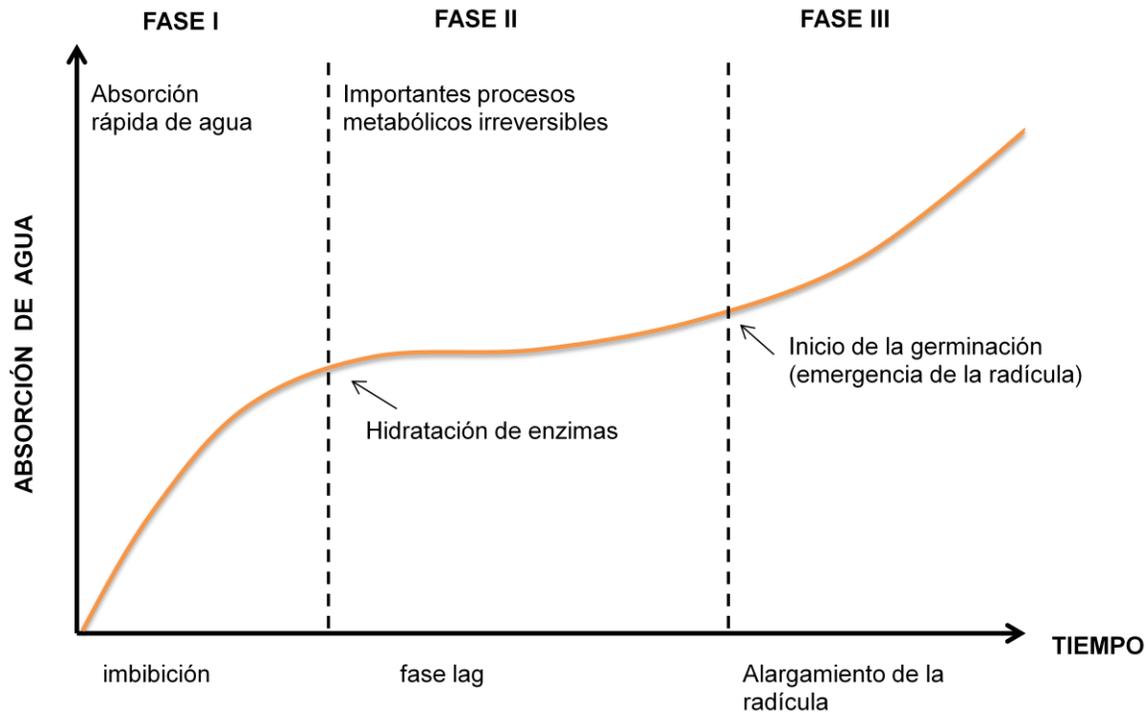


Figura 5. Etapas de la germinación que conducen a la emergencia de la radícula. Fase I: fase de Imbibición; Fase II: fase de germinación *sensu stricto*; Fase III: crecimiento de radícula (Rojas *et al.*, 1997 Tomado en: <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx>).

4.5. Definición y clasificación de proteasas

Peptidasa es el término recomendado por la Comisión de Enzimas (EC) para cualquier proteína que cause la hidrólisis de uniones peptídicas. Esto se aplica a las endopeptidasas que actúan en las uniones internas de las proteínas o en polipéptidos, así como oligopeptidasas y exopeptidasas que actúan principalmente en sustratos pequeños. El término *proteasa* es sinónimo con el de *hidrolasa peptídica* o *peptidasa*, estos términos incluyen todas las enzimas que rompen uniones peptídicas. Las proteasas, se subdividen en **endopeptidasas** y **exopeptidasas** (Barrett, 1994).

Las **endopeptidasas**, catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos situados preferentemente en el interior de la cadena polipeptídica. Debido a que las endoproteasas son capaces de degradar a las proteínas hasta péptidos, se tiende a

denominarlas proteinasas, término que no debe confundirse con proteasas ya que éste engloba a los dos grupos (Suárez-Rendueles y Wolf, 1988).

Las proteasas pueden también ser clasificadas de acuerdo a la naturaleza de los grupos responsables de la catálisis en:

- a) Serin-peptidasas (EC 3.4.21). Poseen al menos un residuo de serina en su centro activo y son inhibidas específicamente por diisopropil-fosfluoridato y otros organofosforados. Entre ellas tripsina, leucil endopeptidasa o prolil aminopeptidasa.
- b) Cisteín-peptidasas (EC 3.4.22). Caracterizadas por poseer un grupo tiol (-SH) del aminoácido cisteína en su centro activo. Activadas por ditioneol (DDT) e inhibidas por 4-cloromercuribenzoato.
- c) Aspartil-peptidasas (EC 3.4.23). Poseen uno o más grupos carboxilo (generalmente ácido aspártico) en su sitio activo. Inhibidas por pepstatina. Como ejemplo renina y pepsina.
- d) Metallo-peptidasas (EC 3.4.24). Poseen uno o dos iones metálicos en su centro activo (en la mayoría de los casos Zn^{2+}). Inhibidas por etilén-diamino-tetraacético (EDTA).
- e) Peptidasas no clasificadas. Se incluyen aquí peptidasas de mecanismo catalítico desconocido.
- f) Treonin peptidasas. Poseen al menos un residuo de treonina en su centro activo.
- g) Asparagin peptidasas. Caracterizadas por poseer al menos un residuo de asparagina en su centro activo.
- h) Glutamil peptidasas. Caracterizadas por poseer ácido glutámico en su centro activo (<http://merops.sanger.ac.uk>).

Las **exo-peptidasas** hidrolizan exclusivamente enlaces peptídicos situados en el extremo amino o carboxilo de la cadena polipeptídica liberando los aminoácidos terminales de la proteína. Los diferentes tipos de exo-peptidasas están esquematizados en la Figura 6. Para clasificarlas se tienen en cuenta el tamaño del sustrato (esto permite separar a las di y tripeptidasas del resto), la identidad del extremo atacable (N- o C- terminal), el estado de este último (bloqueado en el caso de las omega-peptidasas)

y la magnitud del fragmento escindido (aminoácido, dipéptido o tripéptido terminales) (Barrett, 1986).

Dentro de este grupo se encuentran:

A) Las aminopeptidasas (L-aminoacil péptido hidrolasas EC 3.4.11) que catalizan la reacción de liberación secuencial de aminoácidos del extremo amino terminal.

B) Las carboxipeptidasas (peptidil aminoácido hidrolasas EC 3.4.12) que catalizan la liberación secuencial de aminoácidos del extremo carboxilo terminal.

C) Las dipeptidasas (dipéptido hidrolasas EC 3.4.13) que hidrolizan dipéptidos con sus grupos amino y carboxilo libres.

D) Las dipeptidil aminopeptidasa (dipeptidil péptido hidrolasas EC 3.4.15) que liberan dipéptidos en el extremo amino terminal (Suárez-Rendueles y Wolf, 1988).

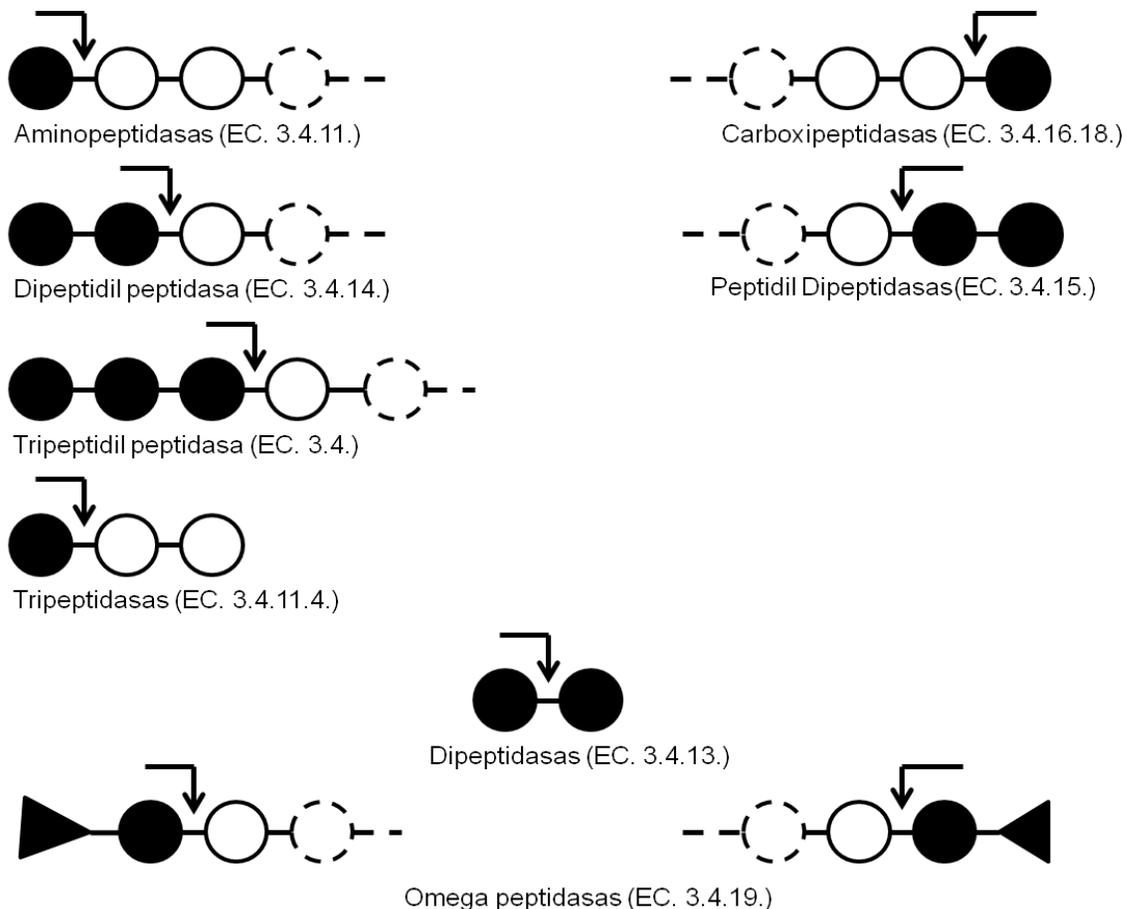


Figura 6. Tipos de exopeptidasas. Los círculos llenos representan los fragmentos liberados. El triángulo indica el aminoácido terminal bloqueado, sustratos de algunas peptidasas omega (adaptado de Barrett, 1986).

4.6. Purificación de las proteínas

Las células contienen miles de proteínas. La preparación pura de una proteína es esencial antes de determinar sus propiedades, composición de aminoácidos y secuencia. Los métodos de separación de proteínas aprovechan las propiedades tales como la carga, tamaño y solubilidad, que varían entre una y otra proteína. Dado que muchas proteínas se unen a otras biomoléculas, las proteínas también se pueden separar en base a sus propiedades ligantes (Lehninger 1992).

Williams (1995a) menciona que se requieren de tres etapas para desarrollar una estrategia de purificación, las cuales consisten en:

1. Determinar la cantidad y pureza de la proteína necesaria para su uso posterior.
2. Conocer la mayor información relacionada con fuentes y naturaleza de la proteína de interés y contaminantes de la preparación biológica.
3. Buscar la mejor fuente de la proteína de interés.

4.6.1. Técnicas en la purificación de proteínas

La purificación de proteínas comprende varias etapas: 1) Extracción de la proteína de interés de la fuente original (células o tejidos) por medio de homogeneización (por navajas, ultrasonido, etc); 2) Separación del extracto por medio de centrifugación; 3) Precipitación selectiva para que la proteína de interés o los contaminantes alcancen su punto isoeléctrico y precipiten, hay varias técnicas (con sales, disolventes orgánicos y polímeros); 4) Purificación empleando uno o varios tipos de cromatografía (Cromatografía en gel o exclusión molecular, cromatografía de adsorción selectiva, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica y HPLC) (Scopes, 1995).

4.6.1.1. Obtención del extracto crudo

Las células deben romperse liberando la proteína en una solución denominada extracto crudo (Lehninger, 1992). Existen muchos métodos de desintegración celular, para los diferentes tipos de células (Cuadro 3). La mayoría de las células tienen características particulares las cuales necesitan especial atención durante la desintegración. Las células vegetales son generalmente más difíciles de desintegrar que las animales

debido a la pared celular celulósica. Generalmente, no es recomendable el uso de un tratamiento de ruptura más vigoroso que el necesario, ya que las enzimas lábiles podrían inactivarse una vez liberadas en solución (Scopes, 1994).

El extracto es preparado después de la desintegración celular, mediante centrifugación para retirar el material insoluble. En el caso de tejidos vegetales, es importante el uso de algún agente que controle procesos indeseables durante la homogenización. Un problema particular con muchas plantas es su contenido de compuestos fenólicos, los cuales se oxidan –principalmente bajo la influencia de polifenol oxidasas endógenas– para formar compuestos oscuros. Estos pigmentos ligan a las proteínas y reaccionan covalentemente para inactivar muchas enzimas. Se recomiendan dos acciones para este problema. Primero, la adición de tiol compuestos tales como β -mercaptoetanol, minimiza la acción de fenol oxidasas. Segundo, la adición de polivinilpirrolidona es con frecuencia útil en la adsorción de compuestos fenólicos. Finalmente, para la extracción de proteínas de membrana es útil el empleo de un detergente para lograr su solubilización (Scopes, 1994).

4.6.1.2. Fraccionamiento del extracto crudo por precipitación selectiva con sulfato de amonio y diálisis

Las proteínas una vez solubilizadas en el extracto crudo, se someten a una purificación, comúnmente hecha con sulfato de amonio. A esto se le conoce como precipitación por sales. Es una técnica muy empleada en purificación enzimática; presenta un alto rendimiento pero muy poca selectividad, por lo que suele ser utilizada en las etapas iniciales del proceso. Las proteínas son polielectrolitos de superficie, por lo que al añadir al medio una sal, los iones de ésta neutralizan las cargas de las proteínas, llegándose a una situación en la que, por no presentar carga neta, las proteínas flocculan. Las proteínas se pueden separar de moléculas pequeñas mediante la **diálisis** a través de una membrana porosa de celulosa. Las moléculas de dimensiones significativamente mayores que el diámetro del poro se retienen dentro de la bolsa de diálisis, mientras que las moléculas más pequeñas y los iones atraviesan los poros de esta membrana y aparecen en el dializado, fuera de la bolsa. Esta técnica es útil para retirar las sales u

otras moléculas pequeñas, pero no discriminará de forma efectiva entre las proteínas (Lehninger, 2000).

Cuadro 3. Técnicas de desintegración celular (Scopes, 1994).

| Técnica | Ejemplo | Principio |
|----------------------------------|---|--|
| Ligero | | |
| Lisis celular | Eritrocitos | Ruptura osmótica de la membrana celular. |
| Digestión enzimática | Tratamiento de lisozima de bacteria | Digestión de la pared celular, permitiendo la ruptura de la membrana celular. |
| Solubilización química/autólisis | Extracción con tolueno de levaduras | Pared celular (membrana) parcialmente solubilizada químicamente; enzimas líticas liberadas completan el proceso. |
| Homogeneizador manual | Tejido de hígado | Células liberadas de la membrana celular, forzadas a través de pequeños espacios. |
| Molienda | Músculo, etc. | Células rotas durante proceso de molienda mediante fuerza de cizalla |
| Moderado | | |
| Homogeneizador de cuchilla | Tejido muscular, la mayoría de tejidos animales, tejidos de plantas | Cortar a intervalos células grandes y separar en pequeños. |
| Molienda con abrasivo | Tejido de plantas, bacterias | Microasperezas rasgan la pared celular. |
| Vigoroso | | |
| Prensado francés | Bacterias, células vegetales | Células forzadas a través de un pequeño orificio a muy altas presiones; fuerzas de cizalla rompen las células. |
| Ultrasonicación | Suspensiones de células | Microescala de alta presión de ondas de sonido causan ruptura por fuerzas de cizalla y cavitación. |
| Molino de cuentas | Suspensiones de células | Vibración rápida con cuentas de cristal rompen la pared celular. |

4.6.1.3. Cromatografía en gel o exclusión molecular

Hagel (1997) y Williams (1995a), mencionan que la cromatografía en gel o exclusión molecular consisten en la separación de las proteínas en función del tamaño de las moléculas (Figura 7). La separación está basada en los diferentes volúmenes

moleculares de los solutos. El tiempo de elución, es proporcional al peso molecular de los mismos, por lo que no es muy usada con compuestos de alto peso molecular. En este procedimiento se emplean geles no iónicos de partícula uniforme y porosa, como fase estacionaria. El término filtración en gel, se utiliza para describir la separación de las moléculas de distinto tamaño, utilizando estos materiales con estructura de gel. Entre los materiales que se utilizan en mayor proporción, están los geles dextranos con enlaces cruzados (sephadex), agarosa (sepharosa, bio-gel A, sagavac), poliacrilamida (bio-gel P) (López y Valadez, 2008).

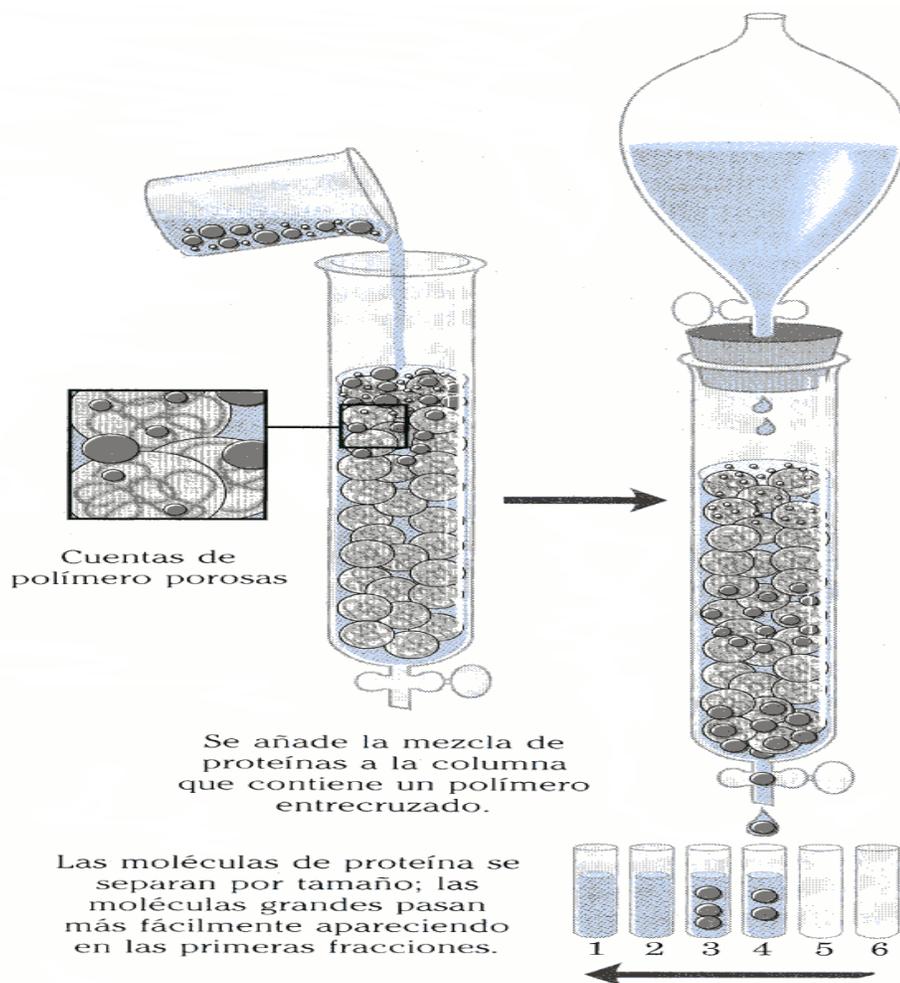


Figura 7. Cromatografía en gel o exclusión molecular. La columna contiene un polímero entrecruzado con poros de tamaño seleccionado. Las proteínas mayores se desplazan más rápidamente que las de menor tamaño ya que son demasiado grandes para penetrar en los poros de las cuentas y siguen una ruta más directa a través de la columna. Las más pequeñas penetran en los poros y pasan más despacio (Lehninger, 1992).

4.6.1.4. Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad separa las proteínas en función de su especificidad de fijación de ligandos. Las proteínas retenidas en la columna (Figura 8) se unen específicamente a los ligandos unidos covalentemente a las cuentas. Cuando se han lavado las proteínas no específicas a través de la columna, se eluye la proteína ligada con solución que contiene ligando libre (Lehninger, 1992).

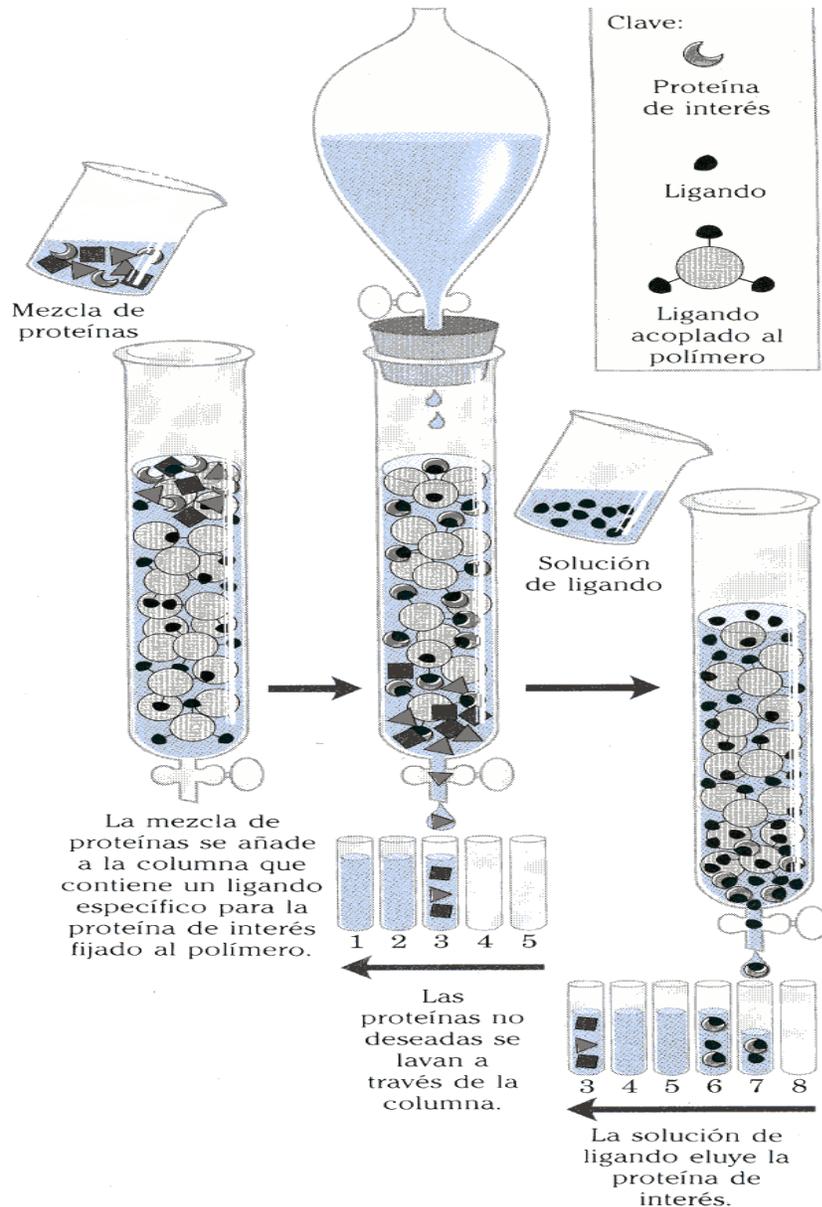


Figura 8. Cromatografía de afinidad (Lehninger, 1992).

4.6.1.5. Cromatografía de interacción hidrofóbica

Es una cromatografía de absorción, lo cual implica que se produce una interacción entre los grupos hidrofóbicos expuestos de las proteínas y los grupos hidrofóbicos de la matriz cromatográfica, proceso que resulta termodinámicamente favorable (Eriksson, 1998). La cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), es una de las principales técnicas utilizadas para la separación y purificación de proteínas en procesos biotecnológicos.

En HIC, las proteínas se unen reversiblemente a ligandos hidrofóbicos que se encuentran inmovilizados en el soporte cromatográfico, debido a la presencia de una elevada concentración de sal. La elución se logra disminuyendo la fuerza iónica en la fase móvil, formando un gradiente decreciente (Kennedy, 1997; Fausnaugh y Regnier, 1986).

4.6.1.6. Cromatografía de intercambio iónico

Esta es la técnica de cromatografía más usada para la separación, identificación y cuantificación de las proteínas. Se realiza sobre la base de su carga, la cual depende de su pI y del pH en que se encuentra la proteína, este conocimiento ayuda a seleccionar el tipo de intercambiador a usarse (Figura 9) (Williams, 1995b).

La columna está rellena con un soporte al que van unidos grupos cargados positivamente (intercambio aniónico) o negativamente (intercambio catiónico). Estos grupos normalmente están neutralizados por los iones del regulador. Estos iones son reversiblemente reemplazados por las proteínas con más tendencia a unirse al soporte. Las proteínas cargadas pueden por lo tanto unirse a intercambiadores catiónicos o aniónicos dependiendo de su carga neta. Las proteínas más cargadas se unirán más fuertemente al intercambiador y por lo tanto serán más difíciles de eluir. La afinidad con la que una proteína se une a un intercambiador iónico depende de la fuerza iónica del medio, debido a la competencia entre los grupos cargados de la proteína y los iones de la fase móvil. Una vez pegadas las proteínas, para eluirlas de la columna, se suele ir subiendo la fuerza iónica de la fase móvil (aumentando la concentración de sal, NaCl), de esta forma se eluyen primero las proteínas más débilmente retenidas y cuando la

fuerza iónica sea mayor saldrán las proteínas más cargadas y por lo tanto más retenidas (Lehninger, 2000).

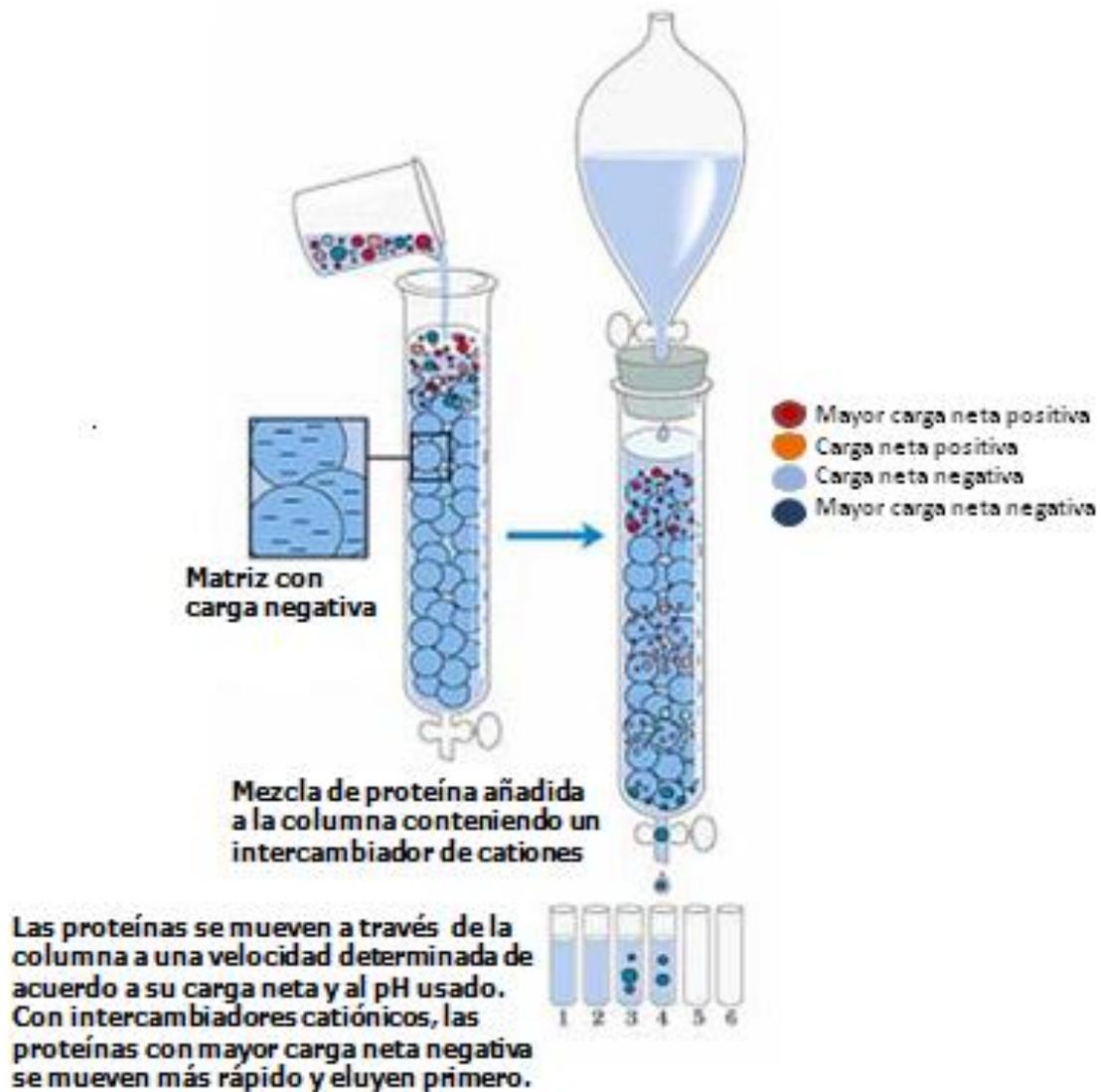


Figura 9.- Cromatografía de intercambio iónico (Lehninger, 2000)

4.6.1.7. Electroforesis

La electroforesis es otro conjunto importante de métodos para la separación de proteínas basado en el desplazamiento de las proteínas cargadas en un campo eléctrico (Figura 10). Este procedimiento no es utilizado normalmente para purificar proteínas en grandes cantidades dado que existen métodos alternativos más sencillos y que los métodos electroforéticos inactivan las proteínas. No obstante, la electroforesis

es muy útil como método analítico. Su ventaja es que al tiempo que separan también se puede visualizar, permitiendo al investigador hacer una estimación rápida sobre el número de proteínas en una mezcla o el grado de pureza de una preparación proteica determinada. También nos permite la determinación de su punto isoelectrico y la masa molecular aproximada (Lehninger, 1992).

La electroforesis de proteínas se lleva a cabo normalmente en geles formados por el polímero entrecruzado poliacrilamida (Figura 10a). La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Además tiene la ventaja de que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro (Campell, 1995). El gel de poliacrilamida actúa como un tamiz molecular, retrasando el desplazamiento de las proteínas en una forma aproximadamente proporcional a su masa molecular (Lehninger, 1992). Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización vinílica del monómero acrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ y del monómero entrecruzador N,N'-metilen-bis-acrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$. La polimerización se inicia con la formación de radicales libres del monómero, que se producen por radicales libres de oxígeno, por causa de la acción de iones persulfato (Chávez *et al.*, 1990). Para la estimación de su pureza y la masa molecular, se utiliza el detergente Dodecil Sulfato de Sodio (SDS). Este se une a la mayoría de las proteínas (probablemente por interacción hidrofóbica), en una cantidad proporcional a la masa molecular de la proteína, alrededor de una molécula por cada dos residuos de aminoácidos. En presencia de SDS se separan las proteínas en función de la masa (masa molecular relativa) de forma que los péptidos pequeños se desplazan más rápidamente. El SDS desnaturaliza por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria. Los grupos alifáticos dodecil se colocan en el interior, mientras que los grupos sulfato en la superficie y todos los complejos SDS-proteína toman carga neta negativa (que exceden la carga intrínseca de las cadenas de aminoácidos). Las proteínas reaccionan con SDS

a relativamente alta concentración, pero se ha demostrado que 0.4% de SDS es el nivel mínimo necesario para saturar los sitios de unión de la proteína, sin embargo, se emplea 1% para lograr un margen de seguridad (García, 2000). Después de la electroforesis, las proteínas se visualizan añadiendo un colorante, tal como el azul de Coomassie (Figura 10b) que se fija a las proteínas pero no al gel (Lehninger, 1992).

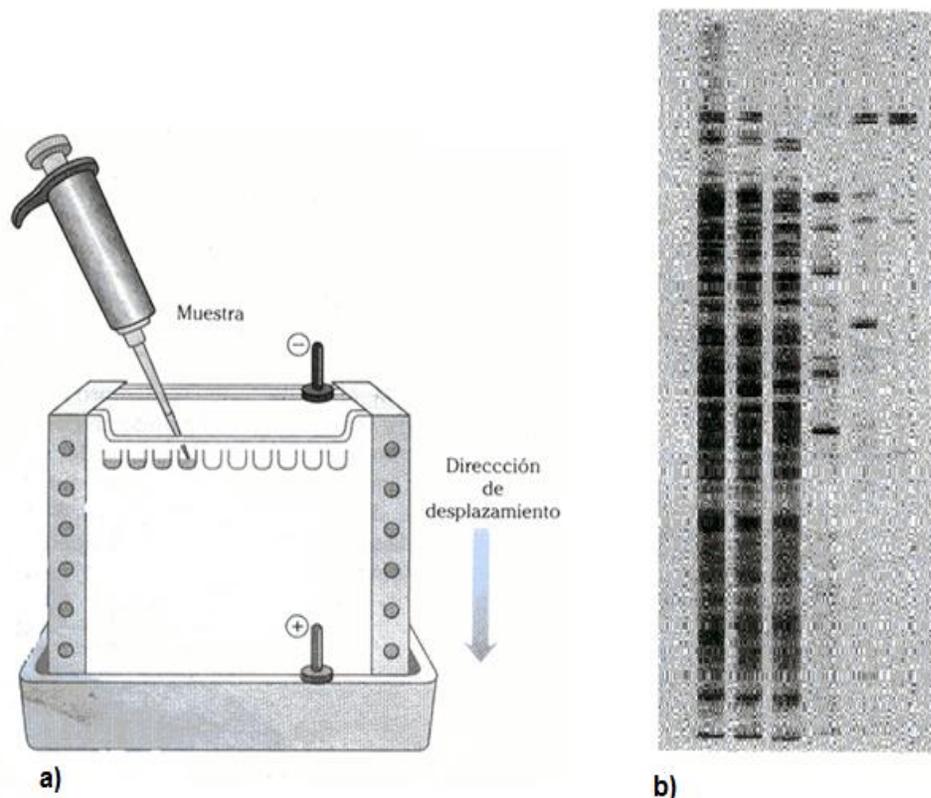


Figura 10. Electroforesis. a). Gel de poliacrilamida. b) Gel teñido con azul de Coomassie. El gel ilustra la purificación del enzima RNA polimerasa de la bacteria *E. coli*. El primer carril muestra las proteínas presentes en el extracto crudo. Los carriles siguientes muestran las proteínas presentes después de cada paso de purificación (Lehninger, 1992).

4.7. Función de las Aminopeptidasas (APE's)

Las Aminopeptidasas (APE's EC.3.4.11.) son enzimas que liberan residuos de aminoácidos amino terminal, a partir de proteínas y péptidos (Couton *et al.*, 1991; Mikkonen, 1992; Yamaoka *et al.*, 1994), mientras que las carboxipeptidasas hidrolizan enlaces peptídicos en el extremo carboxilo terminal. Las Omega peptidasas son un tipo especial de aminopeptidasas y carboxipeptidasas que son capaces de remover

residuos terminales carentes de grupos α -carboxilos o α -amino libre, o incluso los relacionados a otros tipos de α -péptidos (por ejemplo, piroglutamil peptidasas; (McDonald y Barret, 1986). Las aminopeptidasas pueden ser subdivididas en tres grupos:

- 1) Aminopeptidasas, estrictamente hablando, hidrolizan el primer enlace peptídico en una cadena polipeptídica con la liberación de un solo residuo de aminoácido (aminoacil- e iminoacil peptidasas [EC 3.4.11].
- 2) Aminopeptidasas que remueven dipéptidos o tripéptidos (dipeptidil y tripeptidil peptidasas [EC 3.4.14] a partir de cadenas polipeptídicas.
- 3) Aminopeptidasas que sólo hidrolizan di- o tripeptidos (dipeptidasas [EC 3.4.15] y tripeptidasas [EC 3.4.14.4] (Sanderink *et al.*, 1988).

Las APE's están ampliamente distribuidas entre las bacterias, hongos, plantas y mamíferos (González y Robert-Baudouy, 1996; Sanz *et al.*, 2002; Tu *et al.*, 2003; Barrett *et al.*, 2004). Estas enzimas son localizadas en diferente compartimento subcelular incluyendo el citoplasma, lisosomas y membranas, y también pueden ser secretadas en el medio extracelular. Basado en el mecanismo catalítico, la mayoría de las aminopeptidasas son metaloenzimas pero la cistein y serin peptidasa también son incluidas en este grupo. Aunque, algunas aminopeptidasas son monoméricas, la mayoría muestran estructuras multiméricas, particularmente de los organismos eucariotas (McDonald y Barrett, 1986; Jones, 1991; Lowther y Matthews, 2002).

Con respecto a su función, estas enzimas parecen actuar en conjunto con otras peptidasas para completar diversas vías proteolíticas. De esta manera, las APE's pueden recuperar aminoácidos a partir de proteínas de la dieta y proteínas endógenas degradadas durante el recambio proteico, cubriendo de este modo las necesidades nutricionales así como otros papeles biológicos, incluyendo maduración de proteínas, regulación de los niveles hormonales y control del ciclo celular (McDonald y Barret, 1986; Christensen *et al.*, 1999). Un papel fisiológico bien conocido para las APE's de plantas, es la movilización de las proteínas de reserva durante la germinación de las semillas (Couton *et al.*, 1991; Mikkonen, 1992; Yamaoka *et al.*, 1994). Algunos reportes, han propuesto que las APE's podrían tener otras funciones en procesos biológicos

fundamentales como el mantenimiento de la vida media de las proteínas (Amrani *et al.*, 1995), respuesta de defensa a infecciones y heridas (Pautot *et al.*, 1993), maduración de proteínas (Giglione *et al.*, 2000) y transporte de auxinas (Murphy *et al.*, 2000).

4.7.1. Clasificación y nomenclatura de las aminopeptidasas (APE's)

Las aminopeptidasas han sido clasificadas en base a: 1) Especificidad por el sustrato (amplio o reducido); 2) Por su mecanismo catalítico (metalo-, cisteína, y serina peptidasas) y 3) Por su estructura molecular (Gonzales y Robert-Baudouy, 1996; Barret *et al.*, 2004).

La nomenclatura de muchas (aminoacil o iminoacil peptidasas ha sido determinada por sus preferencias o requerimientos para un aminoácido amino-terminal en particular. De este modo, una enzima que por el momento mostró su intervalo más alto de hidrólisis sobre enlaces metionil amino-terminal, fue llamada metionil aminopeptidasa o aminopeptidasa M. En un intento por evitar ambigüedad, la localización subcelular (Membranal, microsomal o citosólica) también ha sido usada para nombrar aminopeptidasas que tienen especificidades similares. En el caso de las di- y tripeptidasas, sus nombres han sido basados sobre sus requerimientos del tamaño del sustrato. Por otro lado, los nombres de dipeptidil (DPP) y tripeptidil peptidasas (TPP) fueron seguidos por un número romano para diferenciar entre los varios tipos descritos. Dicha numeración ha sido mantenida. En la nomenclatura de las peptidasas identificadas en bacterias ácido lácticas, el término "Pep" es usado cuando la secuencia del gen de la peptidasa correspondiente es conocida, seguido por una letra capital indicando la especificidad y homología a otras peptidasas conocidas, por ejemplo PepN para la homóloga de la peptidasa N (Tan *et al.*, 1993). Sin embargo, nombres alternativos y abreviaturas aparecen frecuentemente en la literatura. Recientemente, la base de datos MEROPS que contiene información de peptidasas (<http://www.Merops.sanger.ac.uk>) creó una estructura jerárquica basada en la clasificación de peptidasas en familias y clanes. Las peptidasas miembros de una familia son homólogas y las familias que son consideradas homólogas son agrupadas dentro de un clan. Los clanes consisten en familias de peptidasas que comparten un origen evolutivo único, evidenciado por las similitudes en su estructura terciaria y/o el orden de los

residuos del sitio catalítico y las secuencias motif común alrededor de los residuos catalíticos (Sanz, 2007).

4.7.2. Propiedades de las aminopeptidasas descritas en plantas

En tomates (*Lycopersicon esculentum*) se ha detectado la expresión de dos formas de Leucina aminopeptidasa que han sido denominadas LAP-A (pI ácido) y LAP-N (pI neutral), así como dos proteínas semejantes a LAP. (Tu *et al.*, 2003).

En hojas de pepino (*Cucumis sativus* L.) se ha detectado mucha actividad de APE, enzima que libera preferentemente Alanina a partir de substratos artificiales, la cual ha sido purificada y caracterizada. La enzima resultó tener un peso molecular de 200 kDa, con dos subunidades de 95 kDa. Se trata de una metaloproteasa que tiene un pH óptimo de 8 a 9 y libera alanina, glicina, metionina, serina, leucina, lisina y arginina a partir de substratos sintéticos. La secuencia interna de aminoácidos fue similar a las Aminopeptidasas N (clan MA, familia M1) descrita en microorganismos como *Escherichia coli* y *Neisseria meningitidis*, y muy similar a una aminopeptidasa N putativa de *Arabidopsis thaliana*. De estos resultados, los niveles altos de actividad de aminopeptidasa en hojas de pepino fueron asignados a una Aminopeptidasa N de plantas. Los resultados también indican la presencia de otras dos enzimas APE con diferente masa molecular que liberan preferentemente metionina y leucina a partir de substratos artificiales (Yamauchi *et al.*, 2001).

En 2000, Arima *et al.*, reportaron la purificación de una aminopeptidasa (HSA), a partir de la semilla de marihuana (*Cannabis sativa*), con una masa molecular de 78 KDa. La actividad fue inhibida por ácido monoiodoacético, ácido-p-cloromercuri-fenilsulfónico e ión zinc. El pH óptimo de esta proteasa es alrededor de 7 con Leu-pNA como sustrato, la enzima fue bastante estable a una temperatura de 50° C. La especificidad de la HSA de la semilla de marihuana fue similar a las leucina aminopeptidasa (EC.3.4.11.1) del citosol de los mamíferos previamente reportadas (Arima *et al.*, 2000).

En 1996, Isola y Franzoni reportaron el aislamiento de cinco aminopeptidasas (EC.3.4.11) a partir del extracto crudo de cotiledones de cacahuete (*Arachis hypogaea* L.), las cuales fueron separadas por electroforesis en gel de policrilamida en forma nativa. Las actividades fueron detectadas en geles usando naftilamida de 12

aminoácidos como sustrato. AP1 reaccionó solo con L-prolina- β -naftilamida; AP2 y AP3 resultaron tener una amplia especificidad, hidrolizando sustratos naftilamida de aminoácidos básico e hidrofóbicos preferencialmente; AP4 y AP5 mostraron especificidad con los derivados de leucina, tirosina y fenilalanina. La actividad de aminopeptidasa detectada en el extracto crudo con L-leucina- ρ -nitroanilida como sustrato descendió continuamente durante la germinación de la semilla. Al mismo tiempo, el gel de electroforesis en condiciones nativas, mostró un lento desapareamiento de las bandas activas de AP2, AP4 y AP5 contra L-leucina- β -naftilamida, mientras AP3 se mantuvo activa hasta el final del periodo de estudio. Empleando cromatografía de filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico, respectivamente, fue posible separar dos aminopeptidasas: APa y APb. APa mostró un peso molecular de 58 kDa, y un valor similar fue estimado para APb. La actividad óptima con L-leucina- ρ -nitroanilida, fue observado a pH 6.5 para ambas enzimas. Ambas aminopeptidasas fueron sensibles a los inhibidores de tipo metalo y sulfidril peptidasas (Isola y Franzoni, 1996).

En 1985, Johnson y Storey reportaron actividad de aminopeptidasa (una mayor y dos menores) a partir del extracto de cotiledones de jojoba (*Simmondsia chinensis*) germinada. Dichas aminopeptidasas fueron separadas por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de isoelectroenfoque y no inhibidas por 1-10 fenantrolina. La aminopeptidasa principal fue purificada 260 veces, mostrando un pH óptimo de 6.9 con leucina- ρ -nitroanilida como sustrato, peso molecular estimado de 14,200 Da por análisis electroforético y punto isoeléctrico de 4.5. La actividad fue inhibida por ρ -cloromercuribenzoato, ligeramente estimulada por 1,10 fenantrolina y 2-mercaptoetanol, así como influenciada por iones magnesio o dietil pirocarbonato. La inhibición por ρ -cloromercuribenzoato fue prevenida por la presencia de cisteína en el ensayo. Se ensayaron 11 sustratos bloqueados en el extremo carboxilo terminal de los cuales Leucina- ρ -nitroalínida y leucina- β -naftilamida fueron más rápidamente hidrolizados y no detectaron actividad de endopeptidasa o carboxipeptidasa empleando sustratos específicos. La aminopeptidasa principal mostró actividad sobre una preparación proteica de semillas de jojoba soluble en sal soluble. Por lo anterior, los autores sugirieron un posible papel fisiológico de esta enzima en la degradación de las

proteínas de reserva tipo globulina durante la senescencia del cotiledón (Jonhson y Storey, 1985).

En 1887, Citharel y Garreau, reportaron la purificación parcial de una leucina aminopeptidasa a partir de cotiledones secos y germinados de *Vicia faba* L. var *minor*. La enzima mostró una masa de aproximadamente 60 KDa, determinado por electroforesis de filtración en gel y pH 7.5, usando L-leucina-p-nitroanilida o Leucina naftilamida como sustrato. Así mismo, fue estimulada por ditioneol y 2-mercaptoetanol e inhibida por ion de Cu y Zn. Durante la germinación, los niveles mayoritarios de actividad enzimática en los cotiledones, fueron detectados después de dos días (Citharel y Garreau, 1987).

4.7.3. Leucina aminopeptidasas (LAP's) especie especifica de plantas con importantes papeles de defensa.

Las LAP's con pH óptimo alcalino han sido bioquímicamente purificadas a partir de algunas plantas (Walling, 2004) y relativamente pocas de estas enzimas han sido suficientemente caracterizadas para demostrar sus estructuras hexámicas. Se ha descrito que las LAP's de plantas pueden tener un importante papel en la obtención de N y C de los cotiledones de semillas en germinación. Sin embargo, estudios recientes indican que las LAP's no pueden ser los principales contribuyentes del proceso de removilización de nitrógeno (Yang *et al.*, 2004).

Las LAP's de plantas de la familia M17 mejor caracterizadas son LAP-A y LAP-N de tomate (*Solanum lycopersicom*, antes *Lycopersicon esculentum*) (Walling, 2004). Usando inmunotransferencia 2D-PAGE, las proteínas LAP-N han sido detectadas en hojas de todas las plantas examinadas a la fecha, incluyendo el maíz, la cebada, el tabaco, *Arabidopsis*, *Brassica*, la soya, etc. (Chao *et al.*, 1999; Tu *et al.*, 2003).

Arabidopsis tiene tres genes (LAP1, LAP2 y LAP3) que codifican proteínas relacionadas con LAP-N (Walling, 2006). El gen LAP1 de *Arabidopsis* no tiene una pre-secuencia y es probable que sea de localización citosólica. La transcripción abundante de este gen no muestra un cambio apreciable durante el desarrollo o en respuesta al estrés (Bartling *et al.*, 1994).

Las Proteínas semejantes a LAP-A han sido encontradas sólo en un conjunto de Solanaceae (Chao *et al.*, 2000). El genoma del tomate alberga dos genes LapA (LapA1 y LapA2), mismos que codifican proteínas que son >99% idénticas. Los genes LapA1 y LapA2 están situados en tándem, con aproximadamente 6 kb de separación entre sus regiones codificantes (Chao *et al.*, 2000). Los RNAs y las proteínas de LapA son regulados durante su desarrollo y en respuesta al estrés biótico y abiótico (Walling, 2004). Los RNA de LapA no han sido detectados en raíces u hojas sanas; pero se encuentran de manera abundante en todos los órganos florales, brotes florales, flores maduras y frutos en desarrollo. Los transcriptos de LapA son abundantes después de las heridas, daño de tejidos por ataque de insectos (*Manduca sexta*, *Spodoptera littoralis*), infecciones por patógenos (*Pseudomonas syringae pv tomato*, *Phytophthora parasitica*), déficit de agua y estrés salino.

LapA es regulado por la vía octadecanoide del tomate, la cual es paralela a la vía biosintética de las prostaglandinas en animales. En plantas, la vía octadecanoide es activada después del daño a tejidos, convirtiendo el ácido linolenico (C₁₈) a la oxilipina ácido jasmónico (JA) (Ryan., 2000). Consistente con la inducción por heridas, los transcriptos de LapA se acumulan en respuesta a JA y sistemina (un péptido bioactivo que activa la vía octadecanoide) y declina en respuesta al ácido salicílico, un conocido antagonista de la señalización por heridas (Chao *et al.*, 1999).

El JA activa genes de respuesta temprana y tardía a heridas (Ryan, 2000). Los genes de respuesta temprana a heridas codifican proteínas que amplifican la vía de señalización del octadecanoide, aumentando las señales por herida (prosistemina, poligalacturonasa), lípidos substrato de C₁₈ (lipoxigenasas), o enzimas oxilipinas biosintéticas. Muchos genes de respuesta tardía a heridas, codifican proteínas antinutritivas, tales como inhibidores de Serina proteinasas, polifenol oxidasa, arginasa y treonina desaminasa (Chen *et al.*, 2005). LapA es un gen de respuesta tardía a heridas que es transcripcionalmente controlado (Chao *et al.*, 1999) y la región entre -313 y -78 es suficiente para la inducción del promotor de LapA regulada por JA (Ruiz-Rivero *et al.*, 1998). Esta regulación es medida por dos factores de transcripción MYC (JAMYC2 y JAMYC10) inducidos por JA que se unen a un motif repetido (GAGTA)

(Boter *et al.*, 2004). Por otro lado, la mutagénesis ha demostrado que un motif de AACGTG también es necesario para la inducción de LapA por JA.

Aunque la función de LAP-A no se conoce, se ha postulado que LAP-A puede tener un papel antinutritivo en el aparato digestivo alcalino de insectos. Esta conclusión se basa en el hecho de que LapA es corregulado con muchos genes que confieren propiedades antinutritivas al follaje (Chao *et al.*, 1999). LAP-A es excepcionalmente estable en el aparato digestivo alcalino del lepidóptero (Chen *et al.*, 2005), y tiene un pH óptimo alcalino (Gu *et al.*, 1999). Un papel directo de LAP-A en la defensa, es coherente con el papel de las endopeptidasas en la disuasión y la defensa contra insectos (Pechan *et al.*, 2002).

También se ha propuesto que LAP-A podría regular la señalización por heridas (Walling, 2006), y los análisis recientes sobre el silenciamiento de *LapA* en plantas apoya esta premisa (Matsui *et al.*, 2006). Aún no se ha esclarecido si la capacidad de LAP para regular la respuesta a heridas es dependiente de la actividad de aminopeptidasa o de manera semejante a las LAPs procarióticas, LAP-A en el tomate podría actuar como un regulador transcripcional. Los Microarreglos se están utilizando para probar dicha hipótesis y para identificar la cascada de genes que son regulados por *LapA* (Matsui *et al.*, 2006).

4.7.4. Enzimas hidrolíticas descritas en la semilla de *Theobroma cacao* L.

Biehl *et al.*, (1993) demostraron que las proteínas de reserva de la semilla de cacao, son hidrolizadas mediante proteasas, produciendo la formación de más de 80 oligopéptidos y aminoácidos libres diferentes (Biehl *et al.*, 1993; Voigt *et al.*, 1994b).

En la semilla de *T. cacao* L., se ha descrito una **aspartil proteinasa**, la cual ha sido considerada una enzima clave, involucrada en la formación de los precursores del aroma del cacao, generados básicamente durante la fermentación de la semilla. Estos precursores son una mezcla de péptidos y aminoácidos hidrófobos (alanina, valina, leucina, fenilalanina, etc.), los cuales calentados y en presencia de glucosa producen la formación de un aroma específico (Rohan, 1964; Biehl *et al.*, 1982b, 1985; Kirchhoff *et al.*, 1989a). Durante el proceso de fermentación, la pulpa alrededor de la semilla es degradada por microorganismos y los azúcares son transformados en ácidos,

principalmente ácido acético. Los ácidos penetran en la semilla y causan la acidificación en el tejido de reserva. Como el pH baja (3.5), la semilla pierde su estructura celular y posteriormente, ocurre la hidrólisis de las proteínas de reserva (Biehl *et al.*, 1982a; 1985). También se asiste a una fuerte disminución del contenido de fenoles totales del orden del 70 al 80%. Las procianidinas disminuyen globalmente del 90% en ocho días y sus evoluciones son comparables a las logradas por Villeneuve *et al.*, (1989). Esta disminución se debe a fenómenos de difusión, de curtido y de polimerización oxidativa, esto ocasiona una reducción de la astringencia. Se ha propuesto que los precursores del aroma, son derivados a partir de la degradación de la albúmina y globulina clase vicilina (7S) contenida en la semilla del cacao. Esta degradación es llevada a cabo por una **proteínasa aspártica** y una **carboxipeptidasa** presentes en la semilla madura del cacao no germinado (Voigt *et al.*, 1994 a, b; Voigt *et al.*, 1995).

Hansen *et al.*, (1998) realizaron estudios sobre la determinación de las actividades enzimáticas de endoproteasa, **aminopeptidasa** y carboxipeptidasa presentes en la semilla de cacao durante la fermentación. La proteínasa aspártica o endoproteasa conservó 50 % de la actividad enzimática después de 4 días de fermentación, no se inactivó con el secado solar ni artificial, lo cual indicó una gran estabilidad durante todo el proceso de fermentación. La **aminopeptidasa** tuvo un pH óptimo de 7.0, y fue muy sensible a la fermentación, conservando solamente 5 % de su actividad después de dos días de fermentación; sin embargo, fue estable al secado solar y artificial. La carboxipeptidasa resultó más estable que la aminopeptidasa, conservando entre 50 y 15 % de su actividad, después de 3 o 4 días de fermentación respectivamente, y no resultó inactivada por secado solar y artificial. Además dichas enzimas, permanecieron activas en la semilla seca (Hansen *et al.*, 1998). Se ha reportado que en las semillas maduras del cacao no germinado, la actividad proteolítica predominante detectada es la actividad de aspartil proteínasa. Esta actividad es encontrada en niveles muy altos en la semilla de cacao, comparado con los niveles detectados en las semillas de otras plantas (Voigt *et al.*, 1997). La actividad enzimática de esta proteínasa parcialmente purificada resultó ser óptima a pH 3.5 y sensible a Pepstatina A (Biehl *et al.*, 1993). Posteriormente, se purificó otra proteínasa aspártica, la cual resultó estar formada de dos péptidos (29 y 13 kDa) derivados de un único zimógeno precursor de 42 kDa (Voigt

et al., 1995). Mediante el uso de anticuerpos específicos para la aspartil proteínasa purificada, Voigt *et al.*, (1995) demostraron que esta enzima se acumula en presencia de vicilina durante la maduración de la semilla. Además, el nivel de actividad permanece constante durante los primeros días de la germinación y no disminuye sino hasta que se inicia la degradación de la globulina (Voigt *et al.*, 1995).

En 2002, Laloï *et al.*, aislaron y caracterizaron dos genes codificantes de aspartil proteínasa (*TcAP1* y *TcAP2*) a partir de la semilla de cacao. Los estudios de expresión mediante análisis Northern y la clonación del cDNA indicaron que ambos genes se expresan durante el desarrollo de la semilla de cacao. Estos genes se expresan en la etapa temprana del desarrollo de las semillas y sus niveles de RNAm disminuyen hacia la etapa final de maduración. *TcAP2* es expresado en niveles muchos más altos que *TcAP1*; sin embargo, el nivel del RNAm de *TcAP2* se incrementa levemente durante la germinación. Ambos genes comparten 73% de identidad. El hecho de que ambos genes tengan diferentes patrones de expresión, sugiere que ambas proteasas pueden tener diferentes funciones en la maduración de las semillas y durante la germinación (Laloï *et al.*, 2002).

En 2010, Sánchez-Mundo *et al.* reportaron actividad de exopéptidasas Carboxipeptidasa (CP), leucina-aminopeptidasa (APE) y Xaa Prolil Dipeptidil aminopeptidasa (Xaa-Pro-DAP), existentes durante la germinación de semillas de cacao (*T. cacao L.*), y concluyeron que estas peptidasas podrían participar de manera sinérgica en la degradación de las proteínas de almacenamiento durante la germinación del cacao.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

5.1.1. Muestreo

El presente trabajo se desarrollo con semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) provenientes de plantas del genotipo criollo almendra blanca, cultivado en el Rancho “La Joya” ubicado en el Municipio de Cunduacán, Tabasco; entre las coordenadas 18°17'55” latitud norte y 93°18'03” latitud oeste. El muestreo se llevó a cabo durante la segunda cosecha de los meses de marzo y abril del 2009, 2010 y 2011.

5.1.2. Condiciones de germinación

Las semillas de cacao frescas (desprovistas de mucílago) se germinaron sobre agrolita hidratada a saturación, siguiendo un periodo de luz/oscuridad de 12 horas, a temperatura ambiente y se cosecharon a los 10 días de germinación (emisión de la radícula) (Laloi *et al.*, 2002). Posteriormente se separo el eje embrionario, la radícula y los dos cotiledones. Los cotiledones se emplearon para la purificación de la enzima con actividad de tcAPE.

5.2. Métodos

5.2.1. Preparación de polvos secos de acetona

Los polvos secos de acetona (PDA) se prepararon a partir de los cotiledones de semillas germinadas de acuerdo a la metodología de Hansen *et al.*, 1998 modificada por Sánchez-Mundo *et al.*, 2010. Los cotiledones se molieron con nitrógeno líquido, mediante el empleo de mortero y pistilo hasta obtener un polvo fino. En seguida la grasa fue removida de los polvos utilizando hexano al 100% en una relación de 10 ml/g y agitando suavemente a 4°C durante 2 h. El solvente fue eliminado por decantación y la muestra fue secada a temperatura ambiente. Los polifenoles fueron removidos de los polvos secos desengrasados con cinco extracciones sucesivas con acetona al 80 %, seguido por tres extracción con acetona al 100% (10 ml/g de polvo). En cada paso de extracción, las extracciones se realizaron a 4°C, usando un homogenizador y aplicando pulsos de 15 s a velocidad baja. En seguida, las muestras fueron centrifugadas a 5 000

x g por 5 min a 4°C y a 20 000 x g para las ultimas 3 extracciones. Finalmente, el solvente fue evaporado de la pasta resultante a temperatura ambiente. Esta fue molida hasta obtener un polvo homogéneo. Los polvos secos de color blanco/ligeramente amarillo fueron almacenados a -20°C hasta su posterior análisis.

5.2.2. Preparación del extracto enzimático

El extracto enzimático fue obtenido de acuerdo a Davy *et al* (2000), con algunas modificaciones como a continuación se describe. A partir de una relación de 15 mg de PDA y 30 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) en 900 µl de regulador Tris-HCl 0.1 M (pH 7.0) conteniendo 1% de Tritón X-100. Para la inactivación de enzimas con actividad de serina proteasas y metaloproteasas se agregó PMSF 1 mM y EDTA 1 mM. La incubada a 37 °C durante 30 minutos a 37°C y centrifugada a 10,000 x g y 20,000 x g durante 10 min a 4 °C. Finalmente el sobrenadante fue separado.

5.3. Purificación de la enzima tcAPE

5.3.1. Precipitación con sulfato de amonio

El sobrenadante obtenido en el 5.2.2 fue precipitado a 60% de saturación con sulfato de amonio. El precipitado fue colectado mediante centrifugación a 17,000 x g durante 20 min a 4°C y disuelto en un volumen mínimo de regulador Tris-HCl 20mM (pH 7.0) y dializado durante 24 h a 4°C con el mismo regulador (Davy *et al.*, 2000). A partir de este extracto se llevó a cabo el aislamiento y purificación de la enzima tcAPE, así como su caracterización correspondiente.

5.3.2. Diálisis y concentración de proteínas

Las fracciones de proteína obtenidas por precipitación con sulfato de amonio fueron dializadas en Membranas de celulosa Spectra/Por 6 de 10,000 MWCO contra regulador Tris-HCl 20mM (pH 7.0). Los dializados fueron concentrados con el sistema de ultrafiltración Amicon® Millipore empleando una membrana de 10 kDa de corte de peso molecular de la misma marca. A continuación, la muestra fue clarificada a través de unidades de filtración Millex® Syringe-driven Filter Unit, 33 mm, unidad HV, Membrana

de PVDF de 0.45 μm de baja retención de proteínas). Posteriormente, se le determinó concentración de proteínas y actividad enzimática (Sánchez-Mundo *et al.*, 2010).

5.3.3. Determinación de la actividad enzimática de tcAPE

La actividad de tcAPE, fue determinada mediante el uso de H-Leu-*p*NA (Bachem, Bubendorf, Switzerland) como sustrato. La mezcla de reacción incluyó 370 μl de regulador Tris-HCl 0.1 M (pH 7.0) conteniendo 1% de Tritón X-100; 100 μl de agua desionizada, 30 μl de la solución de sustrato (10 mM) y 100 μl de extracto enzimático. Después de 30 min de incubación a 37°C, la reacción fue detenida con 400 μl de ZnSO_4 (5% w/v) y 100 μl de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (7.5% w/v), seguido de centrifugación a 13,201 x *g* durante 10 min. La absorbencia de la *p*-nitroanilina liberada por la reacción fue medida a 405 nm. Una unidad de tcAPE (U) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de *p*-nitroanilina del sustrato por minuto bajo las condiciones de ensayo descritas (Hansen *et al.*, 1998; Mercado-Flores *et al.*, 2004; Sánchez-Mundo *et al.*, 2010).

5.3.4. Determinación de proteína total

La concentración de proteína fue determinada durante el curso de la purificación de la enzima mediante el método de Folin-Lowry modificado por Markwell *et al.*, (1978) usando albumina sérica bovina como estándar. Se agregaron 100 μl de extracto enzimático con 200 μl agua destilada. Posteriormente, se agregaron en agitación constante, 1000 μl de reactivo A (Na_2CO_3 al 2%, NaOH al 0.4%, SDS al 1%, Tartrato de sodio y potasio al 0.16%) mas reactivo B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ al 4%) en una proporción de 100:1, se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación se agregaron en agitación constante, 100 μl del reactivo Folin-Ciocalteu diluido 1:1. La mezcla fue agitada en vortex e incubada a 37°C durante 45 min. Los péptidos revelados se leyeron a una longitud de onda de 660nm.

5.3.5. Cromatografía de Intercambio iónico

La fracción proteica obtenida por: Precipitación con Sulfato de amonio, diálisis, concentración con el sistema de ultrafiltración Amicon® Millipore empleando una membrana de 10 kDa de corte y clarificada como se indica en 5.3.2., fue aplicada a una columna XK 16/20 GE Healthcare Amersham Biosciences (16 mm diámetro interno X 20 cm de largo), previamente empacada con Q Sepharose High Performance (GE Healthcare Amersham Biosciences) y equilibrada con regulador Tris-HCl 20 mM (pH 7.0). Se colectaron fracciones de 2 ml con el mismo regulador; la elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de 0-1.0 M NaCl en regulador Tris-HCl 20 mM (pH 7.0) a un flujo de 0.3 ml/min, con monitoreo a 280 nm (FPLC-ÅKTAprime plus, GE Healthcare Amersham Biosciences, USA). La concentración de proteínas y la actividad con H-Leu-pNA fueron medidas. Las fracciones con mayor actividad enzimática fueron mezcladas, dializadas con regulador Tris-HCl 20 mM (pH 7.0) a 4°C y concentradas en un sistema de ultrafiltración Amicon® Millipore con una membrana de 10 kDa de corte de peso molecular de la misma marca (Sánchez-Mundo *et al.*, 2010).

5.3.6. Determinación del peso molecular mediante SDS-PAGE

La purificación de la tcAPE fue monitoreada por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de acuerdo a Laemmli (1970). La concentración de acrilamida en el gel concentrador y separador fue del 4 y 10% (p/v) respectivamente. Para su realización se tomaron 20 µl de las muestras para ser cargadas en cada carril del gel. La migración fue llevada a cabo a 45 V durante 3 h. Los geles fueron teñidos con plata usando el Kit comercial Silver Stain Plus (BioRad, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Finalmente los geles fueron secados para su posterior análisis. Los pesos moleculares de las fracciones proteicas fueron calculados usando estándares de Sigma-Aldrich de amplio rango conteniendo las proteínas o subunidades α2-Macroglobulina de plasma de sangre humana (180 kDa), β-Galactosidasa de *E.coli* (116 kDa), Fosforilasa b del musculo de conejo (97.4 kDa), Albumina sérica bovina (66 kDa), Fumarasa del corazón de porcino (48.5 kDa), Anhidrasa Carbónica de los eritrocitos de bovino (29 kDa), β-lactoglobulina de la leche bovina (18.4 kDa), α-lactoalbúmina de la leche bovina (14.2 kDa), Aprotinina del pulmón

vacuno (6.5 kDa). El peso molecular de la enzima estudiada se determinó por interpolación en una curva estándar.

5.4. Caracterización bioquímica de la enzima tcAPE

5.4.1. Determinación de actividad de las exopeptidasas tcCP y Xaa-Pro-DAP sobre la enzima tcAPE purificada.

La actividad de la enzima tcAPE frente a sustratos fue determinada en la fracción purificada. Los sustratos cromogénicos usados en el análisis fueron los siguientes: Leucina-p-nitroanilida (Leu-pNA) y Lisina-p-nitroanilida (Lys-pNA) para la actividad de tcAPE, Benzoil-tirosina-p-nitroanilida (Bz-Tyr-pNA) para la actividad de tcCP, Alanina-prolina-p-nitroanilida (Ala-pro-pNA) para la actividad Xaa-Pro-DAP, en ambas concentraciones 1 y 10 mM. La actividad enzimática fue realizada como se indicó previamente en 5.3.3 usando H-Leu-pNA como sustrato. (Isola y Franzoni *et al.*, 1996; Arima *et al.*, 2000; Yamauchi *et al.*, 2001; Mercado-Flores *et al.*, 2004; Pérez-Guzmán *et al.*, 2006; Sánchez-Mundo *et al.*, 2010).

5.4.2. Determinación de actividad de la endopeptidasa aspartil proteínasa (tcAP) sobre la enzima tcAPE purificada.

La actividad enzimática de aspartil proteasa, se determinó con 100 µl de muestra (fracción de la enzima purificada) y 400 µl de albúmina sérica bovina (BSA) al 0.15 mM preparada en regulador de fosfatos-ácido cítrico 0.1 M pH 3.2, la mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos. La reacción se detuvo con 500 µl de ácido tricloroacético al 10% frío, y posteriormente los tubos fueron centrifugados a 14 000 x g. La liberación de péptidos se determinó en el sobrenadante utilizando el método descrito por Lowry y col., (1951) y se leyó a una λ de 660 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 1A. Las lecturas se interpolaron en una curva de tirosina (Saheki y Holzer, 1975).

Una unidad de tcAP, se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación del equivalente a un µg de tirosina por minuto bajo las condiciones de ensayo descrita (Milewski y col. 1994).

5.4.3. Determinación de péptidos liberados por la técnica de Micro-Lowry

Se adicionaron 200 µl de muestra en tubos de vidrio, en agitación constante, 200 µl de una solución de reactivo A (CuSO₄ • 5H₂O 1%, Na₂CO₃ 24%, NaOH 1 M, tartrato de sodio y potasio 2.7%). Los tubos fueron incubados por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se adicionaron 1 000 µl del reactivo Folin-agua en una proporción de 1:20. La mezcla se incubó por 45 minutos a 37°C y los péptidos liberados se leyeron a una λ de 660 nm.

5.4.4. Efecto de inhibidores y agentes reductores sobre la actividad enzimática

Los efectos de diferentes inhibidores y agentes reductores sobre la actividad de la enzima purificada fueron estudiados utilizando Leupeptina, Pefabloc, Pesptatin, fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 1-10 fenantrolina y β -mercaptoetanol (2- β ME) (Roche, Switzerland) a concentraciones de 0.1 y 1.0 mM. La enzima fue incubada en presencia de cada inhibidor durante 30 min a 37°C seguida del ensayo enzimático realizado como se indicó previamente en 5.3.3 usando H-Leu-pNA como sustrato. La actividad de la enzima ensayada en ausencia de inhibidores fue tomada como el 100% (Isola y Franzoni *et al.*, 1996; Arima *et al.*, 2000; Yamauchi *et al.*, 2001; Mercado-Flores *et al.*, 2004; Pérez- Guzmán *et al.*, 2006; Sánchez-Mundo *et al.*, 2010).

5.4.5. Efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática

Los efectos de varios iones metálicos sobre la actividad enzimática también fueron investigados en la enzima purificada. La muestra fue pre-incubada con los iones metálicos a concentraciones de 0.1 y 1.0 mM a 37°C durante 30 min. Los iones metálicos empleados fueron los siguientes: Na⁺, Ca²⁺, Ba²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Hg²⁺, AgNO₃, AlCl₃, Mn⁺, Fe⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ y Mg²⁺. La actividad de la enzima tcAPE fue determinada como se indicó previamente 5.3.3., usando H-Leu-pNA como sustrato. La actividad de la enzima en ausencia de los iones metálicos fue considerada como 100% (Isola y Franzoni *et al.*, 1996; Arima *et al.*, 2000; Yamauchi *et al.*, 2001; Mercado-Flores *et al.*, 2004; Pérez- Guzmán *et al.*, 2006; Sánchez-Mundo *et al.*, 2010).

5.4.6. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima

El efecto del pH sobre la actividad de la enzima tcAPE purificada, fue determinado llevando a cabo el experimento a diferentes pH's usando regulador de acetato de sodio 100 mM (pH 4-5), regulador de sodio 100 mM (pH 6-7) y regulador de Tris-HCl 100 mM (pH 7-9). La actividad enzimática fue realizada como se indicó previamente en 5.3.3 usando H-Leu-pNA como sustrato. La actividad de la enzima a pH 7.0 fue considerada como 100% (Isola y Franzoni *et al.*, 1996; Arima *et al.*, 2000; Yamauchi *et al.*, 2001; Mercado-Flores *et al.*, 2004; Pérez- Guzmán *et al.*, 2006; Sánchez-Mundo *et al.*, 2010).

5.4.7. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima

La actividad de la enzima purificada, se determinó siguiendo el método descrito en 5.3.3 usando H-Leu-pNA como sustrato, incubándose la mezcla de reacción a diferentes temperaturas (30-80 °C), siguiendo la técnica de Muzziotti (2008), con ligeras modificaciones, se utilizó el regulador Tris-HCl 100 mM (pH 7.0) en la mezcla de reacción. La actividad de la enzima a pH 7.0 y 37 °C fue considerada como 100% (Isola y Franzoni *et al.*, 1996; Arima *et al.*, 2000; Yamauchi *et al.*, 2001; Mercado-Flores *et al.*, 2004; Pérez- Guzmán *et al.*, 2006; Sánchez-Mundo *et al.*, 2010).

VI. RESULTADOS

6.1. Condiciones de germinación

Durante el desarrollo del presente estudio se observaron las tres etapas de germinación descritas por Sánchez-Mundo *et al.*, 2010a. Sánchez-Mundo *et al.*, (2010b) indicaron que de acuerdo a las condiciones de germinación de este tipo de cacao criollo, en el día 10 existe una actividad proteolítica mayoritaria de las proteasas Xaa-Pro-DAP (Sánchez-Mundo *et al.*, 2010a), tcCP y tcAPE (datos no publicados), estimulada por los niveles de humedad (1.32 gH₂O/gds) y agua disponible ($a_w = 0.98$) para las reacciones propias del proceso germinativo (Sánchez-Mundo *et al.*, 2010b).

6.2. Determinación de la actividad enzimática de Aminopeptidasa (tcAPE) de *T. cacao* L.

La determinación de la actividad enzimática específica de tcAPE, fue realizada en semillas de (*Theobroma cacao* L.) de 10 días de germinación (Figura 11).



Figura 11.- Cotiledones de *Theobroma cacao* L. de 10 días de germinación desprovistos de la radícula y el eje embrionario.

Para el desarrollo de este trabajo se tomo como base, la metodología descrita por Hansen *et al.*, (1998). En este contexto, se procedió a la remoción de la grasa y los polifenoles, lo cual, es esencial para la cuantificación confiable de la actividad

enzimática de tcAPE. Sin embargo en este trabajo, fue necesario ensayar la determinación de la actividad de la enzima tcAPE como se indicó previamente en 5.3.3., usando H-Leu-pNA como sustrato y bajo diferentes reguladores (Reguladores de Tris.HCl 0.1 M y Fosfato de sodio, 0.1 M) y pH's (5.8, 6.0 y 7.0) Los resultados obtenidos indican que la actividad enzimática específica de tcApe fue mayoritaria empleando Tris-HCl 0.1 M pH 7.0 Tritón X-100 al 1%, como regulador de extracción de la fracción proteica y reacción enzimática, mostrando una actividad enzimática específica de 0.444 UAE/mg. Cabe señalar que los ensayos fueron realizados por triplicado y los datos expresan la media del tratamiento.

6.3. Purificación y caracterización de la enzima tcAPE

6.3.1. Purificación de la tcAPE de la semilla de cacao germinada

Para llevar a cabo la purificación fue necesario realizar cuatro pasos: 1) Homogenización y extracción de la enzima, 2) Precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación, 3) Concentración con el sistema de ultrafiltración Amicon® Millipore empleando una membrana de 10 kDa de corte de peso molecular y 4) Cromatografía de intercambio iónico.

El perfil de elución de la cromatografía de intercambio iónico mostró cuatro picos (QSP1, QSP2, QSP3 y QSP4), los cuales presentaron actividad tcAPE (Figura 12). El pico QSP1 (fracciones 6-9) eluyó a 0.29 M NaCl, y por lo tanto la fracción fue retenida débilmente por la columna, posiblemente debido a una baja concentración de residuos de aminoácidos presentes con una carga neta negativa. Dicho pico mostró una actividad enzimática específica de 0.678 UAE/mg de proteína total. El pico QSP2 (fracciones 13-15) eluyó a 0.54 M NaCl, y por lo tanto la fracción proteica fue retenida moderadamente con una actividad enzimática específica de 1.130 UAE/mg de proteína total. El pico QSP3 (fracciones 16-19) eluyó a 0.67 M NaCl, y por lo tanto la fracción fue retenida fuertemente por la columna, posiblemente debido a una alta concentración de residuos de aminoácidos con una carga neta negativa, mostrando una actividad específica de 0.856 UAE/mg de proteína total. Finalmente el pico QSP4 (fracción 21) fue retenido muy fuertemente por la columna, eluyendo a 0.8 M NaCl con una actividad enzimática específica de 4.889 UAE/mg de proteína total. El pico (QSP4) de la

cromatografía de intercambio iónico mostró la mayor actividad enzimática y fue utilizado para la caracterización bioquímica de la enzima. La enzima fue parcialmente purificada 6.37 veces con un rendimiento de 55.56% y una actividad enzimática específica de 4.889 UAE/mg de proteína total. Los resultados del procedimiento de purificación son resumidos en el Cuadro 4.

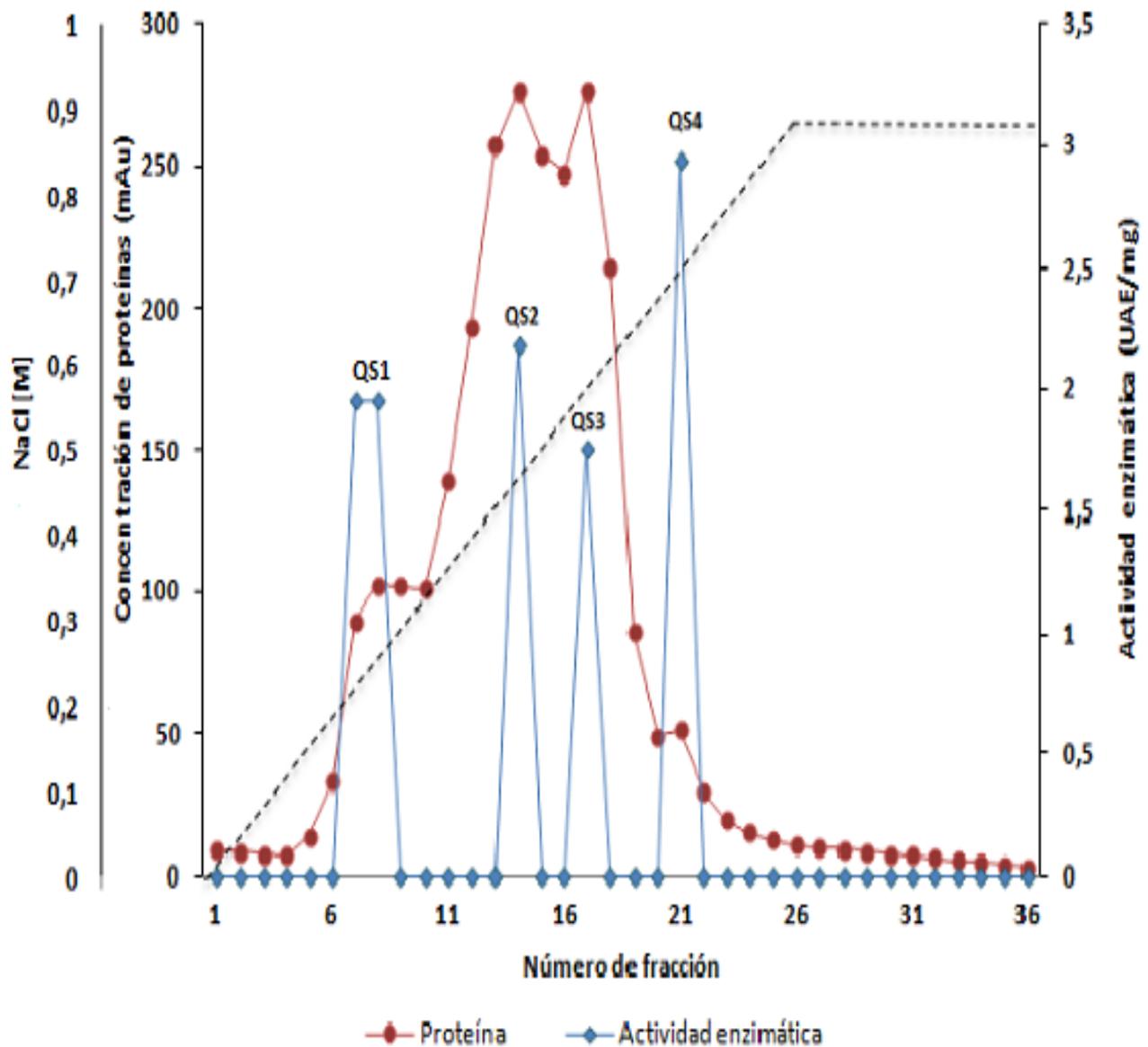


Figura 12. Purificación parcial de la tcAPE de semillas germinadas de cacao (*Theobroma cacao* L.). Las proteínas fueron detectadas por medición de la absorbencia a 280 nm (línea roja); la actividad de tcAPE fue ensayada contra H-Leu-pNA, a pH 7.0 (línea azul); cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharosa con gradiente de NaCl (línea negra punteada).

Cuadro 4. Purificación parcial de la tcAPE de la semilla germinada de cacao (*Theobroma cacao* L.).

| Pasos de purificación | Proteína Total (mg) | Act. Total (U ^a) | Act. Especifica (UAE/mg) | Factor de Purificación | Rendimiento (%) |
|---|---------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------|-----------------|
| Extracto crudo | 1.403 | 1.210 | 0.862 | 1 | 100 |
| Precipitación con sulfato de amonio (60%) | 0.573 | 0.440 | 0.767 | 0.89 | 36.36 |
| Intercambio iónico con Q-Sepharosa | 0.138 | 0.672 | 4.878 | 6.36 | 55.56 |

^aUna unidad de enzima está definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar una mol pNA por minuto, usando H-Leu- pNA como sustrato.

6.3.2. Determinación de actividad de las exopeptidasas tcCP y Xaa-Pro-DAP sobre la enzima tcAPE purificada.

La fracción de la enzima tcAPE parcialmente purificada mostró preferencia por el sustrato H-Leu-pNA, mismo que fue hidrolizado en mayor proporción a 10 mM que a 1 mM (4.889 UAE/mg de proteína total y 3.111 UAE/mg de proteína total respectivamente), seguido por el sustrato H-Lys-pNA (1.778 UAE/mg de proteína total), confirmando la presencia de actividad aminopeptidasa (tcAPE) (EC 3.4.11.). Sin embargo, también se detectó actividad enzimática de Xaa-Pro DAP (4.800 UAE/mg de proteína total) ensayada con el sustrato H-Ala-Pro-pNA. No se detectó actividad de la enzima tcCP, ensayada con el sustrato Bz-Tyr-pNA (Cuadro 5).

Cuadro 5.- Actividad de las exopeptidasas tcCP y Xaa-Pro-DAP en la fracción de la enzima tcAPE purificada frente a diferentes sustratos.

| Sustrato ^a | Actividad específica (UAE ^b /mg) | |
|-----------------------|---|-------|
| | 1 mM | 10 mM |
| H-Ala-Pro-pNA | 1.778 | 4.800 |
| H-Lys-pNA•2HBr | 1.778 | 1.689 |
| H-Leu-pNA | 3.111 | 4.889 |
| Bz-Tyr-pNA | n.d. | n.d. |

n.d.: no detectada.

^apNA: p-Nitroanilida, Bz: benzoil.

^bUna unidad de enzima es definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar una mol de pNA por minuto.

6.3.3. Determinación de actividad de la endopeptidasa aspartil proteinasa (tcAP) sobre la enzima tcAPE purificada.

En relación al sustrato (BSA), no se detecto actividad de la endopeptidasa tcAP en la fracción de enzima parcialmente purificada de la semilla germinada de cacao (Cuadro 6).

Cuadro 6.- Actividad de la endopeptidasa en la fracción de la enzima purificada frente al sustrato BSA.

| Sustrato | Actividad específica (UAE/mg) | |
|----------|-------------------------------|-------|
| | 1 mM | 10 mM |
| Albúmina | n.d. | n.d. |

n.d. = No detectada.

^aUna unidad de enzima es definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación del equivalente a un µg de tirosina por minuto.

6.3.4. Efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática de tcAPE en *Theobroma cacao* L.

En el Cuadro 7, se muestran los efectos de los inhibidores sobre la actividad de la enzima tcAPE parcialmente purificada. Los mejores inhibidores fueron Leupeptina 0.1 mM y 1 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0.1 mM y Peflaboc 0.1 mM mismos que causaron una disminución del 100%, 81.82%, 70.91% y 67.27% con respecto a la actividad máxima relativa considerada como el 100%, respectivamente. Cabe mencionar que el agente quelante EDTA ha sido descrito como inhibidor de enzimas metaloproteasas, mientras que los agentes PMSF, leupeptina y pefabloc, son descritos como inhibidores de serina proteasas. El β -mercaptoetanol que reacciona con los grupos sulfidrilo causó una activación de la enzima en un 636.36% a una concentración de 1 mM. El inhibidor de carboxipeptidasas 1-10-fenantrolina 1 mM causó una inactivación de la enzima en un 23.64%. Así mismo, la pepstatina A descrita como un inhibidor reversible específico de aspartil proteasa no mostró efecto significativo sobre la enzima de tcAPE parcialmente purificada.

Cuadro 7.- Efecto de los inhibidores y/o activadores de peptidasas sobre la actividad de tcAPE de *Theobroma cacao* L.

| Inhibidor ^a | Actividad relativa ^b (%) | |
|-------------------------|-------------------------------------|--------|
| | 0.1 mM | 1 mM |
| Leupeptina | n.d. | n.d. |
| Pefabloc | 32.73 | 40.00 |
| Pesptatin A | 98.18 | 72.73 |
| PMSF | 29.09 | 43.64 |
| EDTA | 25.45 | 18.18 |
| 1-10 Fenantrolina | 83.64 | 76.36 |
| β -mercaptoetanol | 636.36 | 283.64 |

^aPMSF, fenil metil sulfonil fluoruro ; EDTA, ácido etilen diamino tetraacético.

^bExpresada como un porcentaje de hidrólisis de H-Leu-pNA en la ausencia de cualquier inhibidor de proteinasa añadido, a el cual fue dado el valor de 100%.

6.3.5. Efecto de iones metálicos sobre la actividad tcAPE en *Theobroma cacao* L.

El Cuadro 8 muestra el efecto de iones metálicos sobre la actividad de la enzima tcAPE parcialmente purificada a partir de semillas germinadas de cacao. La actividad de la enzima tcAPE parcialmente purificada fue fuertemente inhibida en el caso de las muestras preincubadas con las sales de fierro, plata, cobalto, manganeso, aluminio, cobre y sodio en un 45.45%, 60%, 63.64%, 67.27%, 74.55%, 81.82% y 89.09%, respectivamente. Los iones de calcio, bario, mercurio y cadmio a las concentraciones ensayadas, inhibieron completamente la actividad de la enzima tcAPE parcialmente purificada. Los iones de magnesio y zinc activaron a la enzima aumentando la actividad enzimática en un 67.27% y 147.27%, respectivamente.

Cuadro 8.- Efecto de iones metálicos sobre la actividad de la enzima tcAPE en *Theobroma cacao* L.

| sal metálica | Actividad relativa ^a (%) | |
|-------------------|-------------------------------------|--------|
| | 0.1 mM | 1 mM |
| NaCl | 47.27 | 10.91 |
| CaCl ₂ | n.d. | 21.82 |
| BaCl ₂ | n.d. | 18.18 |
| CuCl ₂ | 50.91 | 18.18 |
| CoCl ₂ | 36.36 | 43.64 |
| HgCl | n.d. | n.d. |
| AgNO ₃ | 40.00 | 54.55 |
| AlCl ₃ | 25.45 | 90.91 |
| MnCl ₂ | 32.73 | 72.00 |
| FeCl ₂ | 54.55 | 76.36 |
| ZnCl ₂ | 185.45 | 247.27 |
| CdCl ₂ | n.d. | n.d. |
| MgCl ₂ | 167.27 | 98.18 |

^aExpresada como un porcentaje de hidrólisis de H-Leu-pNA en ausencia de cualquier sal metálica añadida, a el cual fue dado el valor 100%.

6.3.6. Determinación del peso molecular con Electroforesis en Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE) de tcAPE de *Theobroma cacao* L.

El peso molecular de la enzima tcAPE purificada de la semilla germinada de cacao se determinó por el método SDS-PAGE teñido por el procedimiento con nitrato de plata. En la Figura 13 se muestra las fracciones con actividad de la tcAPE de la semilla germinada de *Theobroma cacao* L. obtenidas en cada uno de los diferentes pasos de purificación de la enzima, el cual nos muestra cuatro bandas de 131.82 kDa, 122.99 kDa, 80.61 kDa y 22.69 kDa correspondientes a la muestra obtenida del pico 4 (QSP4) de la cromatografía de intercambio iónico. La presencia de cuatro bandas nos indica que hasta el momento, la muestra no ha sido purificada a homogeneidad, no descartando la posibilidad de que dichas enzimas correspondan a Xaa-Pro-DAP y Aspartil proteasas detectadas previamente en dicha fracción. Al respecto Sánchez-Mundo *et al.*, (2010b) sugieren que debido a la presencia de otras enzimas como leucina-aminopeptidasa (APE), y carboxipeptidasa (CP) en la fracción de la enzima Xaa-Pro-DAP purificada, dichas peptidasa pueden participar de una manera sinérgica en la degradación de las proteínas de almacenamiento durante la germinación de la semilla de cacao.

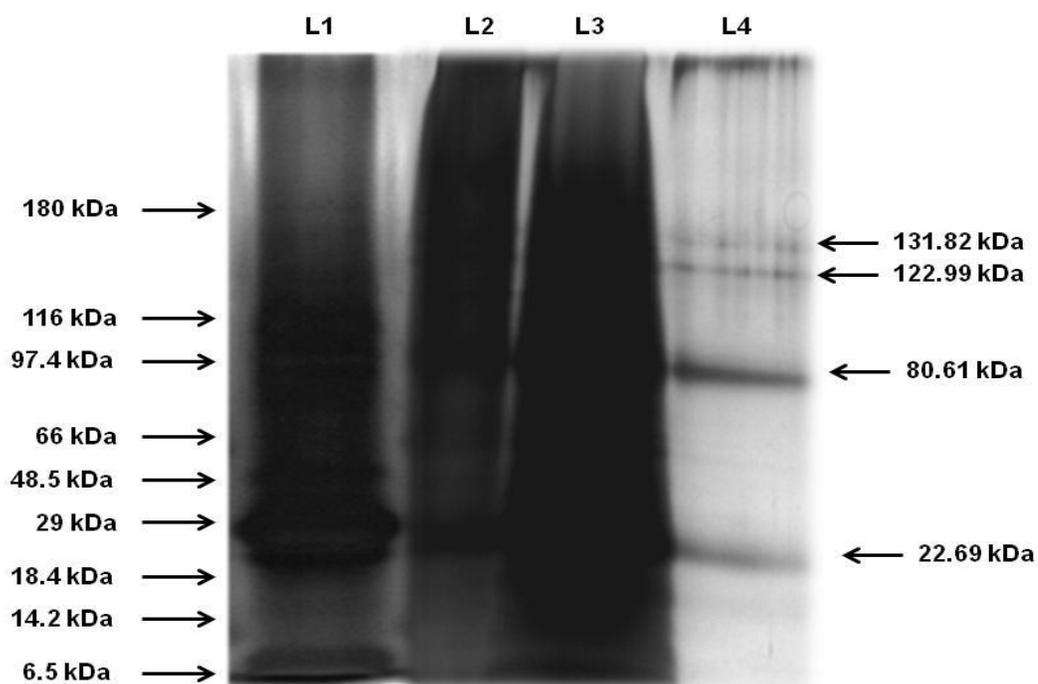


Figura 13.- Análisis electroforético de las fracciones activas de la tcAPE de *Theobroma cacao* L. obtenidas en los diferentes pasos de purificación. La fracción con máxima actividad enzimática obtenida en cada paso de purificación fueron analizadas por PAGE-SDS en condición reductora y desnaturalizante. El gel de electroforesis fue teñido con el procedimiento de nitrato plata. L1, Marcador de peso molecular; L2, extracto enzimático; L3, precipitación fraccionada con sulfato de amonio al 60%; L4, cromatografía de intercambio iónico realizada en la Columna XK 16/20 empacada con Q-Sepharosa.

6.3.7. pH óptimo de la tcAPE de *Theobroma cacao* L.

Los resultados de la actividad relativa de la enzima tcAPE de la semilla germinada de cacao a diferentes pH's se muestran en la Figura 14. La actividad hidrolítica de la tcAPE sobre el substrato H-Leu-pNA fue óptima a pH 7.0. Una alta actividad de la enzima se observó a pH 7.0 (100 %, actividad relativa) utilizando el regulador Tris-HCl 0.1 M con 1% de Tritón X-100, sin embargo, los niveles de actividad también fueron mayoritarios a pH 7.0 con el regulador Fosfato de sodio 0.1 M con 1% de Tritón X-100 (70% de actividad relativa). Se observa que a pH's 7.5, 8.0, 8.5 y 9 la actividad relativa de la tcAPE parcialmente purificada disminuye alcanzando una actividad relativa de 22%, 11%, 15% y 0 % respectivamente con el regulador Tris-HCl 0.1 M con 1% de Tritón X-100. La enzima no mostró actividad a pH's 4.0, 4.5 y 5.0 con el regulador de acetato de sodio 0.1 M con 1% Tritón X-100.

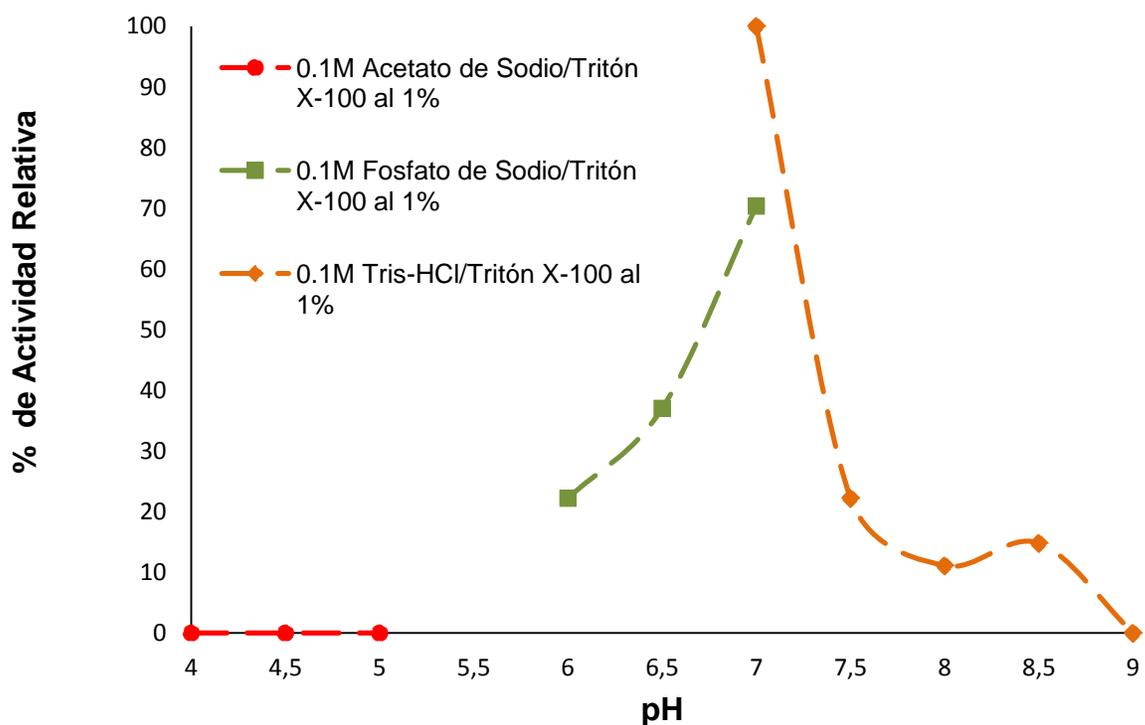


Figura 14. Efecto del pH sobre la actividad de tcAPE parcialmente purificada a partir de *Theobroma cacao* L, sobre el sustrato H-Leu-pNA. La actividad de tcAPE fue determinada a pH 4.0-5.0 con regulador de acetato de sodio 0.1 M con 1% de Tritón X-100 (Línea naranja), pH 6-7 con regulador de fosfato de sodio 0.1 M con 1% de Tritón X-100 (línea verde) y pH 7.0 a 9.0 con regulador de Tris-HCl 0.1 M con 1% de Tritón X-100 (Línea café) a 37 °C.

6.3.8. Temperatura óptima de tcAPE de *Theobroma cacao* L.

En la Figura 15 se muestra la temperatura óptima de la enzima tcAPE parcialmente purificada de la semilla germinada de tcAPE. La actividad de la enzima fue óptima a 50°C con una actividad relativa de 67.3%. Sin embargo, mostro niveles significativos de actividad a 40°C con una actividad relativa de 32.7 %. A temperatura mayor 60°C, 70°C y 80°C, la enzima se inactivo.

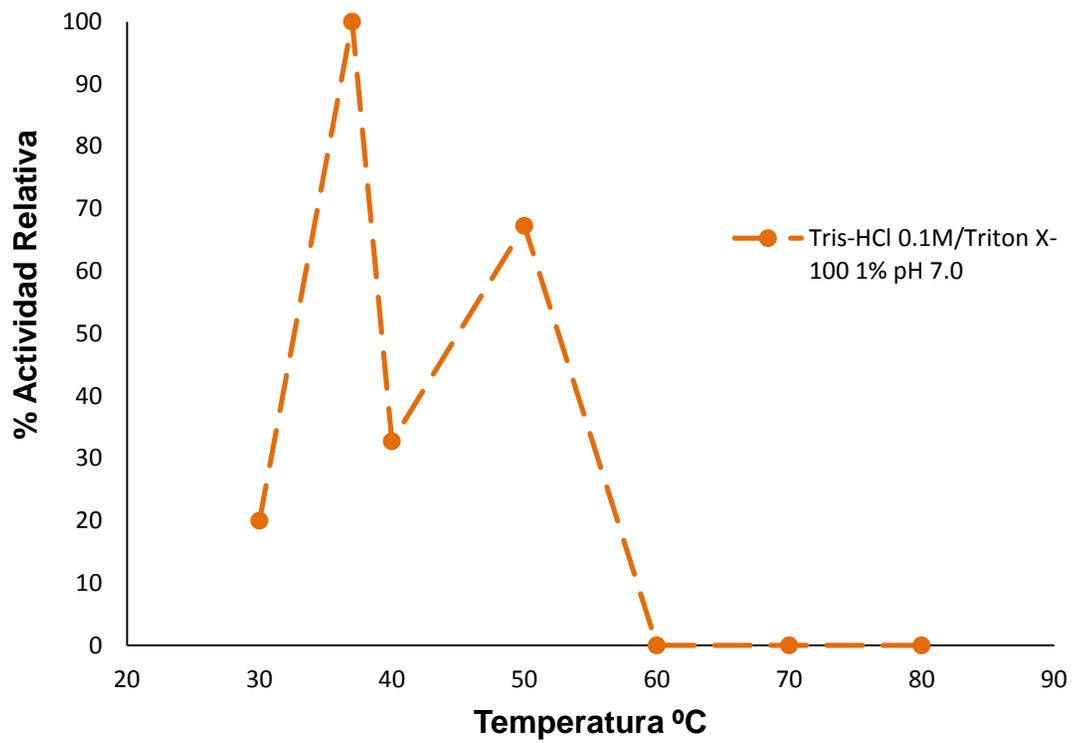


Figura 15. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la tcAPE de *Theobroma cacao* L., sobre el sustrato H-Leu-pNA. La actividad fue medida de 30-80°C y pH 7.0. H-Leu-pNA.

VII. DISCUSIÓN

Las APE's han sido identificadas y purificadas en semillas de chicharos (Elleman, 1974), frijol mungo (Chrispeels *et al.*, 1976), maíz (Vodkin y Scandalios, 1980), cotiledones de cacahuate (Isola y Franzone, 1996), jojoba (Jhonson y Storey, 1958), tomate (Chao-Jung *et al.*, 2003), semilla de girasol (Tishinov *et al.*, 2009), soya (Couton *et al.*, 1991; Asano *et al.*, 2010), semilla de *Cannabis sativa* (Arima *et al.*, 2000). El presente trabajo constituye el primer reporte de purificación de una enzima con actividad de aminopeptidasa a partir de semillas de cacao.

Sánchez-Mundo *et al.* (2010a), reportan que los cotiledones emergen del sustrato debido al crecimiento del hipocótilo y desaparece el color blanco de la semilla tornándose a color verde claro, esto se atribuye a la diferenciación de los cloroplastos, transformándolos en órganos fotosintéticos, actuando como si fueran hojas, correspondiente al tipo de germinación epigea de la semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.). A partir del cuarto día se detectó que la radícula penetra y atraviesa la cubierta del cotiledón, en algunos casos alcanza la ruptura del mismo, dando paso en los días siguientes al desarrollo del epicótilo, siendo más evidente en el día 15 de la germinación, con la aparición de las primeras hojas.

Sánchez-Mundo *et al.*, (2010b) indicaron que de acuerdo a las condiciones de germinación de este tipo de cacao criollo, en el día 10 existe una actividad proteolítica mayoritaria de las proteasas Xaa-Pro-DAP (Sánchez-Mundo *et al.*, 2010b). Por otro lado, ensayos realizados por nuestro grupo de investigación, indican los niveles de actividad de las enzimas tcCP y tcAPE son mayoritarios en el día 10 del proceso de germinación (datos no publicados). Sánchez-Mundo *et al.*, 2010b, reportan que los niveles incrementados de actividad Xaa-Pro-DAP al día 10 del proceso de germinación de la semilla de cacao, pudieran estar relacionados con cambios drásticos de las proteínas vacuolares, como se ha observado por microscopía electrónica, lo cual tomo lugar después de 10-13 días de germinación (Última etapa) de las semillas. Las proteínas vacuolares se hinchan y fusionan para formar una vacuola central con apariencia óptica vacía. De acuerdo a resultados antes mencionados, Sánchez-Mundo *et al.*, (2010b) sugieren que la proteasas Xaa-Pro-DAP en conjunto con otras

peptidasas como tcCP y juegan un papel en la degradación y almacenamiento de proteínas durante la germinación de la semilla de cacao, tomando parte en la movilización de los aminoácidos necesarios para el crecimiento del embrión. Esta última etapa del proceso de germinación, corresponde al inicio de cambios morfológicos visibles, una función que ha sido atribuida a la enzima en otras en otras plantas (Ramakrishna y Ramakrishna, 2005; Stano *et al.*, 1997; Stano *et al.*, 1994).

Por lo anterior, este trabajo de investigación fue realizado con semillas de cacao criollo germinadas durante 10 días con niveles de actividad de tcAPE de 4.889 UAE/mg de proteína total. Bielh *et al* (1982a), mediante microscopia electrónica observaron que las proteínas vacuolares incrementaron su tamaño y se fusionaron en una vacuola central la cual se mostró ópticamente vacía.

La tcAPE fue ensayada utilizando Tritón X-100 al 1% en el regulador de extracción 0.1M Tris-HCl pH 7.0, debido que se ha descrito que en cacao, este tipo de enzimas están unidas a membranas o asociadas a pared celular y pueden ser solubilizadas a un pH alcalino, utilizando Tritón X-100 o una combinación de ambos (Hansen *et al.*, 1998). La enzima tcAPE fue parcialmente purificada a partir de semillas de cacao de 10 días de germinación, 6.37 veces con un rendimiento de 55.56% y una actividad enzimática de 4.889 UAE/mg de proteína total. Las Enzimas APE de la semilla de *Cannabis sativa* y del cotiledón de la jojoba fueron purificada 474 y 260 veces con un rendimiento de 7% y 25% respectivamente (Arima *et al.*, 2000; Jhonson y Russell, 1985. Dichos rendimientos fueron inferiores al obtenido en la purificación parcial de tcAPE de cacao. Sin embargo, la actividad específica de APE de la semilla de *Cannabis sativa* y de cotiledón de jojoba fue superior (180 U/mg de proteína total y 67.9 U/mg de proteína total, respectivamente) (Arima *et al.*, 2000; Jhonson y Russell, 1985), a la tcAPE de cacao.

En la determinación de actividad de endopeptidasa aspartil proteasa (tcAP) y exopeptidasas tcCp, sobre la enzima tcAPE parcialmente purificada; no se detectó actividad de las enzimas antes mencionada, sin embargo, si se detectó actividad de Xaa-Pro-DAP con el substrato H-Ala-Pro-pNA. En relación a la actividad de tcAPE de la fracción de la enzima parcialmente purificada, el substrato H-Leu-pNA fue hidrolizado en mayor proporción a 10 mM que a 1 mM (4.889 UAE/mg de proteína total y 3.111 UAE/mg de proteína total, respectivamente), confirmando la presencia de una leucina

aminopeptidasa (EC 3.4.11.). Sanchez-Mundo *et al*, (2010b), emplearon el sustrato H-Leu-pNA en el extracto enzimático para detectar actividad enzimática de tcAPE en la fracción de la enzima Xaa-Pro-DAP purificada a partir de semillas de cacao germinadas durante diez días, encontrando actividad de tcAPE (1.33 UAE/mg de proteína total). Debido a la presencia de leucina aminopeptidasa y carboxipeptidasa en la fracción de la enzima Xaa-Pro-DAP parcialmente purificada, los autores Sánchez Mundo, *et al*, (2010b) concluyen que dichas peptidasas pueden participar de manera sinérgica en la degradación de las proteínas de almacenamiento durante la germinación de la semilla de cacao.

Las aminopeptidasas tienen una amplia especificidad de sustratos aminoácido-pNA. Arima *et al*, (2000) reportan que el mejor sustrato para la aminopeptidasa HSA purificada a partir de *Cannabis sativa* fue Leu-pNA, seguido de Ala-pNA y Pro-pNA. Los sustratos Gly-pNA, Arg-pNA y Lys-pNA fueron levemente hidrolizados por la enzima, mientras que Glu-pNA no fue hidrolizado por la enzima. Russell y Storey (1985), reportaron la purificación de una AP principal a partir de los cotiledones de jojoba. La enzima mostró niveles mayoritarios de hidrólisis hacia Leu-pNA y Leu-βNA con igual valor de hidrólisis, seguido por los sustratos Ala-pNA, Arg-pNA Glu-pNA y Lys-pNA, mismos que fueron levemente hidrolizados por la enzima, mientras que Benzoil-Arg-pNA no fue hidrolizado. La APE ha sido reportada como la segunda enzima más frecuente después de la aspartil peptidasa (AP) (E.C. 3.4.23) en la semilla fermentada de cacao.

Los mejores inhibidores sobre la inactivación de la enzima tcAPE parcialmente purificada fueron Leupeptina 0.1 mM y 1 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0.1 mM y Pefabloc 0.1 mM mismos que causaron una disminución del 100%, 81.82%, 70.91% y 67.27% con respecto a la actividad máxima relativa considerada como el 100%. Cabe mencionar que el agente quelante EDTA ha sido descrito como un inhibidor de enzimas metaloproteasa, mientras que los agentes PMSF, Leupeptina y Pefabloc son descritos como inhibidores de serina proteasas. Una serina y metalo-proteinasas fueron detectadas de leucina aminopetidasa en *M. funerus*, considerando que PMSF y 1-10-*o*-fenantrolina inhibieron significativamente la actividad proteolítica (Bozic *et al*, 2003). *F. gigantea* LAP2 fue inhibida por 1-10-*o*-fenantrolina, EDTA, oxalato de sodio y citrato

de sodio. Estos resultados indican que la *F. gigantea* LAP2 es una metaloaminopeptidasa (Hua *et al.*, 1998; Smyth y O'Cuinn, 1994; Umetsua *et al.*, 2003). Por lo anterior tcAPE parcialmente purificada es una leucina aminopeptidasa con preferencia por serina en su sitio activo.

La enzima también fue completamente inhibida por los compuestos de calcio, bario, mercurio y cadmio en un 100%, lo cual sugiere la presencia de un grupo sulfidrilo libre al sitio activo de la enzima tcAPE parcialmente purificada. El efecto del mercurio sobre la actividad de las leucina aminopeptidasa han sido comprobadas en *F. gigantea* LAP2 con una actividad relativa de 0% a una concentración de 10 mM. Las sales de fierro, plata, cobalto, manganeso, aluminio, cobre y sodio presentaron una fuerte inhibición sobre la actividad de la enzima tcAPE parcialmente purificada en un 45.45%, 60%, 63.64%, 67.27%, 74.55%, 81.82% y 89.09%, respectivamente. El efecto de cobre ha sido reportado en PepN de *St. Thermophilus* TW43 en un 79.4% de actividad relativa. El cobalto exhibe resultados contradictorios según distintos autores. Mitoshima *et al* (2003) reporta que actúa aumnetando levemente la actividad enzimática, sin embargo Rul *et al* (1994) reporta que es un potente inhibidor. En el caso particular de PepN de *St. Thermophilus* TW43, el cobalto aumentó la actividad de la enzima aproximadamente 5 veces en la concentración ensayada (0.1 mM y 1 mM) (Marguet *et al.*, 2006).

El peso molecular de tcAPE parcialmente purificada se determinó por SDS-PAGE teñido por el procedimiento con nitrato de plata, obteniendo cuatro bandas 131.82 kDa, 122.99 kDa, 80.61 kDa y 22.69 kDa correspondientes a la muestra obtenida del pico 4 (QSP4) de la cromatografía de intercambio iónico. La presencia de cuatro bandas nos indica que hasta el momento, la muestra no ha sido purificada a homogeneidad, no descartando la posibilidad de que dichas enzimas correspondan a Xaa-Pro-DAP y Aspartil proteasas detectadas previamente en dicha fracción. Al respecto Sánchez-Mundo *et al.*, (2010a) sugieren que debido a la presencia de otras enzimas como leucina-aminopeptidasa (APE), y carboxipeptidasa (CP) en la fracción de la enzima Xaa-Pro-DAP purificada, dichas peptidasa pueden participar de una manera sinérgica en la degradación de las proteínas de almacenamiento durante la germinación de la semilla de cacao. En la semilla de girasol (*Helianthus annuus* L.) una principal aminopeptidasa fue purificada a homogeneidad, mostrando una banda definida con un

peso molecular de 80 kDa por SDS-PAGE teñido con plata y un pI de 4.6 de enfoque isoeléctrico nativo (Tishinov *et al.*, 2009). Arima *et al* (2000) reportan una aminopeptidasa (HSA) purificada a partir de la semilla de marihuana con un peso molecular de 78 kDa por SDS-PAGE de la enzima purificada de Leu-sepharosa, mostrando una sola banda. Sin embargo, otras propiedades de la enzima pueden ser distintas a la Leucina aminopeptidasa. En guisantes se obtuvieron dos aminopeptidasas AP1 (58 kDa) y AP2 (74 kDa).

La serina-metalopeptidasa de *Theobroma cacao* L. (tcAPE) mostró mayor actividad a un pH de 7.0 utilizando regulador Tritón X-100, al respecto otras aminopeptidasas aisladas de vario tejidos de diferentes plantas como la cebada, la soya, semilla de marihuana, jojoba, *vicia faba*, girasol han sido reportadas por estar presentes en la germinación. La mayoría de las enzimas mencionadas anteriormente fueron activas a un pH alrededor de 7.0, excepto algunas como la de girasol, soya, cebada, *vicia faba*, fueron más activas a pH 7.4- 8.0 (Strelec *et al.*, 2009; Tishinov *et al.*, 2009; Couton *et al.*, 1991; Citharel y Garreau, 1987). En este estudio fue necesario agregar el detergente iónico Tritón X-100 al 1% con la finalidad de solubilizar a las tcAPE parcialmente purificadas, confirmando los estudios realizados por Hansen *et al* (1998) en cacao fermentado los cuales sugieren que varias de las enzimas estudiadas están ligadas a membranas o unidas a la pared celular.

La actividad de la enzima tcAPE parcialmente purificada fue óptima a 50°C, sin embargo, mostro niveles significativos de activada a 30°C y 40°C con una actividad relativa de 20%, 32.7% y 67.3% respectivamente. En contraste a temperatura mayor de 50°C se observó una desnaturalización parcial de la enzima tcAPE. En la semilla de girasol la enzima mostro una temperatura óptima entre 45°C y 50°C y una rápida inactivación de la enzima por arriba de esta temperatura (Tishinov *et al.*, 2009). Arima *et al* (2000), reportan que en la leucina aminopeptidasa de *cannabis sativa* la enzima fue bastante estable por encima de 50°C. Por su parte Asano *et al* (2010), sugieren que la enzima de aminopeptidasa del cotiledón de soya fue estable a temperaturas por debajo de 50°C. Esto pudiera deberse al tipo de material vegetativo y los reguladores que se utilicen para la extracción y purificación de dichas enzimas.

VIII. CONCLUSIÓN

1. La enzima tcAPE parcialmente purificada a partir de semillas germinadas de cacao (*Theobroma cacao* L.) a los diez días de germinación, fue purificada 6.36 veces con un rendimiento de 55.56% y una actividad específica de 4.878 UAE/mg de proteína total.
2. La actividad de la enzima tcAPE parcialmente purificada fue óptima a una temperatura de 50°C y un pH 7.0.
3. La enzima tcAPE parcialmente purificada mostró una alta especificidad por el sustrato H-Leu-pNA a una concentración de 10 mM, con una actividad específica de 4.889 UAE/mg de proteína total, no se detectó actividad de carboxipeptidasa sobre la enzima parcialmente purificada.
4. La tcAPE parcialmente purificada fue inhibida por Leupeptina 0.1 mM y 1 mM (100% de inhibición) PMSF 0.1 mM y Pefabloc 0.1 mM descritos como inhibidores de serina proteasas, así como fuertemente inhibida por EDTA 1 mM descrito como inhibidor de metaloproteasas, concluyendo que es la tcAPE es una serin metaloproteasa.
5. La enzima tcAPE fue inhibida por compuesto de mercurio como HgCl₂, indicando que tiene grupos cerrados libres de sulfidrilo adyacente en su sitio activo.
6. La tcAPE parcialmente purificada fue completamente inhibida por los iones de calcio, bario y cadmio a las concentraciones de 0.1 mM y 1 mM.
7. Por el método SDS-PAGE con tinción de plata se observan cuatro bandas de 131.82 kDa, 122.99 kDa, 80.61 kDa y 22.69 kDa correspondientes a la muestra obtenida del pico 4 (QSP4) de la cromatografía de intercambio iónico. La presencia de cuatro bandas nos indica que hasta el momento, la muestra no ha sido purificada a homogeneidad, no descartando la posibilidad de que dichas enzimas correspondan a Xaa-Pro-DAP y Aspartil proteasas detectadas previamente en dicha fracción.
8. La purificación y caracterización de la leucina aminopeptidasa (tcAPE) de cacao (*Theobroma cacao* L.), podría contribuir a la suma de esfuerzos para entender el

sistema proteolítico de *Theobroma cacao* L. y su papel en el proceso de germinación.

Los resultados de este trabajo contribuyen al estudio de la exopeptidasa Leucina-aminopeptidasa (tcAPE), importante por su participación en la degradación de las proteínas de reserva durante el proceso de germinación de la semilla de cacao.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Amrani, A., Suire, C., Camara, B., Caudillére, J.-P., and Couée, I. 1995. Purification and characterization of a novel aminopeptidase, plastidial alanine-aminopeptidase, from the cotyledons of etiolated sugar beet seedling. *Plant Physiol.*, 109, 87-94.
- Arima, K., Uchikoba, T., Shimada, M., Yonezawa, H., and Kaneda, M. 2000. Purification and some properties of an aminopeptidase from sedes of *Cannabis sativa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64 (5), 1055-1057.
- Asano, M., Nakamura, N., Kawai, M., Miwa, T., and Nio, N. 2010. Purification and characterization of an N- terminal acidic amino acid-specific aminopeptidase from Soybean cotyledon (*Glycine max*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74 (1):113-118.
- Barrett, A. J., Rawlings, N. D., and Woessner, J. F. Jr. 1998. Handbook of proteolytic enzymes. Academic Press, San Diego.
- Barrett, A. J. 1994. Clasification of peptidases. In: *Methods in Enzymology*, 244, 1-15.
- Barrett, A. J. 1986. The classes of proteolytic enzymes en "*Plant Proteolytic enzymes*" (M. J. Dalling, ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, Vol. I. Pags. 1-16.
- Barrett, A. J., Rawling, N. D., and Woessner. 2004. Handbook of proteolytic enzymes. Elsevier Academic Press. Oxford, UK.
- Bartling, D., and Nosek, J. (1994). Molecular and Immunological characterization of Leucine aminopeptidase in *Arabidopsis thailiana*: a new antibody suggests a semi-constitutive regulation of phylogenetically old enzyme. *Plant Sci.* 99, 199-209.
- Bennett, A. B. 2003. Out of the Amazon: *Theobroma cacao* enters the genomic era. *TRENDS Plant Sci.* 8: 561-563.
- Biehl, B., E. Brunner, D. Passern, V. C. Quesnel, and D. Adomako. 1985. Acidification, proteolysis and flavour potencial in fermentating cocoa beans. *J. Sci. Food Agric.* 36:583-598.

- Biehl, B., Wewetzer, C., Passern, D. 1982b. Vacuolar (storage) proteins of cocoa seeds and their degradation during germination and fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 33:1291-1304.
- Biehl, B., H. Heinrichs, H. Ziegeler-berghausen, S. Srivastava, Q. Xiong, D. Passern, V.I. Senyuk and M. Hammor. 1993. The proteases of ungerminated cocoa seeds and their role in the fermentation process. *Angew. Bot.* 67: 59-65.
- Braudeau, J., 1970. *El cacao*. Barcelona. Ed. Blume.
- Boter, M., Ruiz-Rivero, O., Abdeen, A., and Prat, S. 2004. Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 18, 1577-1591.
- Brownlee, H., Mceuen, A., Scott, I. 1990. Anti-fungal effects of cocoa tannin on the wiches' broom pathogen *Crinilellis pernicioso*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36: 39-48.
- Burle, L. 1961. *Le cacaoyer*. Maisonnruve et Larose, Paris. P. 304.
- Chao-Jung, T., Sang-Youl, P., and Walling, L. L.2003. Isolation and characterization of the Neutral leucine aminopeptidase (*LapN*) of Tomato. *Plant Physiol.* 132:243-255.
- Chao, W.S., Gu, Y.Q., Pautot, V., Bray, E.A., and Walling, L.L. 1999. Leucine aminopeptidases RNAs, proteins, and activities increase in response to water deficit, salinity, and the wound signals systemin, methyl jasmonate, abscisic acid, *Plant Physiol.* 120, 979-992.
- Chávez Planes, M. A., Diaz Brito, J., Pérez, U., Delfin, J. 1990. *Temas de enzimología*. Tomo 2. Facultad de Biología Universidad de La Habana.
- Chen, H., Wilkerson, C.G, Kuchar, J.A., Phinney, B.S., and Howe, G.A. (2005). Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 19237-19242.
- Chessman, E. E. 1944. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. *Trop. Agric.* 21:144-159.

- Christensen, J. E., Dudley, E. G., Pedersen, J. A., Steele, J. L. 1999. Peptide and catabolism in lactic bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*, 76:217-246.
- Chrispeels, M. J., Baumgartner, B. and Harris, N.1976. Regulation of reserve protein metabolism in the cotyledons of mung bean seedling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 73: 3168-3172.
- Citharel, J., and Garreau, C. 1987. Aminopeptidase from the cotyledons of *Vicia faba* L. var. *minor* seed: partial purification and some properties. *New Phytol.* 107, 499-506.
- Campell, M. K. 1995. *Biochemistry*. 2ed. Saunders: College publishing.
- Couton, J. M., Sarath, G., and Wagner, F. W. 1991. Purification and characterization of a soybean cotyledon aminopeptidase. *Plant Sci.*, 75, 9-17.
- C.S.I.R. (Council of Scientific and Industrial research). 1948-1976. *The wealth of India*. 11 vols. New. Delhi.
- Cuatrecasas, J. 1964. Cacao and its hallies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *Contrib US Herbarium*. 35:379-614.
- Davy, A., Thomsen, K., Juliano, M.A., Alves, L., Svendsen, I. and Simpson, D. 2000. Purification and Characterization of Barley Dipeptidyl Peptidase IV. *Plant Physiology*. 122: 425-431.
- Elleman, T. C. 1974. Aminopeptidases of pea. *Biochem J.* 141: 113-118.
- Eriksson, K. 1998. "Hydrophobic interaction chromatography" en "Protein purification: Principles, High-resolution Methods, and applications", editado por J-C Janson and L. Ryden, 2 Edition. Wiley-Liss, New York, 283-309.
- Fausnaugh J. L. y F. E. Regnier. 1986. Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr.*: 359, 131-146.
- García, H. M. 2000. Adaptación de geles de poliacrilamida a sistema PhastSystem. [Tesis de Maestría]. Facultad de Biología UH. Diciembre 2000.

- Giglione, C., Serero, A., Pierre, M., Boisson, B., and Meinel, T. 2000. Identification of eukaryotic peptide deformylases reveals universality of N-terminal protein processing mechanism. *EMBO J.*, 19, 5916-5929.
- Gonzales, T., and Robert-Baudouy, J. 1996. Bacterial aminopeptidases: properties and functions. *FEMS Microbiol.* 18,319-344.
- González, V. W. & Amaya, G. 2005. Cacao en México: Competitividad y Medio Ambiente con Alianza (Informe No. 825). Washington: Agencia para el Desarrollo Internacional de los Estados Unidos (USAID). Disponible en: http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNADE176.pdf [consultado 01/12/2010].
- Hagel, L. 1997. Gel Filtration Chromatography. In: Current Protocols in Protein Science. Ed. Coligan J. John Wiley and sons, Inc. Unit 8.3.1-8.3.24.
- Hansen, C. E., M. del Olmo and C. Burri. 1998. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 77: 273-281.
- Hardy, F. 1960. Cacao mundial. Inter-American Institute of Agricultural Sciences. Turrialba, Costa Rica. pp. 299-352.
- Herrera, J., Alizaga, R., Guevara, E., Jiménez, V. 2006. Germinación y crecimiento de la planta. 1ª. Ed. Editorial Universidad de Costa Rica. Costa Rica. P. 18-22.
<http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx>.
- Hua, G., K. Tsukamoto, H. Ikezawa, 1998b. Cloning and sequence analysis of the aminopeptidase N isozyme (APN2) from *Bombyx mori* midgut. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 121B: 213–222.
- Isola, M. C., and Franzoni, L. 1996. Aminopeptidase activities in peanut cotyledons. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 8(3): 167-173.
- Jones, E. W. 1991. Three proteolytic systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 266, 7963-7966.
- Jhonson, R., and Storey, R. 1958. Aminopeptidase activity from germinated Jojoba cotyledons. *Plant Physiol.* 79:641-645.

- Kalvatchev, Z., Garzaro, D., Guerra C. F. 1998. *Theobroma cacao* L.: Un enfoque para nutrición y salud. *Agroalimentaria* No. 6: 23-25.
- Kennedy, R. M. 1997. Hydrophobic Interaction Chromatography. In: *Current Protocols in Protein Science*. Ed. Coligan J. John Wiley and sons, Inc. Unit 8.4.1-8.4.8.
- Kirchoff, P-M., B. Biehl, G. Crone. 1989a. Peculiarity of the accumulation of free amino acids during cocoa fermentation. *Food Chem.* 31: 295-311.
- Kirchoff, P-M., Biehl, H. Ziegele-Berghausen, M., Hammor, R., Lieberei. 1989b. Kinetics of the formation of free amino acids in cocoa seeds during fermentation. *Food chem.* 34: 161-179.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage TA. *Nature.* 227: 680-685.
- Laloi, M., J. McCarthy, O. Morandi, C. Gysler and P. Bucheli. 2002. Molecular and biochemical characterization of two aspartic proteinases TcAP1 y TcAP2 from *Theobroma cacao* seeds. *Planta.* 215:754-762.
- Lehninger, A. L. 2000. *Principios de bioquímica*, 3ra. Edición. Editorial Omega.
- Lehninger, A. L. 1992. *Principios de bioquímica*, 2da. Edición. Editorial Omega
- Leung, A. Y. 1980. *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics*. Jonh Wiley & Sons. New York.
- López M. R. 1987. *El cacao en Tabasco*. Universidad Autónoma de Chapingo. 1ra. edición. México. p. 18.
- López-Andrade, P., V. H. Delgado-Nuñez, A. Azpeitia-Morales. 1996. *El cacao Theobroma cacao* L. en Tabasco. Libro Técnico Núm. 1, Campo experimental Huimanguillo. (INIFAP).
- López-Andrade, P. A., V. H. Delgado-Nuñez, A. Azpeitia-Morales, J. I. López-Arroyo, J. A. Jiménez Chong, A. Flores Rodríguez, L. Fraire-Sierra y R. Castañeda-Ceja. 2003. *El cacao en Tabasco: Manejo y producción*. ISPROTAB, Tabasco.

- López Hernández, E., and Valadez Villarreal, A. 2008. Análisis cromatográfico en las ciencias agropecuarias. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. División académica de ciencias agropecuarias. p. 33-38.
- López, B. O. y Ramírez, E. O. 1987. Contenido de grasa en semillas de clones de cacao *Theobroma cacao* L., seleccionadas en la costa de Chiapas. *In: Agricultura Técnica en México.* 13:117-121. *In: Bajaj, Y. P. S. (Ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry 5. Trees II.* Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York Tokio. pp. 203-221.
- Lowther, W. T., and Matthews, B. W. 2002. Metalloaminopeptidases: common functional themes in disparate structural surroundings. *Chem. Rev.* 102, 4581-4608.
- Markwell M, Haas S, Bieber L, Tolbert N. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87:206-210
- Matsui, M., Flower, J. H., and Walling, L. L. 2006. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biol. Chem.* 387: 1535-1544.
- McDonald, J. K., and Barret, A. J. 1986. Mammalian proteases: a glossary and bibliography. Vol. 2. Exopeptidases. *Academic Press, London.*
- Marguet, E., Vallejo, R., Pescuma, M. 2006. Caracterización de aminopeptidasa N de *Streptococcus thermophilus* TW43. *Rev. Cienc. Tecnol.* Año8. 12-17.
- Matsui, M., Jonathan H. Fowler and Walling, L. 2006. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biol. Chem.*, 387, pp. 1535-1544.
- Mercado-Flores, Y., Noriega-Reyes, Y., Ramírez-Zavala, B., Hernández Rodríguez, C. and Villa-Tanaca, L. 2003. Purification and characterization of aminopeptidase (pumAPE) from *Ustilago maydis*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 234, 247-253.
- Milewski, S., Mignini S., Covelli I., Borowski Y. E. 1994. Specific inhibition of acid proteinase secretion *Candida albicans*, by Lys-Nav-FMDP. *J. MED. Mycol.* 32:1-11.

- Mikkonen, A., 1992. Purification and characterization of leucine aminopeptidase from kidney bean cotyledons. *Physiol. Plant.*, 84, 393-398.
- Mora, U. 1959. Origen y variabilidad del cacao cultivado en América Tropical. Turrialba. 8 (1).
- Motamayor, J. C., Risterucci, A. M., Laurent V. A., Moreno and Lanaud, C. 2000. The genetic diversity of Criollo cacao and its consequence in quality breeding. In: Memorias del I Congreso del Cacao y su Industria, MAcaray, estado de Aragua. pag. 33-52
- Motoshima, H., Shiraishi, H., Tsukasaki, F., Kaminogawa, S: 2003. Purification, characterization, and gene cloning of lysil aminopeptidase from *Streptococcus thermophilus* YRC001. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 (4): 772-782.
- Murphy, A., Peer, W. A., and Taiz, L. 2000. Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta*, 211, 315-324.
- Pautot, V., Holzer, F. M., Reisch, B., and Walling, L. L. 1993. Leucine aminopeptidase: An inducible component of the defense response in *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 9906-9910.
- Pechan, T., Cohen, A., Williams, W. P., and Luthe, D. S. 2002. Insect feeding mobilizes a unique plant defense protease that disrupts the peritrophic matrix of caterpillar. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 13319-13323.
- Pérez-Guzmán, A., Cruz y Victoria, T., Cruz-Camarillo, R., Hernández-Sánchez, H. 2006. Purification and characterization of x-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NRRL 634. *J. Microbiology & Biotechnology.* 22:953-958.
- Ramakrishna, V., Ramakrishna Rao P., 2005. Axial control of protein reserve mobilization during germination of Indian bean (*Dilochos lablad* L.) seeds. *Acta BiolSzege.* 29:23-7.
- Rohan T. A. 1964. The precursors of chocolate aroma: a comparative study of fermented and unfermented cocoa beans. *J. Food Sci.* 29:456-459.

- Ruiz-Rivero, O.J. and Prat, S. 1998. A -308 deletion of the tomato *LAP* promoters is able to direct flower-specific and MeJA-Induced expression in transgenic plants. *Plant Mol. Boil.* 36, 639-648.
- Ryan, C. A. 2000. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 112-121.
- SAGARPA. 2004. Subsecretaría de Desarrollo Rural, Dirección General de Servicios Profesionales para el Desarrollo Rural. Consultado 10 de Abril 2009.
- Saheki, T. and Holzer H. 1975. Proteolytic activities in yeast. *Biochem. Biophys. Acta.* 348: 203-214.
- Sánchez-Mundo, M. L., Bautista-Muñoz, C., Jaramillo-Flores, M. E. 2010a. Characterization of the exopeptidase activity existing in *Theobroma cacao* L. during germination. *Process Biochemistry* 45:1156-1162.
- Sánchez, M. M. L. 2010b. Caracterización bioquímica de la actividad de Xaa-prolil dipeptidil aminopeptidasa (Xaa-Pro-DAP) de la semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis de Doctorado. IPN. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. p.28-32.
- Sanz, Y. and Toldrá, F. 2002. Purification and characterization of an arginine aminopeptidase from *Lactobacillus sakei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68,1980-1987.
- Scopes, R. K. 1995. Overview on protein purification and characterization. In: *Current protocols in protein Science*. Ed. Coligan J. John Wiley and sons, Inc. Unit 1.1.1.
- SIAP. 2009. Servicio de Información Agroalimentario y Pesquera. Consultado el 15 de Julio del 2010.
- Smyth, M., G. O’Cuinn, 1994. Alanine aminopeptidase of guinea-pig brain: a broad specificity cytoplasmic enzyme capable of hydrolysing short and intermediate length peptides. *The International Journal of Biochemistry*, 26: 1287–1297.
- Spencer, M., and Hodge. 1991. Cloning and sequencing of the cDNA encoding the major albumin of *Theobroma cacao*. *Planta.* 183: 528-545.

- Strelec, I., Vukelic, B., and L Vitale, L., 2009. Aminopeptidase of germinated and non-germinated barley. *Food Technol. Biotechnol.* 47 (3) 296-303.
- Suárez-Rendueles P. y D. H. Wolf. 1988. Proteinase function in yeast: biochemical and genetic approaches to a central mechanism of post-translational control in the eukariotic cell. *FEMS Microbiol. Lett.* 54: 17-46.
- Swarbrick J.T., Toxopeus H. and Hislop E. C. 1964. Estate cacao in Fernando Po. *World Crops.* 1964; 35-40 Coffee and cacao. *J.* (1965): 151-164-167.
- Tishinov, K., Stambolieva, N., Petrova, S., Galunsky, B., and Nedkov, P. 2009. Purification and characterization of the sunflower seed (*Helianthus annuus* L.) major aminopeptidase. *Acta Physiol Plant.* 31:199-205.
- Toxopeus, H. 1969. Cacao. *In: Fewerda, F. P. y Wit, F. (Eds.). Outlines of perennial crop breeding in the tropics.* Veenman, H. y Zonen, N., Wageningen, V. The Netherlands.
- Tsakalidou, E., I. Dalezios, M. Georgalaki and G. Kalantzopoulos. 1993. A Comparative Study: Aminopeptidase Activities from *Lactobacillus delbruekii* ssp. *Bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Sci.*, 76: 2145-2151.
- Tu, C. J., Park, S. Y., and Walling, L. L. 2003. Isolation and characterization of the neutral leucine aminopeptidase (LapN) of tomato. *Plant Physiol.* 132, 243-255.
- Umetsua, H., M. Araia, T. Otab, R. Kudob, H. Sugiurab, H. Ishiyamab, K. Sasakib, 2003. Purification and properties of an aminopeptidase from the mid-gut gland of scallop (*Patinopecten yessoensis*) *Comparative Biochemistry and Physiology*, 136B: 935–942.
- Urquhart, D. H. 1961. Cocoa. Formerly director of agricultura in Ghana. Ed. Longmans. Great Britain. pp. 7-17.
- Valenzuela, B. A. 2007. El chocolate un placer muy saludable. *Revista chilena de Nutrición*, año/vol. 34. Número 003. Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y Toxicología. Santiago de Chile.

- Villeneuve F., Cros E., Macheix J. J. 1989. Recherche d'un indice de fermentation du cacao. III. Evolution des flavan-3-ols de la fève. *Café, Cacao, Thé*, 33, 165-170.
- Vodkin, L. O., and Scandalios, J. G. Comparative properties of genetically defined peptidases in maize. *Biochem.* 1980; 19:4660-4667.
- Voigt, J., B. Biehl, H. Heinrichs, S. G. Marsoner y A. Hugi. 1994a. In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. *Food Chem.* 49:173-180.
- Voigt, J., H. Heinrichs, G. Voigt. Y B. Biehl. 1994b. Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds. *Food Chem.* 50:177-184.
- Voigt, J. and B. Biehl. 1995. Precursors of the cocoa-specific aroma components are derived from the vicilin-class 7S globulin of the cocoa seeds by proteolytic processing. *Bot. Acta.* 108: 283-289.
- Voigt, G., B. H. Biehl, Heinrichs and J, Voigt. 1997. Aspartic proteinase levels in seeds of different angiosperms. *Phytochemistry.* 44: 389-392.
- Walling, L.L. 2004. Leucyl aminopeptidase (plant). In: *Hand-book of Proteolytic Enzymes*, 2nd Edition, A.J. Barrett, N.D. Rawlings, and J.F. Woessner, eds. (San Diego, USA: Elsevier Academic Press), pp. 901-904.
- Walling, L.L. 2006. Recycling or Regulation? The role amino-terminal modifying enzymes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 227-233.
- Williams A. 1995a. Overview of conventional Chromatography . In: *Current Protocols in Protein Science*. Ed. Coligan J. John Wiley and Sons, Inc. Unit 8.1.1-8.1.2.
- Williams A. 1995b. Ion Exchange Chromatography . In: *Current Protocols in Protein Science*. Ed. Coligan J. John Wiley and Sons, Inc. Unit 8.2.1-8.2.30.
- Wood, G. A.R., Lass, R. A. 1985. *Cocoa*. Longman: London.

- Yamaoka, Y., Takeuchi, M., and Morohashi, Y. 1994. Purification and partial characterization of an aminopeptidase from mung bean cotyledons. *Physiol. Plant.*, 90, 729-733.
- Yamauchi, Y., Ejiri, Y., and Tanaka, K. 2001. Purification of an Aminopeptidase preferentially releasing N-terminal Alanine from Cucumber leaves and its identification as a plant aminopeptidase N. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 (12), 2802-2805.
- Yang, L.T., Mickelson, S., See, D., Blade, T.K., and Fischer, A.M. 2004. Genetic analysis of the function of major leaf proteases in barley (*Hordeumvulgare* L.) nitrogen remobilization. *J. Exp. Bot.* 55, 2607-2616.