



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA CARBOXIPEPTIDASA
(tcCP) DE LA SEMILLA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.)**

FRANCIS DE JESÚS ALVARADO SANTIAGO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

H.CÁRDENAS, TAB. MÉXICO

2011

La presente tesis, titulada: Purificación y Caracterización Bioquímica de la carboxipeptidasa (tcCP) en la semilla de cacao (*Theobroma cacao* L), realizada por la alumna: Francis de Jesús Alvarado Santiago, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRODUCCION AGROALIMENTARIA EN EL TROPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DRA. CONSUELO DEL C BAUTISTA MUÑOZ

ASESOR:



DRA. MA. EUGENIA JARAMILLO FLORES

ASESOR:



DRA. ADRIANA DELGADO ALVARADO

ASESOR



DR. LUIS M. VARGAS VILLAMIL

H. Cárdenas, Tab. México, 15 de Diciembre de 2011

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA CARBOXIPEPTIDASA (tcCP) EN LA SEMILLA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.)

Francis de Jesús Alvarado Santiago, MC.

Colegio de Postgraduados, 2011

La carboxipeptidasa tcCP de semillas de *Theobroma cacao* L., fue purificada 11.5 veces con un redimiendo de 45.5% con tres pasos de purificación que incluyen: homogenización y extracción de la fuente de enzima, precipitación con sulfato de amonio al 40% de saturación y cromatografía de intercambio iónico. El peso molecular de la enzima se estimó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), con tinción con plata. La tcCP es un monómero con peso molecular de 30.77 kDa, el cual hidroliza péptidos a temperatura de 40-50°C y pH 7.0. El sustrato Bz-Tyr-pNA fue hidrolizado a una mayor proporción a 10 mM (13.576 UAE/mg de proteína total) confirmando la presencia de actividad carboxipeptidasa (CP) (E.C. 3.4.16). En relación a los sustratos Leucina-p-nitroanilida (Leu-pNA) y Lisina-p-nitroanilida (Lys-pNA) para detectar actividad de aminopeptidasa, Alanina-prolina-p-nitroanilida (Ala-pro-pNA) para detectar la actividad Xaa-Pro-DAP, en ambas concentraciones 1 y 10 mM, no se detectó actividad de las enzimas mencionadas con ninguno de los sustratos ensayados. El sitio activo contiene una serina debido a que la actividad enzimática de la tcCP fue reducida 89.47 % por fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF). Lo que indica que es una serina carboxipeptidasa. Sin embargo, la actividad de la tcCP es reducida por iones de mercurio, los que sugiere la presencia de un grupo sulfhidrilo adyacente al sitio activo de la enzima. El EDTA y 1,10-Fenantrolina inhibidores de metaloproteasas, no inactivaron la enzima.

Palabras claves: *Theobroma cacao* L., carboxipeptidasa tcCP, sustrato Bz-Tyr-pNA.

**PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF
CARBOXYPEPTIDASE (tcCP) OF THE COCOA SEEDS (*Theobroma cacao* L.)**

Francis de Jesús Alvarado Santiago, MC.

Colegio de Postgraduados, 2011

Carboxypeptidase seeds tcCP from *Theobroma cacao* L., was purified 11.5 fold with a 45.5% redeeming with three steps procedure including: homogenization and extraction of the enzyme source, ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. The molecular weight of the enzyme was estimated by polyacrylamide gel electrophoresis on 12% denaturing conditions (SDS-PAGE) with silver staining. The tcCP is a monomer with molecular weight of 30.77 kDa, which hydrolyzes peptides at temperature of 40-50 ° C and pH 7.0. The substrate Bz-Tyr-pNA was hydrolyzed to a greater share to 10 mM (13 576 UAE / mg of protein total) confirming the presence of carboxypeptidase activity (CP) (EC 4.3.16). In relation to the substrate leucine-p-nitroanilide (Leu-pNA) and Lys-p-nitroanilide (Lys-pNA) to detect aminopeptidase activity, alanine-proline-p-nitroanilide (Ala-Pro-pNA) to detect the activity Xaa-Pro-DAP, in both 1 and 10 mM concentrations, no activity was detected with the enzymes mentioned any of the substrates tested. The active site contains a serine because the enzymatic activity of the tcCP was reduced by 89.47% phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF). Moreover, the activity of the tcCP is reduced by mercury ions, which suggests the presence of a sulfhydryl group adjacent to the active site of the enzyme. EDTA and 1,10-phenanthroline inhibitors of metallo-carboxypeptidases, did not inactivate the enzyme.

Key words: *Theobroma cacao* L, carboxypeptidase tcCP, substrate Bz-Tyr-pNA.

Aunque hablara todas las lenguas de los hombres y de los ángeles, si me falta el amor sería como bronce que resuena o campana que retiñe.

Aunque tuviera el don de profecía y descubriera todos los misterios —el ser más elevado—, aunque tuviera tanta fe como para trasladar los montes, si me falta el amor nada soy.

Ahora, pues, son válidas la fe, la esperanza y el amor; las tres, pero la mayor de estas tres es el amor.

1-Corintos 13

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por cubrirme de bendiciones, porque es mi luz y mi fortaleza, por darme salud e inteligencia para continuar con mi superación.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado durante el transcurso de la Maestría.

Agradezco al Colegio de Postgraduados así como a la Línea Prioritaria de Investigación No. 2. “Agroecosistemas Sustentables” por el financiamiento otorgado.

Agradezco a mi consejera

Dra. Consuelo del Carmen Bautista Muñoz todo su esfuerzo, dedicación, tiempo y apoyo brindado para la realización de la presente tesis.

Agradezco a mis asesores

Dra. María Eugenia Jaramillo Flores,
Dra. Adriana Delgado Alvarado,
Dr. Luis Manuel Vargas Villamil y
Dra. María de la Luz Sánchez Mundo.

Por sus consejos, tiempo, dedicación y apoyo brindado para la realización de la presente tesis.

Agradezco a mis compañeros de generación por su valiosa amistad especialmente a mis compañeras Ivanna de Lizeth e Isabel.

Agradezco al personal del Colegio de Postgraduados por todas las facilidades otorgadas para la realización de mi maestría, así como su amistad y apoyo brindado.

DEDICATORIA

A mí Querido Esposo Héctor

Por todo su amor, comprensión y apoyo incondicional, porque es la razón de mi vida y porque continuemos realizando sueños maravillosos. Gracias mi Vida, Te amo.

A mis Queridos Padres: Hilda y Luis Antonio

Por el inmenso apoyo, amor y confianza que en mí depositaron, para que sus sacrificios no fueran en vano, la cual constituye la herencia más valiosa que pudiera recibir para continuar con mi superación.

A mis hermanas Paula, Hilda, Yadira y Cinthia y a hermano Luis Antonio

Por todo el amor y apoyo que me han brindado siempre.

A mis Suegros Lesvia y Eliseo

Por todos sus consejos, cariño y apoyo que me han brindado.

A mis Cuñados y cuñadas

Por todo su cariño y apoyo que me han brindado.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
II.1. OBJETIVO GENERAL.....	3
II.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	3
III. HIPÓTESIS.....	4
IV. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	5
IV.1. Botánica de la planta de <i>Theobroma cacao</i> L.....	5
IV.2. Descripción de <i>Theobroma cacao</i> L.....	5
IV.3. Distribución.....	7
IV.4. Diversidad.....	10
IV.5 Proceso de Germinación.....	11
IV.6 Proteasas.....	16
IV.6.1 Importancia de las Proteasas.....	16
IV.6.2 Clasificación de las Proteasas.....	17
IV.7. Purificación de proteínas.....	21
IV.7.1. Estrategia y consideraciones para la purificación de proteínas.....	21
IV.7.2. Etapas en la purificación de proteínas.....	21
IV.8 Estructura, función y propiedades de las Carboxipeptidasas (CP).....	26
IV.9 Carboxipeptidasa de <i>Theobroma cacao</i> L. (tcCP).....	29
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
V.1. Muestreo.....	32
V.2. Condiciones de germinación.....	32
V.3. Preparación de polvos secos de acetona.....	32
V.4. Obtención de extractos enzimáticos.....	33
V.5. Purificación de la enzima de tcCP.....	33
V.5.1. Precipitación con sulfato de amonio.....	33
V.5.2. Diálisis y concentración de proteínas.....	33
V.5.3. Determinación de la actividad enzimática de tcCP.....	34
V.5.4. Determinación de proteína total.....	34
V.5.5. Cromatografía de intercambio iónico.....	34
V.5.6. Determinación del peso molecular mediante SDS-PAGE.....	35

V.6. Caracterización Bioquímica de la Enzima tcCP	36
V.6.1. Determinación de actividad de las exopeptidasas tcAPEy Xaa-Pro-DAP sobre la enzima tcCP purificada.	36
V.6.2. Determinación de actividad de la endopeptidasa aspartil proteínasa (tcAP) sobre la enzima tcCP purificada.	36
V.6.3. Determinación de péptidos liberados por la técnica de Micro-Lowry.....	36
V.6.4. Efecto de inhibidores y agentes reductores sobre la actividad enzimática	37
V.6.5. Efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática.....	37
V.6.6. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima	37
V.6.7. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima tcCP purificada de <i>T. cacao</i> L.....	38
VI. RESULTADOS.....	39
VI.1. Germinación de semillas de <i>T. cacao</i> L.....	39
VI.2. Purificación y caracterización de la enzima tcCP	41
VI.2.1 Purificación de la tcCP.....	41
VI.2.2. Determinación de actividad de las exopeptidasas tcAPE y Xaa-Pro-DAP sobre la enzima tcCP purificada.	44
VI.2.3. Determinación de actividad de la endopeptidasa aspartil proteínasa (tcAP) sobre la enzima tcCP purificada.	44
VI.2.4. Efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática de la fracción de la enzima tcCP purificada.....	46
VI.2.5. Efecto de iones metálicos sobre la actividad tcCP de <i>T. cacao</i> L.	47
VI.2.6. Determinación del peso molecular con Electroforesis en Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE) de la tcCP de <i>T. cacao</i> L.	49
VI.2.7. pH óptimo de la tcCP.....	50
VI.2.8. Temperatura óptima de la tcCP.....	51
VIII. CONCLUSIONES.....	56
IX. LITERATURA CITADA	57
X. ANEXOS	69

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Producción mundial de cacao	8
Cuadro 2. Subdivisión de carboxipeptidasas y endopeptidasas de acuerdo al tipo catalítico (Tomado de Barret, 1994).	19
Cuadro 3. Familias de enzimas proteolíticas (Tomada de Neurath, 1989).	20
Cuadro 4. Purificación de tcCP de la semilla de cacao (<i>Theobroma cacao L.</i>)	42
Cuadro 5. Actividad de las exopeptidasas tcAPE y Xaa-Pro-DAP en la fracción de la enzima ctCP purificada frente a diferentes sustratos	45
Cuadro 6. Actividad de la endopeptidasa tcAP en la fracción de la enzima ctCP purificada frente al sustrato BSA.	45
Cuadro 7. Efecto de los inhibidores y/o activadores de peptidasas sobre la actividad de tcCP de <i>Theobroma cacao L.</i>	46
Cuadro 8. Efecto de iones metálicos sobre la actividad de tcCP en <i>Theobroma cacao L.</i>	48

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. *Theobroma cacao* L. a) Árbol de cacao, b) Flor de cacao, c) Mazorca madura, d) semillas de cacao, mostrando el mucilago que las cubre. 6
- Figura 2. Principales regiones del mundo que producen *T. cacao* L. (UNCTAD 2005) 9
- Figura 3. Germinación de las semillas dicotiledóneas, a) Cotiledón, b) Diferentes estadios de la germinación (Merriam-Webster, Inc. 2006)..... 12
- Figura 4. Tiempo en curso de los principales eventos asociados con la germinación de la semilla y crecimiento de la plántula. La absorción del agua por la semilla seca, quiescente es mostrada en tres fases; inicialmente rápida (fase I) seguido de una meseta (fase II), seguido por un elevación, coincidente con el inicio del crecimiento de la plántula (fase III). El tiempo para que los eventos sean completados varia de horas a muchas semanas, dependiendo de la especie de la planta y de las condiciones de germinación. La velocidad de la respiración es generalmente paralela a la velocidad de la absorción del agua (Bewley, 1997)..... 15
- Figura 5. Clasificación de peptidasas de acuerdo al tipo de reacción catalizada. Los péptidos son representados por círculos sobre una línea, cada círculo representa un aminoácido y las líneas los enlaces peptídicos. N-("NH₂") y C- ("COOH") representan el extremo terminal. Las flechas negras muestran la primera separación y las flechas blancas muestran las separaciones subsecuentes. Para la primera separación, el(los) aminoácido(s) al cual la especificidad es principalmente dirigida son mostrados con el círculo negro y para las separaciones subsecuentes son mostrados con el círculo gris. El triangulo negro indica el aminoácido terminal bloqueado, sustratos de algunas peptidasas omegas. (Tomado de Rewlings *et al.*, 2007)..... 18
- Figura 6. Tipos de intercambiadores iónicos. Para un intercambio aniónico (A), la matriz del gel está cargada positivamente, con iones opuestos cargados negativamente (aniones) en la solución. Estos aniones están cargados reversiblemente con otros aniones en el proceso de cromatografía de intercambio iónico. Para intercambio catiónico (B), la matriz del gel está cargada negativamente, con iones opuestos cargados positivamente (cationes) en la solución (Staton, 2004)..... 23
- Figura 7. Curva de titulación genérica para proteínas. En solución, los grupos cargados sobre las proteínas son ionizados, y el grado de ionización es dependiente del pH de la solución. A un pH particular conocido como el punto isoeléctrico (*pI*), la carga total positiva sobre la proteína es equivalente a la carga total negativa, por lo tanto, la carga *neta* de la proteína es cero. A pH's mas ácidos que el *pI*, la carga neta de la proteína es positiva como los grupos carboxilo y otros grupos ácidos que están protonados y los grupos amino que están ionizados. Bajo estas condiciones, un intercambiador iónico cargado negativamente (intercambio catiónico), debe ser usado. Viceversa, a pH's más básicos que el *pI*, la carga neta de la proteína es negativa, y un intercambiador iónico cargado positivamente (intercambio aniónico) debe ser empleado (Staton, 2004). 25
- Figura 8. Carboxipeptidasa II. La estructura de la carboxipeptidasa II del trigo (derecha) se ilustra con sus dos cadenas (azul y roja). La tríada catalítica de la carboxipeptidasa II (izquierda) se compone de los mismos aminoácidos que la químotripsina, a pesar de que las enzimas no manifiestan ninguna similitud estructural. Los residuos que conforman la cavidad del oxianión están señalados en amarillo (Tomado de Strayer *et al.*, 2004). 29

Figura 9. Germinación de semillas de cacao. a) y b) Semillas desprovistas de mucílago en la primera etapa (1-3 días); c) Semillas en la segunda etapa del proceso de germinación (Días 4-7); d) y e) Semillas en la tercera etapa del proceso de germinación (Días 8-15).....	40
Figura 10. Purificación de la tcCP de semillas de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L) germinadas. Las proteínas fueron detectadas por medición de la absorbencia a 280 nm (línea roja); la actividad de tcCP fue ensayada contra Bz-Tyr-pNA, a pH 7.0 (línea azul); cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharosa con gradiente de NaCl (línea verde punteada).....	43
Figura 11. Análisis electroforético de las fracciones activas de la tcCP de <i>Theobroma cacao</i> 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 40%; L4, cromatografía de intercambio iónico realizada en la Columna XK 16/20 empacada con Q-Sepharosa.....	49
Figura 12. Efecto del pH sobre la actividad de tcCP purificada a partir de <i>Theobroma cacao</i> L., sobre el substrato Bz-Tyr-pNA. La actividad de tcCP fue determinada a pH 4.0-5.0 con regulador de acetato de sodio 0.1 M con 1% de Tritón X-100 (Línea roja), 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 azul) a 37 °C.....	50
Figura 13. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la serina carboxipeptidasa de <i>Theobroma cacao</i> L., sobre el substrato Bz-Tyr-pNA. La actividad fue medida a 30-60°C y pH 7.0.....	51

ABREVIATURAS

% w/v: Porcentaje peso volumen.

%: Porcentaje.

(NH₄)₂SO₄: Sulfato de amonio.

> 1 M: Mayor a uno molar.

°C: Grados centígrados.

1d: Primera dimensión.

3D: Tercera dimensión.

7S: Clasificación de globulinas

ADN: Ácido desoxiribunucleico.

APE: Aminopeptidasa

Ba (OH)₂: Hidróxido de bario.

BSA: Albúmina Sérica Bovina

Bz-Tyr-*p*NA: *N*-benzoil-*L*-tirosina-*p*-nitroanilida.

Ca⁺²: Ion calcio.

CP: Carboxipeptidasa

CP's: Las carboxipeptidasas

CuSO₄ 5 H₂O: Sulfato de cobre penta hidratado.

DFP: Diisopropil fluorofosfato

EC 3.4.13: Dipeptidasa.

EC 3.4.14: Aminopeptidasas.

EC 3.4.16-3.4.18: Carboxipeptidasas.

EC 3.4.19: Omega peptidasa.

EC: Comisión de Enzimas.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

HIC: Cromatografía de interacción hidrofóbica.

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

IEX: Cromatografía de intercambio iónico.

kDa: kilo Dalton

Kg: Kilogramos.

Leu-*p*NA: Leucina-*p*-nitroanilida.

Lys-pNA: Lisina-p-nitroanilida.

Mg⁺²: Magnesio.

ml/g: Mililitro por gramo.

mM: Mili molar.

Mt: Metros.

Na₂CO₃: Carbonato de sodio.

NaOH: Hidroxido de sodio.

N-CBZ-Ala-Leu: N-carbobenzoxi-Alanina-Leucina

N-CBZ-Ala-Met: N-carbobenzoxi-Alanina-Metionina

N-CBZ-Ala-Phe: N-carbobenzoxi-Alanina-Felilalanina

pI: Punto isoeléctrico.

PA7 genotipo alto sabor y aroma.

PDA: Polvos secos de acetona.

pH: Potencial hidrogeno.

PMSF: Fenil metil sulfonil fluoruro.

PVPP: Polivinilpolipirrolidona.

QSP1: Pico 1 Q-Sepharosa.

QSP2: Pico 2 Q-Sepharosa.

QSP3: Pico 3 Q-Sepharosa.

QSP4: Pico 4 Q-Sepharosa.

S1 y S1': Sitio activo contiene serina.

SCP's: Serinas carboxipeptidasas.

SDS: Dodecil sulfato de sodio.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

tcCP: Carboxipeptidasa de *Theobroma cacao* L.

UAE/mg: Unidad de actividad específica sobre miligramo de proteína total.

UAE: Unidad de actividad enzimática.

VCG: Vicilina Clase Globulina.

Xaa-Pro-DAP: Xaa-prolil dipeptidil aminopeptidasa.

XK 16/20 GE: Columna de intercambio iónico.

Zinc⁺²: Zinc.

ZnSO_4 : Sulfato de zinc

λ : Longitud de onda.

α : Alfa.

I. INTRODUCCIÓN

Las enzimas proteolíticas están involucradas en muchos aspectos en la fisiología y desarrollo de las plantas. Por otro lado, son necesarias para el recambio proteico. La degradación de proteínas dañadas, mal plegadas y potencialmente peligrosas, proporciona los aminoácidos libres requeridos para la síntesis de nuevas proteínas. Además, la ruptura selectiva de las proteínas regulatorias por la vía ubiquitina/proteasoma controla aspectos claves del crecimiento de las plantas, desarrollo, y defensa. Las proteasas también son responsables de la modificación post-traducciona l de proteínas a través de la proteólisis limitada en sitios altamente específicos. La proteólisis limitada resulta en la maduración de enzimas, y es necesaria para el ensamble de proteínas y el blanco subcelular, controla la actividad de las enzimas, proteínas regulatorias y péptidos. Las proteasas están por lo tanto, involucradas en todos los aspectos del ciclo de vida de la planta, desde la movilización de las proteínas de almacenamiento durante la germinación de la semilla hasta la iniciación de la muerte celular y senescencia programada (Müntz *et al.*, 2001; Schaller, 2004). Las proteínas de almacenamiento de las semillas fueron inicialmente clasificadas por Osborne (1924), de acuerdo a su solubilidad, en albuminas (soluble en agua), globulinas (soluble en sales), prolaminas (soluble en alcohol) y glutelinas (soluble en ácido o álcali). Durante el período de germinación de la semilla, las proteínas de almacenamiento son degradadas por una variedad de proteasas, las cuales convierten a las proteínas de almacenamiento insolubles en péptidos solubles, mismos que son hidrolizados a aminoácidos libres. Estos aminoácidos son movilizados al eje embrionario para soportar su crecimiento y también para proporcionar energía (Bewley y Black 1994; Shutov y Vaintraub, 1987; Muntz *et al.*, 2001). La movilización de los alimentos de reserva y su regulación durante la germinación en las semillas dicotiledóneas, ha recibido atención y se han sugerido dos hipótesis para explicar el papel del eje embrionario en el proceso (David y Slack, 1981; Bewley y Black, 1994; Nandi *et al.*, 1995; Muntz *et al.*, 2001).

La semilla de cacao contienen dos proteínas de almacenamiento de los tipos albumina y globulina (Biehl *et al.*, 1982). La globulina con dos polipéptidos de 47 y 31 kDa (Pettipher, 1990; Spencer y Hodge, 1992; Voigt *et al.*, 1993), es degradada en la

fermentación, la albumina (21kDa) no es degradada. Los precursores del aroma específico del cacao pueden ser generados in vitro a partir de la globulina clase vicilina de los granos en fracciones parcialmente purificadas mediante las actividades de la endoproteasa aspártica y carboxipeptidasa (Voigt *et al.*, 1994a). La degradación de las proteínas de los cotiledones en péptidos y aminoácidos libres, es primordial para la formación del sabor y aroma. El consenso es que la acción combinada de las dos proteasas, principalmente endoproteasa aspártica y la serina carboxi-(exo) peptidasa sobre el polipéptido globulina clase vicilina (7S) (VCG) almacenado, generan los precursores específicos del sabor y aroma del cacao en presencia de azúcares reductores. La endoproteasa aspártica (EC 3.4.23) hidroliza enlaces peptídicos en VCG en residuos de aminoácidos hidrofóbicos, formando sustratos oligopéptidos hidrofóbicos para la serina exopeptidasa (EC 3.4.16.1) que remueve residuos de aminoácidos hidrofóbicos en el extremo carboxilo terminal (Biehl *et al.*, 1993; Voigt *et al.*, 1994a; Biehl *et al.*, 1996; Biehl y Voigt, 1999).

Una de las principales clases de actividad proteolítica encontrada en la semilla de cacao, es la carboxipeptidasa. Las carboxipeptidasas han sido clasificadas como todas aquellas exopeptidasas que degradan polipéptidos a partir del extremo carboxilo terminal. Estas enzimas juegan un papel muy importante en la asimilación de aminoácidos como fuente de nitrógeno en hongos, y en la degradación de proteínas de almacenamiento durante la germinación de las semillas y en el intercambio de proteína celular (Muntz *et al.*, 2001). En las semillas, las carboxipeptidasas están localizadas en los cuerpos proteicos de los cotiledones (Shutov *et al.*, 1984; Nishimura y Beevers, 1978; Wilden *et al.*, 1980) y en el endospermo almidonado de los cereales en germinación (Kruger y Preston, 1977; Feller *et al.*, 1978; Doi *et al.*, 1980; Mikola, 1983). Aunque las Carboxipeptidasas han sido aisladas, purificadas y caracterizadas en diversas plantas, animales y hongos, en *Theobroma cacao* L., no se tiene reportes de la purificación de esta enzima, por lo que en la presente investigación se describe la purificación y caracterización bioquímica de la carboxipeptidasa de la semilla de *T. cacao* L., durante el proceso de germinación.

II. OBJETIVOS

II.1. OBJETIVO GENERAL

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

II.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- II.2.1. Obtener extractos enzimáticos de la semilla de cacao germinado y obtener la fracción proteica mediante precipitación fraccionada.
- II.2.2. Identificar la actividad enzimática de carboxipeptidasa (tcCP) en el extracto enzimático obtenido de la semilla de cacao germinado.
- II.2.3. Purificar la enzima con actividad enzimática de carboxipeptidasa (tcCP) identificada durante el proceso de germinación de la semilla de cacao (*Theobroma cacao* L).
- II.2.4. Determinar el peso molecular de la tcCP purificada, para su caracterización bioquímica.
- II.2.5. Determinar del efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de la enzima purificada para su caracterización bioquímica.
- II.2.6. Probar el efecto de diferentes inhibidores específicos de proteasas sobre la actividad de la enzima tcCP purificada.
- II.2.7. Probar el efecto de diferentes cationes específicos de proteasas sobre la actividad de la enzima tcCP purificada.

III. HIPÓTESIS

La actividad de tcCP se expresa durante el proceso de germinación de la semilla de cacao (*Theobroma cacao L.*) y los niveles detectados permitirán aislar, purificar y caracterizar bioquímicamente a la proteína tcCP.

IV. REVISIÓN DE LA LITERATURA

IV.1. Botánica de la planta de *Theobroma cacao* L.

El nombre científico del árbol de cacao es *Theobroma cacao* L., tal como lo cito Linneo en la primera edición de su libro *Species Planterum* publicado en 1753. El género *Theobroma*, ha sido colocado en el orden Malvales y a la familia Esterculiaceae (López Andrade, 1996; Alverson *et al.*, 1999; Baum *et al.*, 2004; Tate *et al.*, 2005). El género *Theobroma* comprende 22 especies, todas originarias de los bosques húmedos tropicales de la América Ecuatorial (Mossu, 1990).

IV.2. Descripción de *Theobroma cacao* L.

Theobroma cacao L. puede describirse generalmente como un árbol que alcanza alturas de 4 a 15 m., raramente hasta 20 m dependiendo del ambiente donde se desarrolle (Figura 1a). Su habito de crecimiento es dimórfico, con brotes ortotrópicos o chupones que tienen hojas en espiral y las ramas plagiotrópicas o en abanico con hojas alternas. Las ramas primarias se forman en un conjunto denominado “molinillo”. Las hojas son enteras 15 a 50 centímetros de longitud y de 4 a 15 centímetros de ancho, con un ápice agudo o subagudo (León, 2000).

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 (López-Andrade *et al.*, 1996; León 2000). La aparición de flores es durante todo el año, pero particularmente en los solsticios, la mayor parte se abortan, las que quedan son las que producen frutos.

Las flores son pequeñas (1 a 1.5 centímetros de diámetro), hermafroditas con cinco sépalos, cinco pétalos, un pistilo y un ovario supero con cinco carpelos (Figura 1b). El ovario puede contener desde 30 a 50 óvulos, acomodados en cinco hileras (Toxopeus, 1985). Contiene diez estambres, cinco estériles (estaminoides) y cinco fértiles (León, 2000).



a



b



c



d

Figura 1. *Theobroma cacao* L. a) Árbol de cacao, b) Flor de cacao, c) Mazorca madura, d) semillas de cacao, mostrando el mucilago que las cubre.

La parte basal de los pétalos forman una copa, por lo que los sacos de polen están ocultos, los granos de polen son muy pequeños y pegajosos. Las flores son típicamente de polinización entomófila donde intervienen principalmente mosquitas del género *Forcypomia* (Toxopeus, 1985).

El fruto es una baya conocida como mazorca, es una drupa grande (Figura 1c) de 10 a 32 cm de largo, sostenida por un pedúnculo fuerte. La forma varía considerablemente de esférica a cilíndrica, con una constricción o “cuello de botella” en el extremo del pedúnculo y el ápice es generalmente agudo; se forma por la unión de los cinco carpelos. La superficie presenta 10 lomos, cinco de los cuales son más elevados que el resto. Su forma ha sido el carácter que ha servido de base para agrupar las poblaciones dentro de la especie. (Toxopeus, 1985; López-Andrade *et al.*, 1996).

Las semillas (dicotiledóneas) se conocen también como “haba”, “grano” o “almendra”, éstas se localizan dentro de la túnica del fruto, están dispuestas en placentaciones axiales e incrustadas en una masa mucilaginosa, desarrollada en las capas externas de la testa (Figura 1d). El contenido de semillas por mazorca es de 30 a 40, y puede llegar hasta 70, son planas o redondeadas de color blanco, café o morado, de sabor dulce o amargo. El embrión está rodeado por una membrana delgada de endospermo. (Toxopeus, 1985, López-Andrade *et al.*, 1996).

Los cotiledones, que forman la mayor parte de la semilla, son plano-convexo e irregularmente plegado; cada uno tiene en su cara plana tres grandes surcos. Tanto la testa como la almendra son de color pardo rojizo que varía en diversas variedades comerciales, contienen altas concentraciones de grasa (López-Andrade *et al.*, 1996).

IV.3. Distribución

El cacao se cultiva principalmente entre los 20° latitud norte y 20° latitud sur. Sin embargo, las mejores plantaciones están localizadas entre 10° latitud norte y 10° latitud sur. En América el cacao se cultiva desde el sur de México hasta Brasil y Bolivia (Ochse *et al.*, 1974). La distribución natural del cacao en Sudamérica alcanza hasta los 15° latitud sur, en los ríos Alto Beni y Mamoré del territorio boliviano y por el norte hasta cerca de los 10° latitud en los límites de los llanos venezolanos por las vertientes bajas de las sierras de Parimá, que dividen a Venezuela de Brasil (Soria, 1970). Los

agricultores Mayas fueron los primeros en cultivar el cacao en América Central y en especial en México (Motamayor *et al.*, 2002).

Actualmente, el cacao es cultivado en 6.9 millones de hectáreas distribuidas en todo el mundo con una productividad anual de 3.9 tonelada métrica (Mt, 1 000 kg) (FAOSTAT 2006). Cerca de la mitad del consumo mundial del cacao comercial lo abastece Côte d'Ivoire (39%), Ghana (19%), e Indonesia (13%) (UNCTAD 2005) (Cuadro 1). Brasil, Camerún, Ecuador, Madagascar, Nigeria, Sri Lanka y Venezuela exportan cantidades significativas de cacao. Es también cultivado para exportar en Colombia, República del Congo, República Democrática del Congo, Costa Rica, Cuba, República Dominicana, Fiji, Gabón, Granada, Haití, Jamaica, Malasia, Sureste de México, Panamá, Papúa Nueva Guinea, Perú, Las Filipinas, São Tomé, Sierra Leona, Togo, Trinidad y Samoa occidental (Soberanis *et al.*, 2001, Duguma *et al.*, 2001; Kraus y Soberanis, 2001, Ramírez *et al.*, 2001) (Figura 2).

Cuadro 1. Producción mundial de cacao

País	Producción en toneladas métricas		
	2002/2003	2003/2004	2004/2005
Côte d'Ivoire	1,367	1,567	1,331
Gana	498	605	570
Indonesia	413	460	470
Nigeria	178	175	190
Camerún	152	160	178
Brasil	163	163	171
Ecuador	87	119	110
Malasia	21	25	26
América	172	170	162
África	39	44	45
Asia	64	62	71
Total	4,154	3,530	3,314



Figura 2. Principales regiones del mundo que producen *T. cacao* L. (UNCTAD 2005)

En México, el cacao se cultiva en 83,136 hectáreas, en el Estado de Tabasco se extiende en 60,104 hectáreas, Chiapas aporta 22,577 hectáreas mientras que Guerrero y Oaxaca solo aportan los 395 hectáreas restantes. Durante el año 2001, la producción de cacao en Tabasco fue de 33,791 toneladas, y Chiapas contribuyó con 12,687 toneladas, además de Guerrero y Oaxaca con 260 toneladas. En total se obtuvo una producción nacional en el año 2001 de 46,738 toneladas. De este cultivo dependen 39,421 productores que cultivan parcelas con una superficie promedio de 2.1 hectáreas. La producción se distribuye en seis regiones agrícolas. En Tabasco se distribuye en la región Chontalpa (96%) y la Sierra (4%). La región de la Chontalpa comprende los municipios de Comalcalco, Cunduacán, Huimanguillo, Paraíso, Cárdenas, Nacajuca y Jalpa de Méndez. En el Estado de Chiapas se identifican las regiones; Soconusco (56.8%), Norte (35.2%), la región Selva-Palenque (5.4%) y la región Centro-Tecpatán, con 2.6% de la superficie cultivada (López-Andrade *et al.*, 1996).

IV.4. Diversidad

Los árboles de cacao tienden a ser agrupados por tradición en tres grupos principales llamados Criollo, Forastero y Trinitario; de los cuales muchos híbridos han sido y continúan siendo desarrollados (ITC, 2001).

La diversidad es más evidente en caracteres del fruto como la forma, relieve de la superficie y color; así como la forma de la semilla y el color de los cotiledones y en menor grado en caracteres del porte, follaje y flores. Menos visibles pero de gran importancia económica son las diferencias de susceptibilidad a enfermedades fúngicas (León, 2000).

Los cacaos Criollo son árboles esbeltos que se caracterizan por tener frutos alargados, mazorcas de color rojo o amarillo en la madurez y los cotiledones frescos son de color blanco o violeta pálido. Requieren de un periodo corto para fermentar (2 a 3 días), poseen excelente sabor y aroma, por lo que se les designa comercialmente como “cacao fino”. Este grupo se cultivo primeramente en Mesoamérica donde ya son muy raros, luego en Sudamérica, se cruzaron poblaciones forasteras, dando origen al grupo Trinitario (León, 2000). Se ha reportado que los cacaos Criollos son extremadamente susceptibles a las enfermedades, especialmente a *Phytophthora spp* y *Ceratocystis* y no sobreviven a ataques persistentes de plagas (Toxopeus, 1985).

Los cacaos Trinitarios no son encontrados en estado silvestre, son descendientes de cruces entre los criollos y poblaciones locales de forasteros. La mayor parte de América del Sur está ocupada por esta variedad. Las poblaciones de trinitarios tienen características de mazorca y semilla usualmente variables debido a los caracteres altamente contrastantes de sus ancestros (León, 2000; Toxopeus, 1985).

Los cacaos Forasteros son un gran grupo que comprende tipos cultivados, semicultivados y silvestres, se cree que tienen su origen en la Amazonía. Las variedades de Forastero son por mucho las que producen el mayor tonelaje de semilla cosechada, de las cuales las poblaciones de Amelonado son las más cultivadas (León, 2000; Toxopeus, 1985). Actualmente la mayoría de los árboles plantados de Forastero son híbridos, ya sea entre variedades de Forastero o una mezcla entre Criollo y Forastero. Estos híbridos son preferidos debido a la mayor resistencia a las enfermedades conocidas y a que tienen una mayor producción (ITC, 2001). En México

los genotipos predominantes se clasifican como *Complejo Genético Trinitario* por ser producto de la hibridación natural de los criollos, nativos y forasteros (FNC, 2003). El cultivo de cacao en el Estado de Tabasco en su mayoría es trinitario mexicano, una cruce entre criollo y forastero. A nivel internacional, los criollos son el grupo de cacao más apreciado por su calidad aromática, de los cuales en Tabasco la existencia para producción es prácticamente nula.

IV.5 Proceso de Germinación

El proceso de germinación se define como la suma de eventos que inicia con la absorción de agua por la semilla seca (imbibición) y terminan con la elongación del eje embrionario (usualmente la radícula) del saco de la semilla. (Bewley y Black, 1994).

La semilla de cacao posee un tipo de germinación epigea (Figura. 3), 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 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.*, 1996).

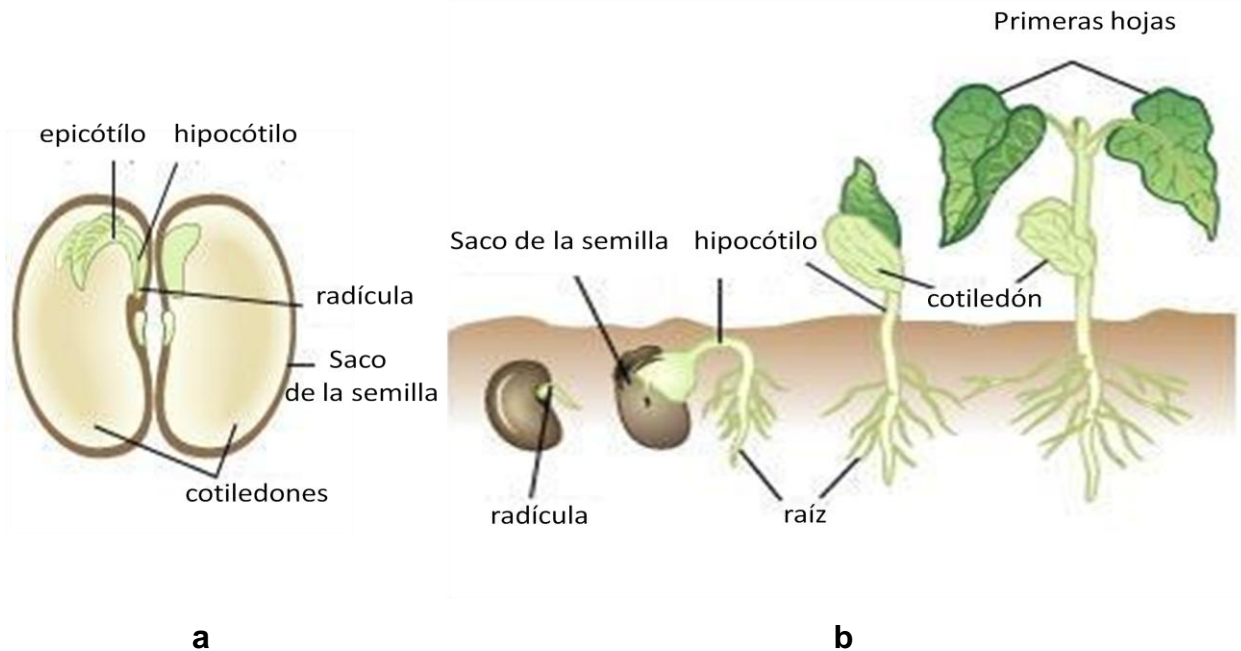


Figura 3. Germinación de las semillas dicotiledóneas, a) Cotiledón, b) Diferentes estadios de la germinación (Merriam-Webster, Inc. 2006).

El proceso de germinación de las semillas se divide en 3 fases (Figura. 4) (Srivastava 2002; Herrera 2006; Bentsink y Koornneef, 2008):

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.

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.

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 enérgica, 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.

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.

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 *et al.*, 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, 1997).

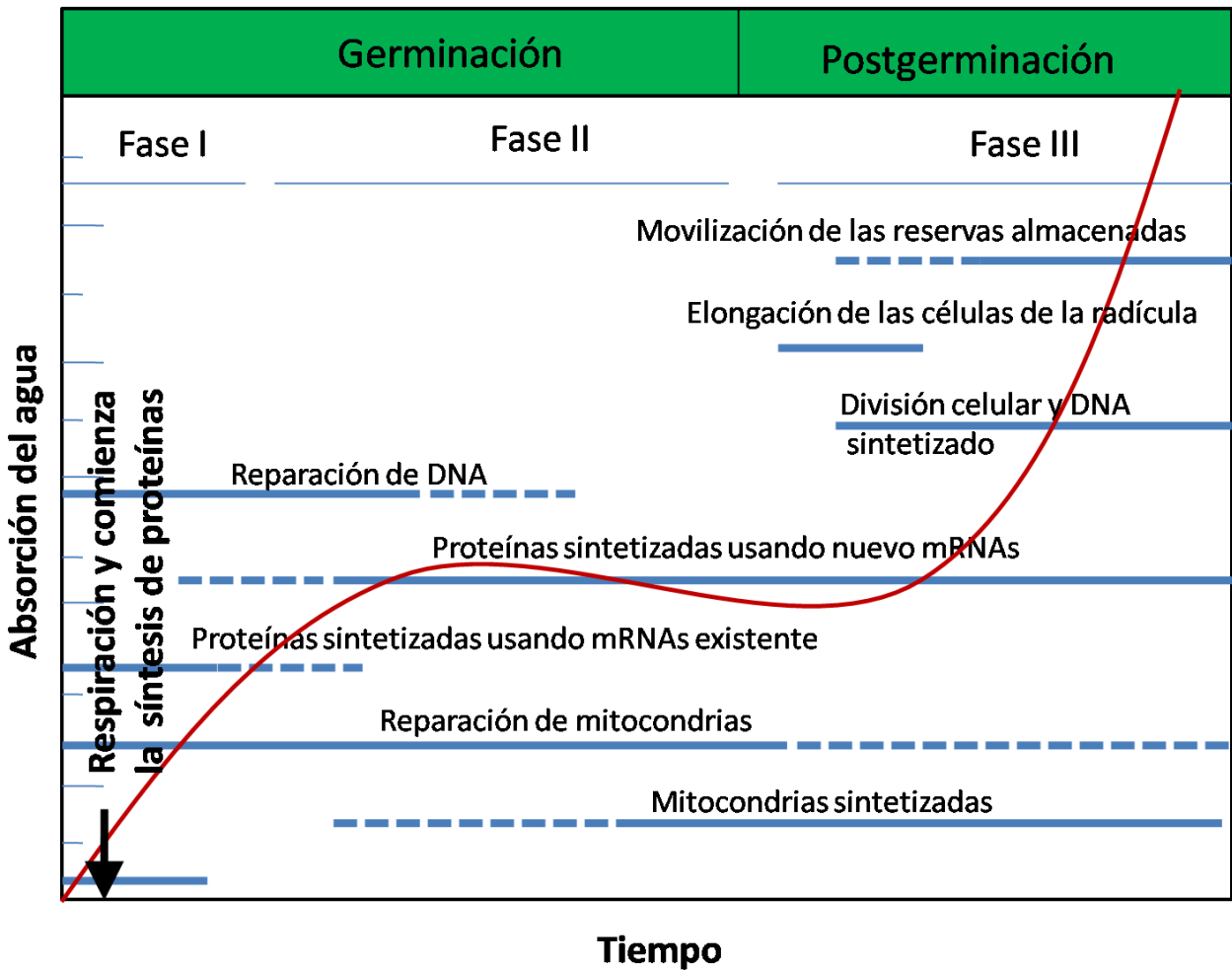


Figura 4. Tiempo en curso de los principales eventos asociados con la germinación de la semilla y crecimiento de la plántula. La absorción del agua por la semilla seca, quiescente es mostrada en tres fases; inicialmente rápida (fase I) seguido de una meseta (fase II), seguido por un elevación, coincidente con el inicio del crecimiento de la plántula (fase III). El tiempo para que los eventos sean completados varía de horas a muchas semanas, dependiendo de la especie de la planta y de las condiciones de germinación. La velocidad de la respiración es generalmente paralela a la velocidad de la absorción del agua (Bewley, 1997).

IV.6 Proteasas

Las enzimas proteolíticas, también denominadas, proteinasas, proteasas o peptidasas, son hidrolasas cuyos sustratos son proteínas o péptidos de variada jerarquía, a los que en algunos casos pueden degradar hasta sus unidades constitutivas, los aminoácidos (Buttazzoni y Caffini, 1982).

Peptidasa es el término utilizado 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. (Figura 5) (Barret, 1994).

IV.6.1 Importancia de las Proteasas

Las enzimas proteolíticas juegan un papel central en varios mecanismos bioquímicos y son usadas en diferentes objetivos tanto in vitro como in vivo. Comercialmente, son extremadamente importantes, más del 60% del total de enzimas marcadas están hechas de proteasas; son aisladas de plantas, animales, bacterias y hongos. En años recientes, las enzimas proteolíticas de plantas han recibido atención especial debido a su amplia especificidad de sustrato, activa en un amplio rango de pH, temperatura, y en la presencia de compuestos orgánicos así como otros aditivos (Barret *et al.*, 1998; Schaller 2004; Van der Hoorn 2008).

Por otra parte, las enzimas proteolíticas son el grupo más importante de la industria alimentaria (Caffini *et al.*, 1988; Whitaker, 1994), por lo que la investigación de las enzimas y su uso en alimentos ha tenido un gran desarrollo desde sus orígenes, con los trabajos de Pasteur y Liebig (Mullally *et al.*, 1995). Durante los últimos años, su utilidad en gran cantidad de industrias ha adquirido mayor importancia industrial y comercial a escala internacional (Haard *et al.*, 2000; Montes y Magaña, 2002). Casi la mitad de las enzimas industriales son proteasas y se utilizan en los detergentes, en procesos de ablandamiento de pieles, en la manufactura de quesos, industria vinícola y fabricación de sedas; para producir hidrolizados de proteínas y para modificar las propiedades funcionales de las proteínas (Mullally *et al.*, 1995); a la vez tienen aplicaciones muy importantes en el área médica como la producción de fármacos anti-inflamatorios, disolución de coágulos sanguíneos, activación de hormonas entre otras, y en el control

de calidad o desarrollo de nuevos productos las enzimas se usan como herramientas en diversas técnicas analíticas (Schwimmwer, 1995).

IV.6.2 Clasificación de las Proteasas

A la fecha se utilizan tres criterios principales para la clasificación de las proteasas (Rawlings y Barret 1993; Barret, 1994):

- 1) La reacción que catalizan,
- 2) La naturaleza química del sitio catalítico y
- 3) La relación evolutiva revelada por su estructura 3D.

De acuerdo al tipo de reacción que catalizan, la Unión Internacional de Bioquímica las clasifica en exopeptidasas (aminopeptidasas EC 3.4.14, carboxipeptidasas EC 3.4.16-3.4.18, dipeptidasa EC 3.4.13, Omega peptidasa EC 3.4.19) y endopeptidasas (Figura 5) (Barret, 1994). Las exopeptidasas atacan únicamente a los extremos cercanos. Aquellas que atacan un extremo amino libre, liberan un solo residuo de aminoácido, un dipéptido o un tripéptido (aminopeptidasas, dipeptidil-peptidasas, tripeptidil-peptidasas, respectivamente). Las exopeptidasas que atacan los extremos carboxilos libres, liberan un solo residuo o un dipéptido (carboxipeptidasas y peptidil-dipeptidasas, respectivamente) de las cadena polipeptídicas. Otras exopeptidasas son específicas para dipéptidos (dipeptidasas), o remueven residuos terminales que son substituidos, ciclizados o unidos por enlaces isopeptídicos, tal es el caso de las Omega peptidasas, las cuales actúan sobre los extremos de substratos en los que el grupo amino o carboxilo terminal está bloqueado o donde la unión no es α -peptídica (casos en los que la unión peptídica terminal involucra al grupo ω -carboxilo de los ácidos glutámico o aspártico o al grupo ϵ -amino de lisina). Las endopeptidasas atacan preferentemente en las regiones internas de las cadenas peptídicas, lejos del extremo, y la presencia de grupos α -amino o α -carboxilo libre tiene un efecto negativo sobre la actividad de la enzima (Caffini *et al.*, 1988; Barret, 1994).

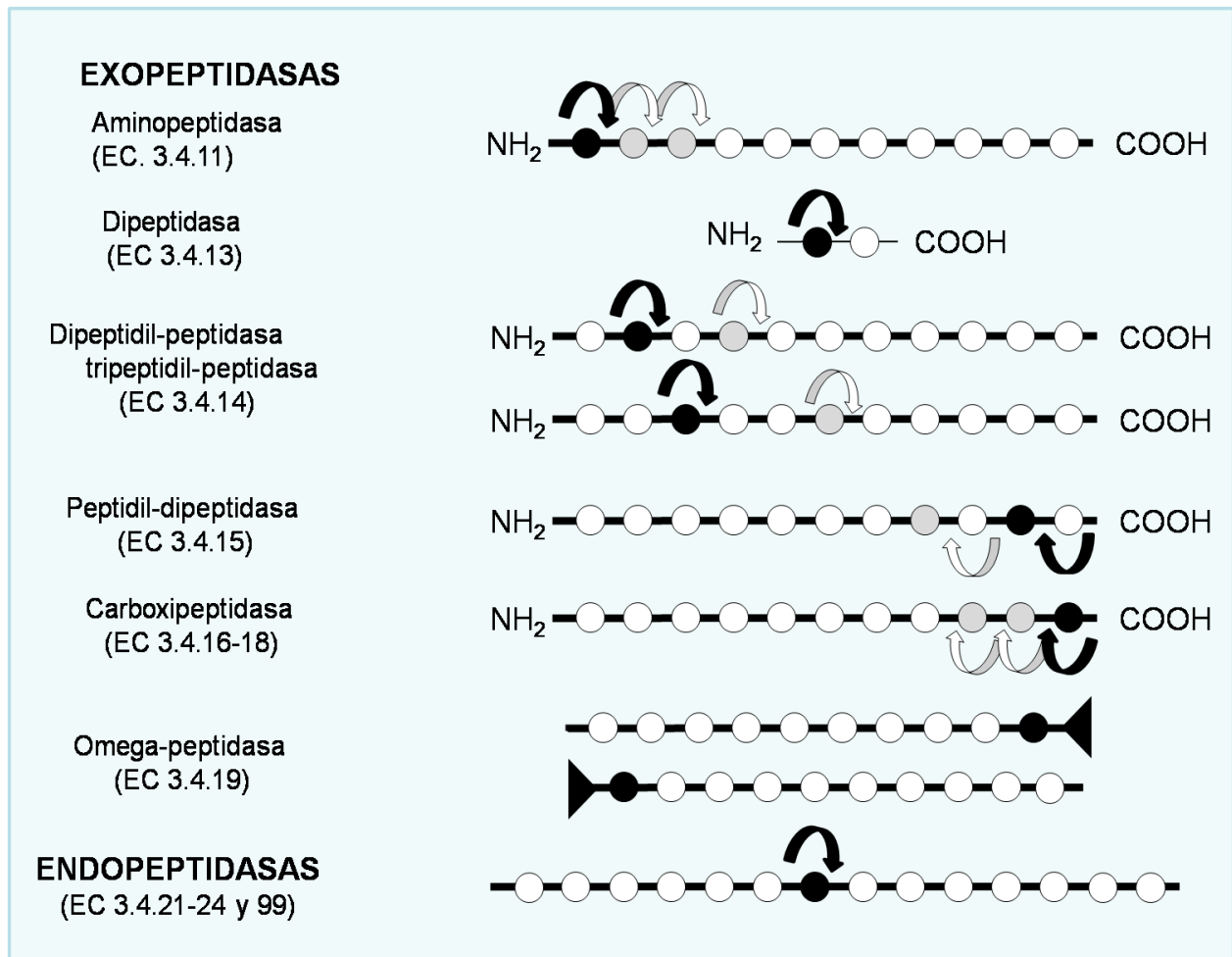


Figura 5. Clasificación de peptidasas de acuerdo al tipo de reacción catalizada. Los péptidos son representados por círculos sobre una línea, cada círculo representa un aminoácido y las líneas los enlaces peptídicos. N-("NH₂") y C- ("COOH") representan el extremo terminal. Las flechas negras muestran la primera separación y las flechas blancas muestran las separaciones subsiguientes. Para la primera separación, el(los) aminoácido(s) al cual la especificidad es principalmente dirigida son mostrados con el círculo negro y para las separaciones subsiguientes son mostrados con el círculo gris. El triángulo negro indica el aminoácido terminal bloqueado, sustratos de algunas peptidasas omegas. (Tomado de Rewlings *et al.*, 2007).

De acuerdo al tipo catalítico las carboxipeptidasas y endopeptidasas, son divididas en sub-subclases (Cuadro 2). Las peptidasas tipo serinas (EC 3.4.16) tienen una serina como centro activo involucrado en el proceso catalítico, así como una histidina y un ácido aspártico, las peptidasas tipo cisteínicas (3.4.18) se caracterizan por tener un residuo de cisteína en el centro activo y las metalopeptidasas (EC 3.4.17) poseen un residuo de ácido glutámico en el sitio activo y requieren un catión divalente como el zinc (Zn^{+2}), calcio (Ca^{+2}) o magnesio (Mg^{+2}) para catalizar la hidrólisis del enlace peptídico. Por otra parte, las endopeptidasas tipo aspárticas (EC 3.4.23) dependen de dos residuos de ácido aspártico para su actividad catalítica y presentan una máxima actividad a pH ácido. Los miembros de cada familia se cree que descienden de un ancestro en común por evolución divergente (Polgár, 1987; Neurath, 1989;) (Cuadro 2). A la fecha todavía no se le ha asignado un número de endopeptidasas a cualquiera de las sub-subclases EC 3.4.21.-24, las cuales a su vez forman sub-subclases EC 3.4.99 de la lista de enzimas (García-Carreño, 1992; Barret, 1994).

Cuadro 2. Subdivisión de carboxipeptidasas y endopeptidasas de acuerdo al tipo catalítico (Tomado de Barret, 1994).

Grupo de proteasas o peptidasas	EC Sub-subclase
Carboxipeptidasas	
Carboxipeptidasas tipo serina	3.4.16
Metalocarboxipeptidasas	3.4.17
Carboxipeptidasas tipo cisteína	3.4.18
Endopeptidasas	
Serina endopeptidasas	3.4.21
Cisteína endopeptidasas	3.4.22
Aspartil Endopeptidasas	3.4.23
Metaloendopeptidasas	3.4.24
Endopeptidasas de mecanismo catalítico desconocido	3.4.99

^a Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, "Enzyme Nomenclature 1992", Academic Press, Orlando Florida, EUA.

Con relación a su mecanismo catalítico, la Unión Internacional de Bioquímica reconoce cuatro clases mecanísticas y dentro de estas clases, seis familias. Cada familia tiene un grupo de aminoácidos funcionales ordenados en una configuración particular para formar el sitio activo (Cuadro 3) (Beynon y Bond, 1989).

Cuadro 3. Familias de enzimas proteolíticas (Tomada de Neurath, 1989).

Familia	Proteasa representativa	Residuos característicos del sitio activo
Proteasas serínicas I	Quimotripsina Tripsina Elastasa	Asp ¹⁰² , Ser ¹⁹⁵ , His ⁵⁷
Proteasas serínicas II	Subtilisina	Asp ³² , Ser ²²¹ , His ⁶⁴
Proteasas cisteínicas	Papaína Actinidina Catepsina B,H, etc.	Cis ²⁵ , His ¹⁵⁹ , Asp ¹⁵⁸
Proteasas aspárticas	Pepsina Proteasas ácidas Renina	Asp ³³ , Asp ²¹³
Metaloproteasas I	Carboxipeptidasa A	Zn, Glu ²⁷⁰ , Tir ²⁴⁸
Metaloproteasas II	Termolisina	Zn, Glu ¹⁴³ , His ⁶⁴

Nota: Las enzimas representativas están en negritas.

Según su mecanismo químico de catálisis, las proteasas se pueden agrupar en: aquellas que forman complejos covalentes entre la enzima y el sitio de hidrólisis del sustrato (proteasas serínicas y cisteínicas), y las que forman complejos covalentes enzima-sustrato (proteasas aspárticas y metaloproteasas). Esta distinción es de particular importancia debido a que tiene una marcada consecuencia en el mecanismo de inhibición. Las primeras tienen aminoácidos fuertemente nucleofílicos en su sitio catalítico, por consiguiente, sus inhibidores deben poseer grupos altamente

electrofílicos. Las proteasas que forman complejos no covalentes presentan una catálisis general ácido/base por el ataque de una molécula de agua, por lo tanto, los residuos catalíticos carecen de una fuerte nucleofilicidad. Los inhibidores que requiere este segundo grupo deben formar complejos que incluyan más interacciones de enlaces secundarios a lo largo de la hendidura del sitio activo y en los estados análogos de transición (Dunn, 1989).

IV.7. Purificación de proteínas

IV.7.1. Estrategia y consideraciones para la purificación de proteínas

La purificación de una proteína requiere de una estrategia inteligente en la selección y combinación de técnicas basadas en el conocimiento de la proteína de interés. Dado que no existe la “técnica” ni el “esquema de purificación” que permita purificar todo tipo de proteínas, deberá existir un enfoque que permita desarrollar una estrategia de purificación para cada proteína. Se requieren las tres siguientes etapas para desarrollar una estrategia de purificación (Williams, 1995a):

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. Estos requisitos son interdependientes, a mayor conocimiento de ellos, mayor será la probabilidad de desarrollar una estrategia exitosa.

IV.7.2. Etapas 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.
- 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 (Scopes, 1995):

Cromatografía en gel o exclusión molecular: Separación en función del tamaño de las moléculas (Hagel 1997; Williams, 1995b).

Cromatografía de adsorción selectiva: Las proteínas se adsorben en una gran variedad de fases sólidas y la adsorción depende de las propiedades de la molécula, en lo que se basa la selectividad (Williams, 1995b).

Cromatografía de intercambio iónico (IEX). Es la técnica de cromatografía más usada, separa biomoléculas (proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, polinucleótidos, carbohidratos cargados, y polisacáridos) basados sobre las diferencias en 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 que puede ser aniónico o catiónico. La IEX puede ser una técnica cromatográfica altamente selectiva, capaz de resolver, por ejemplo, proteínas que difieren únicamente de un solo grupo cargado. El proceso se basa en la formación de enlaces iónicos entre los grupos cargados sobre las biomoléculas (típicamente, $-NH_3^+$, $=NH_2^+$, $\geq NH^+$, $-COO^-$, PO_4^- , SO_3^{2-}), y un gel de intercambio iónico/que soporta la carga opuesta. Las biomoléculas no enlazadas (por ejemplo moléculas neutras las cuales no llevan carga eléctrica, o moléculas que llevan la misma carga que el soporte de intercambio iónico) son removidas por lavado, y las moléculas enlazadas son recuperadas por elución con un regulador de fuerza iónica más alta y/o pH alterado.

Las ventajas de la IEX son: 1) Alto poder de resolución, 2) las separaciones pueden ser rápidas, 3) en general, las recuperaciones son altas, 4) los componentes de los reguladores no son desnaturizantes y frecuentemente compatibles con posteriores pasos de separación cromatográficos o sistemas de prueba, 5) los procesos pueden ser usados como un paso de concentración, para recuperar proteínas a partir de una solución diluida.

Las desventajas de la IEX son pocas pero incluyen: 1) La muestra debe ser aplicada a un soporte de IEX bajo condiciones de baja fuerza iónica y pH controlado, los cuales algunas veces requiere de un paso extra de intercambio de regulador para ser insertado, 2) la instrumentación cromatografía debe ser resistente a la corrosión inducida por la sal, y 3) la concentración postcromatográfica de las soluciones diluidas de proteínas recuperadas puede resultar en altas concentraciones de sal ($> 1 M$)

inapropiado por ejemplo, en pruebas biológicas, a menos que el regulador de intercambio sea eliminado.

Hay dos tipos básicos de intercambiadores iónicos: 1) Intercambiador aniónico y 2) intercambiador catiónico. El intercambiador aniónico tiene grupos cargados positivamente, los cuales son movilizados dentro de un soporte cromatográfico, por lo tanto se enlazan e intercambian los iones cargados negativamente (aniones) (Figura 6A). Mientras un intercambiador catiónico tiene grupos inmovilizados cargados negativamente, los cuales se enlazan e intercambian los iones cargados positivamente (cationes) (Figura 6B).

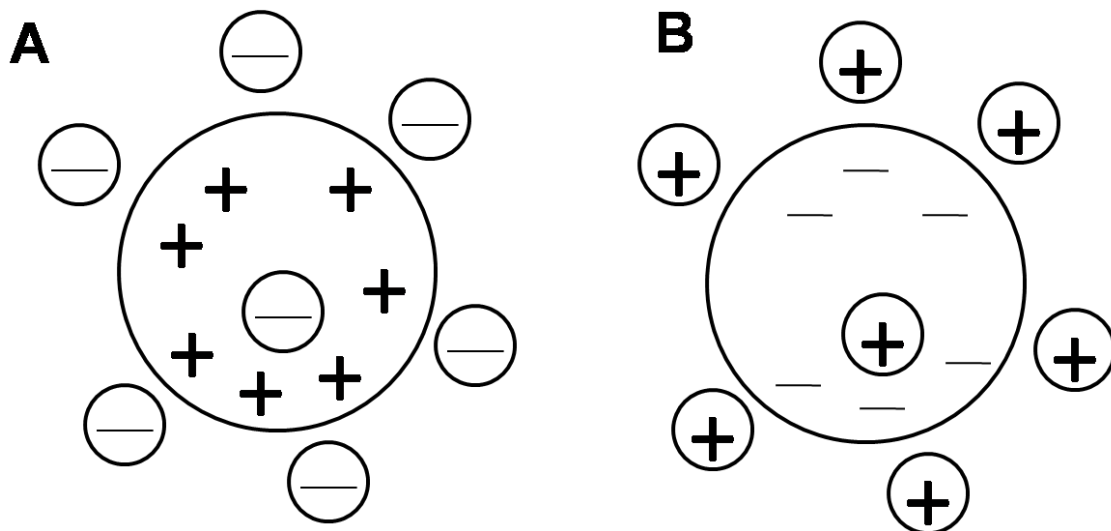


Figura 6. Tipos de intercambiadores iónicos. Para un intercambio aniónico (A), la matriz del gel está cargada positivamente, con iones opuestos cargados negativamente (aniones) en la solución. Estos aniones están cargados reversiblemente con otros aniones en el proceso de cromatografía de intercambio iónico. Para intercambio catiónico (B), la matriz del gel está cargada negativamente, con iones opuestos cargados positivamente (cationes) en la solución (Staton, 2004).

En solución, las proteínas y otras biomoléculas son ionizadas, y el grado de ionización es dependiente del pH de la solución. Para una proteína dada el pH al cual la carga positiva total es igual a la carga negativa total es conocido como el punto isoeléctrico (pI). Por consiguiente, cuando el $pH = pI$, la carga neta total sobre la proteína es cero (Figura 7). A pH's menores al pI , la carga neta total sobre la proteína será positiva, así la proteína debe unirse a una columna de intercambio catiónico. A pH's mas grandes que el pI , la carga neta total sobre la proteína ahora será negativa y la proteína debe unirse a una columna de intercambio aniónico (Figura 7). Como regla, las proteínas con $pI < 6$ (por ejemplo, proteínas ácidas) son cromatografiadas sobre una columna de intercambio aniónico, mientras que las proteínas $pI > 8$ (proteínas básicas) son cromatografiadas sobre columna de intercambio catiónico, y proteínas con pI entre 6 y 8 pueden ser cromatografiadas por cualquiera de los dos tipos de IEX (Williams, 1995b; Staton, 2004).

Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). Es una técnica de separación cromatográfica frecuentemente usada para la purificación de macromoléculas tales como proteínas y polinucleótidos. Se basa en la fuerza de interacción entre las zonas hidrofóbicas de las proteínas con el ligando o grupo hidrofóbico inmovilizado. Los esquemas de purificación frecuentemente son perfeccionados incorporando la cromatografía de interacción hidrofóbica junto con intercambio iónico, exclusión molecular, y afinidad cromatográfica. La HIC ha encontrado un amplio uso para la purificación de proteínas de membranas (Welling *et al.*, 1987), proteínas del suero (Raynes y McAdam, 1988; Wilson *et al.*, 2001), proteínas nucleares, polinucleótidos (Diogo, 2002), receptores (Matsumoto *et al.*, 1987; Muck *et al.*, 1999), células (Krishna *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 2002) y proteínas recombinantes (Wu *et al.*, 1990; Lauer *et al.*, 2000).

La HIC combina las características no desnaturalizantes de la precipitación con sal y la precisión cromatográfica para un excelente beneficio de resolución y recuperación de actividad (Kennedy, 1997; Benedeck, 2004).

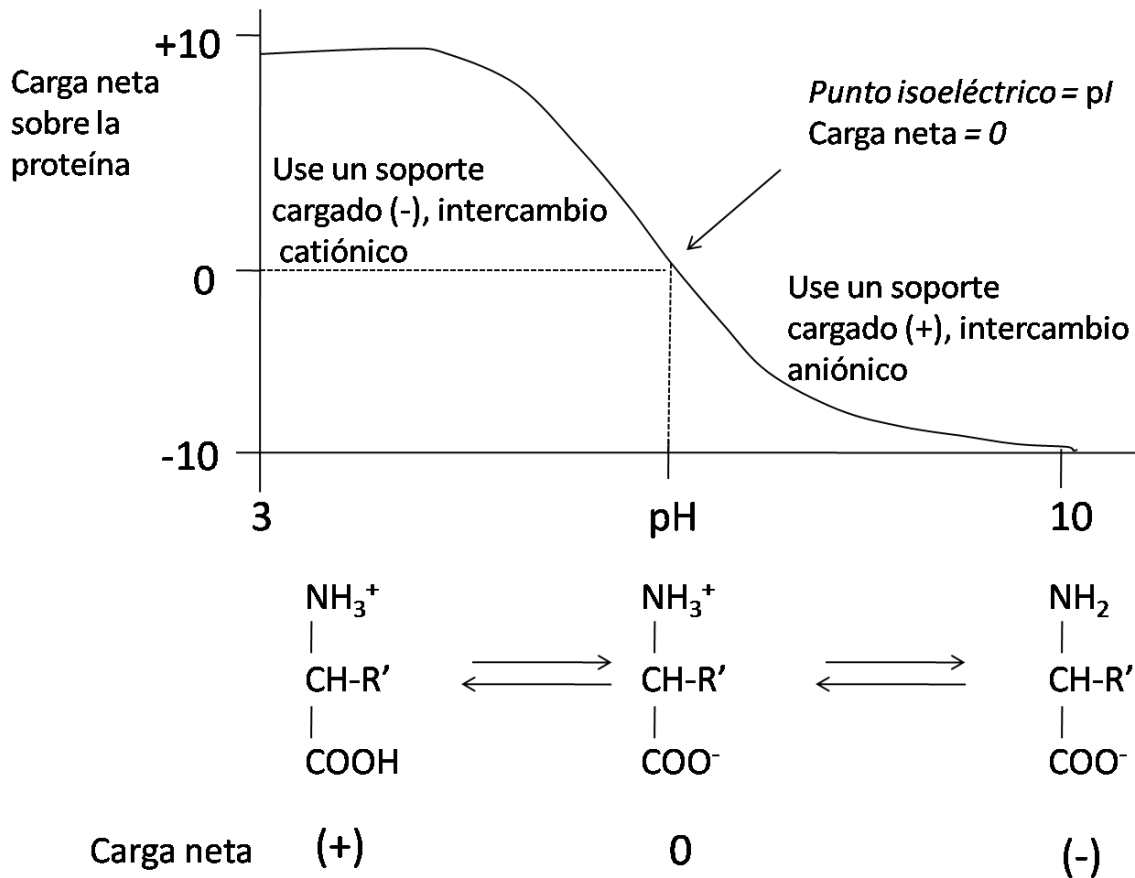


Figura 7. Curva de titulación genérica para proteínas. En solución, los grupos cargados sobre las proteínas son ionizados, y el grado de ionización es dependiente del pH de la solución. A un pH particular conocido como el punto isoeléctrico (*pI*), la carga total positiva sobre la proteína es equivalente a la carga total negativa, por lo tanto, la carga *net*a de la proteína es cero. A pH's más ácidos que el *pI*, la carga *net*a de la proteína es positiva como los grupos carboxilo y otros grupos ácidos que están protonados y los grupos amino que están ionizados. Bajo estas condiciones, un intercambiador iónico cargado negativamente (intercambio catiónico), debe ser usado. Viceversa, a pH's más básicos que el *pI*, la carga *net*a de la proteína es negativa, y un intercambiador iónico cargado positivamente (intercambio aniónico) debe ser empleado (Staton, 2004).

Cromatografía de afinidad. Esta se basa en la interacción receptor-ligando, p.e., enzima-sustrato, enzima-inhibidor, antígeno-anticuerpo etc. El ligando específico se une covalentemente a una matriz inerte y presenta afinidad por la proteína y ambos se unen; después se lava la columna y se provoca la disociación de la proteína del ligando por un cambio de pH, fuerza iónica (Williams, 1995a).

Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC). Permite realizar una cromatografía en tiempos cortos debido a que utiliza alta presión para eluir las proteínas con la fase móvil, prácticamente todos los tipos de cromatografía pueden ser realizados usando equipo que produzca presión alta para eluir las muestras de la columna (Coligan, 1995).

IV.8 Estructura, función y propiedades de las Carboxipeptidasas (CP)

Las carboxipeptidasas (CP's) son proteasas que secuencialmente hidrolizan residuos de aminoácidos a partir del extremo carboxilo terminal de las proteínas sustrato. Estas enzimas juegan un papel muy importante en la asimilación de aminoácidos como fuente de nitrógeno en hongos, y en la degradación de proteínas de almacenamiento durante la germinación de las semillas y en el intercambio de proteína celular (Muntz *et al.*, 2001). En las semillas, las CP's están localizadas en los cuerpos proteicos de los cotiledones (Shutov *et al.*, 1984; Wilden *et al.*, 1980; Nishimura y Beevers, 1978;) y en el endospermo almidonado de los cereales en germinación (Kruger y Preston, 1977; Feller *et al.*, 1978; Doi *et al.*, 1980; Mikola, 1983). En las plantas, las CP's fueron primero detectadas y purificadas a partir de la piel de la naranja (Zuber, 1964). Las CP's son enzimas ubicuas y relativamente abundantes en la mayoría de los tejidos de plantas superiores, incluyendo monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas (Mikola y Mikola, 1980).

Las propiedades comunes de las CP's incluyen valores pH ácidos óptimos, inactivación por diisopropil fluorofosfato (DFP), insensibilidad a agentes quelantes, y capacidad para liberar toda clase de residuos de aminoácidos carboxilo terminal a partir de *N*-dipéptidos sustituidos, péptidos más largos y proteínas (Mikola y Mikola, 1986). Las CP's son usualmente glicoproteínas que están secuestradas en vacuolas de los hongos (Valls *et al.*, 1987), o en lisosomas de animales (Breddam, 1986). En plantas, se demostró que

las CP's están localizadas en vacuolas con base en el fraccionamiento subcelular (Matoba y Doi, 1974; Breddam, 1986, Muntz *et al.*, 2001). Las CP's de plantas parecen característicamente similar a las carboxipeptidasas A, B y C de lisosoma animal (MacDonald y Schwabe, 1977), la carboxipeptidasa acida de la levadura, y la carboxipeptidasa Y (Hayashi, 1976).

Las carboxipeptidasas en plantas llegan a ser del grupo serina carboxipeptidasa (SCP's) (EC 3.14.16.1), y han sido encontradas en granos, frutos y semillas como la cebada, salvado de arroz, salvado de trigo, mungo, tomates y hojas de tomates (Breddam, 1986; Wilson *et al.*, 1995; Mehta *et al.*, 1996; Mehta y Matto, 1996), así mismo son inducidas durante la germinación del algodón, arroz, malta, frijol mungo, trigo (triticale) y cacao (Ihle y Dure, 1972; Preston y Kruger, 1976; Doi *et al.*, 1980; Breddam *et al.*, 1985; Yamaoka *et al.*, 1993; Drzymala y Bielawski, 2009; Sánchez-Mundo *et al.*, 2010a).

Las SCP's son miembros de una familia de proteínas α/β hidrolasas. El sitio activo de estas enzimas contiene una triada catalítica que consiste en Ser-Asp-His. Ellas catalizan la hidrólisis de péptidos, ester y enlaces amidas liberando aminoácidos, alcoholes y grupos amonios a partir del extremo carboxilo terminal de péptidos, ester y amidas respectivamente (Breddam, 1986; Bech y Breddam, 1989; Liao y Remington, 1990; Liao *et al.*, 1992; Ollis *et al.*, 1992; Endrizzi *et al.*, 1994).

En 1983 y 1986, Mikola aisló y caracterizo parcialmente las carboxipeptidasas de los granos de cebada y trigo. Cinco carboxipeptidasas de cebada fueron distinguidas y diferenciadas con base en su peso molecular y especificidad del sustrato. Tres de ellas, la carboxipeptidasa I, II, y III, fueron purificadas y se determino su estructura primaria (Breddam *et al.*, 1983; Sorensen *et al.*, 1989). La estructura espacial de la carboxipeptidasa II del trigo (Figura 8), también fue reportada (Liao y Reminton 1990; Liao *et al.*, 1992). Estos estudios demostraron que las carboxipeptidasas son un grupo de enzimas muy diverso con respecto a su estructura y localización de tejidos así como en sus funciones. Se demostró que la carboxipeptidasa I y II son dímeros, mientras que la carboxipeptidasa III de la cebada y el trigo son homologas a la carboxipeptidasa Y de la levadura, con estructura monomérica (Sorensen *et al.*, 1989; Baulcombe *et al.*, 1987). La actividad de las serina carboxipeptidasas es inhibida por diisopropilfluorofosfato

(DFP) y fenil metil sufonil fluoruro (PMSF), pero no son sensibles a etilendiaminotetracetato de sodio (EDTA), u otros agentes quelantes (Walker-Simmons y Ryan 1980; Metha *et al.*, 1996). Los sustratos básicos de estas enzimas –péptidos– son hidrolizados a pH bajo (Drzymala y Bielawski, 2009).

La carboxipeptidasa III de la cebada es una cadena polipéptida única, compuesta de 411 aminoácidos, con una masa molecular de 48 kDa y mostró ser más homologa a la carboxipeptidasa Y de la levadura que a las carboxipeptidasas I y II de la misma especie (Sorensen *et al.*, 1989). Un fenómeno similar se observo en el caso de la carboxipeptidasa del trigo (Baulcombe *et al.*, 1987). Esta enzima es sintetizada en células de la capa de la aleurona en respuesta a las giberelinas (Domínguez y Cejudo, 1999; Drzymala *et al.*, 2005) y secretada al endospermo almidonado (Hammerton y Ho, 1986), donde participa junto con otras proteasas, en la movilización de las proteínas almacenadas en los granos de cereales en germinación (Drzymala *et al.*, 2008). En el año 2009, Drzymala y Bielawski aislaron y caracterizaron la carboxipeptidasa III a partir de granos germinados de triticale. La carboxipeptidasa III de triticale es un monómero con un peso molecular de 45 kDa, que hidroliza péptidos a una temperatura óptima de 30 a 50°C y pH 4.6. Los sustratos mejor hidrolizados son *N*-CBZ—Ala-Phe, *N*-CBZ-Ala-Leu, y *N*-CBZ-ala-Met. Los aminoácidos con cadenas laterales aromáticas o alifáticas largas son preferidas en la posición P1', mientras la presencia de este tipo de grupos en posición P1 del sustrato resulta en un bajo grado de hidrólisis. Los péptidos que contienen ácido glutámico en la posición P1 son sustratos pobres para la enzima. Este fenómeno sugiere que los sitios de enlace sustrato hidrofóbico son S1 y S1'. El sitio activo contiene serina dado que los inhibidores DPF y PMSF reducen la actividad por 89.9% y 81.5% respectivamente. Por otra parte, la actividad de la carboxipeptidasa III de triticale es reducida por iones de mercurio y compuestos organomercurial, lo que sugiere la presencia de un grupo sulfhidrilo adyacente al sitio activo de la enzima. La identificación de la enzima purificada fue por el método de espectrometría de masas, demostrando que la enzima es homologa a la carboxipeptidasa III de la cebada.

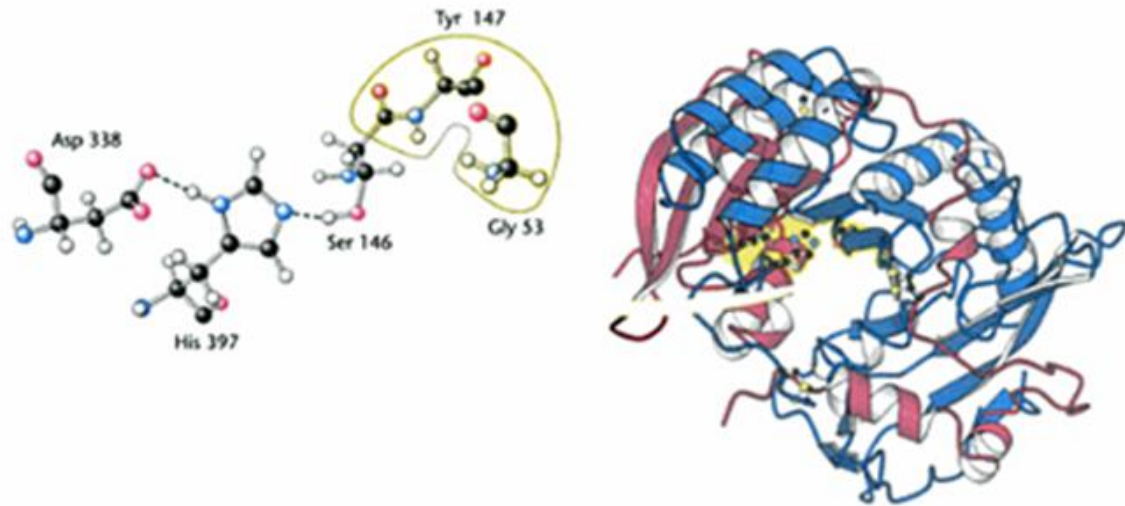


Figura 8. Carboxipeptidasa II. La estructura de la carboxipeptidasa II del trigo (derecha) se ilustra con sus dos cadenas (azul y roja). La tríada catalítica de la carboxipeptidasa II (izquierda) se compone de los mismos aminoácidos que la químotripsina, a pesar de que las enzimas no manifiestan ninguna similitud estructural. Los residuos que conforman la cavidad del oxianión están señalados en amarillo (Tomado de Strayer *et al.*, 2004).

IV.9 Carboxipeptidasa de *Theobroma cacao* L. (tcCP)

La semilla de cacao contienen dos proteínas de almacenamiento de la especie albumina y globulina (Biehl *et al.*, 1982). La globulina con dos polipéptidos de 47 y 31 kDa (Pettipher, 1990; Spencer y Hodge, 1992; Voigt *et al.*, 1993), es degradada en la fermentación, la albumina (21kDa) no es degradada. Los precursores del aroma específico del cacao pueden ser generados *in vitro* a partir de la globulina clase vicilina de los granos en fracciones parcialmente purificadas mediante las actividades de la endoproteasa aspártica y carboxipeptidasa (Voigt *et al.*, 1994a). La degradación de las proteínas de los cotiledones en péptidos y aminoácidos libres, es primordial para la formación del sabor y aroma. El consenso es que la acción combinada de las dos proteasas, principalmente endoproteasa aspártica y la serina carboxi-(exo) peptidasa sobre el polipéptido globulina clase vicilina (7S) (VCG) almacenado, produce los precursores específicos del sabor y aroma el cacao en presencia de azúcares reductores. La endoproteasa aspártica (EC 3.4.23) hidroliza enlaces peptídicos en VCG en residuos de aminoácidos hidrofóbicos, formando sustratos oligopéptidos hidrofóbicos

para la serina exopeptidasa (EC 3.4.16.1) que remueve residuos de aminoácidos hidrofóbicos en el extremo carboxilo terminal (Biehl *et al.*, 1993; Voigt *et al.*, 1994; Biehl *et al.*, 1996; Biehl y Voigt, 1999).

Durante el proceso de fermentación y como resultado de los cambios subcelulares, los substratos se vuelven accesibles a las enzimas, resultando en la formación de los precursores del sabor y aroma presentes en los granos no fermentados. Lo anterior, ha llevado a la conclusión de que la actividad máxima de las enzimas proteolíticas, endoproteasa aspártica y la acción subsecuente de una aminopeptidasa y una carboxipeptidasa, permite la formación de aminoácidos hidrofóbicos y péptidos hidrofílicos (Biehl *et al.*, 1993; Voigh *et al.*, 1994b; Bytof *et al.*, 1995) y la invertasa del cotiledón (enzima importante responsable de la hidrólisis de la sacarosa, misma que da lugar a la glucosa y fructuosa) se encuentra en las semillas no fermentadas (López *et al.*, 1978; Hansen *et al.*, 1998).

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 proteinasa 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).

En 2000, Hansen *et al.*, compararon los niveles de actividad de las enzimas endoproteasas, aminopeptidasa, carboxipeptidasa e invertasa (proveniente del cotiledón y pulpa), involucradas en la formación de los precursores del sabor y aroma en granos no fermentados, proveniente de 10 diferentes genotipos de cacao con diferentes características de sabor y aroma (alto y bajo). El análisis de varianza demostró que existen diferencias significativas en los niveles de actividades

enzimáticas entre genotipos. Las actividades de aminopeptidasa y endoproteasa en los granos del genotipo PA7 fue más alto que en los otros genotipos. El análisis de los componentes principales (PCA) mostró que el genotipo PA7 (alto sabor y aroma), fue muy diferente que el genotipo UIT1 (bajo en sabor y aroma). Aunque existen diferencias significativas, no se ha logrado establecer una relación simple y general entre el potencial del sabor y aroma de un genotipo y, el nivel de las actividades enzimáticas clave en los granos de cacao no fermentados. Durante el tostado, los precursores del sabor y aroma, participan en las reacciones de Maillard para formar los compuestos volátiles del típico aroma del cacao (Mohr *et al.*, 1976).

Recientemente, Sánchez-Mundo *et al.*, (2010a) demostraron que existe actividad de exopéptidasas durante la germinación de semillas de cacao (*T. cacao L.*). Carboxipeptidasa (CP), leucina-aminopeptidasa (APE) y la Xaa Prolil Dipeptidil aminopeptidasa (Xaa-Pro-DAP) y concluyeron que estas péptidasas participan en la degradación de las proteínas de almacenamiento durante la germinación del cacao de manera sinérgica.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.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.

V.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 tcCP.

V.3. 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.*, 2010a. 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 (1:10 p/v) 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% (3 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 5000 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.

V.4. Obtención de extractos enzimáticos

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 aspartil proteasas y metaloproteasas se agregó Pepstatina A 1µM y EDTA 1mM. La mezcla fue agitada durante 30 minutos a 37°C y centrifugada a 20,000 x g durante 10 min a 4°C. Finalmente el sobrenadante fue separado.

V.5. Purificación de la enzima de tcCP

V.5.1. Precipitación con sulfato de amonio

El sobrenadante obtenido en el V.4 fue precipitado a 40% de saturación con sulfato de amonio. El precipitado fue colectado mediante centrifugación a 17,000 x g durante 20 min a 4°C y el precipitado obtenido fue 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 tcCP, así como su caracterización correspondiente.

V.5.2. 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 un sistema de ultrafiltración Amicon® Millipore empleando una membrana de 10 kDa de corte de peso molecular de la misma marca, y enseguida se les determinó concentración de proteínas y actividad enzimática (Sánchez-Mundo *et al.*, 2010a).

V.5.3. Determinación de la actividad enzimática de tcCP

La actividad de tcCP, fue determinada mediante el uso de *N*-benzoil-L-tirosina-*p*-nitroanilida (Bz-Tyr-*p*NA) (Bachem, Bubendorf, Switzerland) como sustrato. La mezcla de reacción incluyó 370 μ L de regulador Tris-HCl 0.1 M (pH 7.0) conteniendo 1% de Tritón X-100; 100 μ L de agua desionizada, 30 μ L de la solución de sustrato 10 mM y 100 μ L de extracto enzimático. Después de 30 min de incubación a 37°C, la reacción fue detenida con 400 μ L de ZnSO₄ (5% w/v) y 100 μ L de Ba (OH)₂ (7.5% w/v), seguido de centrifugación a 13,201 x *g* durante 10 min. La absorbencia de la *p*-nitroanilida liberada por la reacción fue medida a 405 nm. Una unidad de tcCP (U) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de *p*-nitroanilida del sustrato por minuto bajo las condiciones de ensayo descritas (Mercado-Flores *et al.*, 2004; Sánchez-Mundo *et al.*, 2010a).

V.5.4. 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 μ L de extracto enzimático con 200 μ L agua destilada. Posteriormente, se agregaron en agitación constante, 1000 μ l de reactivo A (Na₂CO₃ al 2%, NaOH al 0.4%, SDS al 1%, Tartrato de sodio y potasio al 0.16%) mas reactivo B (CuSO₄ 5 H₂O al 4%) en una proporción de 100:1, se incubó durante 15 min temperatura ambiente. A continuación se agregaron en agitación constante, 100 μ L 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.

V.5.5. Cromatografía de intercambio iónico

La fracción proteica obtenida mediante precipitación con Sulfato de amonio 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-ÄKTAprime plus, GE Healthcare Amersham Biosciences, USA). La concentración de proteínas y la actividad fueron medidas con Bz-Tyr-pNA. 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.*, 2010a).

V.5.6. Determinación del peso molecular mediante SDS-PAGE.

La purificación de la tcCP 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 15 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 α 2-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.

V.6. Caracterización Bioquímica de la Enzima tcCP

V.6.1. Determinación de actividad de las exopeptidasas tcAPE y Xaa-Pro-DAP sobre la enzima tcCP purificada.

La actividad de la enzima tcCP frente a sustratos fue determinada en la fracción purificada. Los sustratos cromogénicos usados en el análisis fueron los siguientes: Benzoil-tirosina-p-nitroanilida (Bz-Tyr-pNA) para la actividad de tcCP, Leucina-p-nitroanilida (Leu-pNA) y Lisina-p-nitroanilida (Lys-pNA) para la actividad de aminopeptidasa, Alanina-prolina-p-nitroanilida (Ala-pro-pNA) para la actividad Xaa-Pro-DAP, en ambas concentraciones 1 y 10 mM, la actividad de aspartil proteasa fue probada con Albumina Sérica Bovina como sustrato (Mercado-Flores *et al.*, 2004; Sánchez-Mundo *et al.*, 2010a).

V.6.2. Determinación de actividad de la endopeptidasa aspartil proteínasa (tcAP) sobre la enzima tcCP purificada.

La actividad enzimática de aspartil proteasa, se determinó con 100 μ L de extracto enzimático y 400 μ L 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 μ L 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 *et al.*, (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 μ g de tirosina por minuto bajo las condiciones de ensayo descrita (Milewski *et al.*, 1994).

V.6.3. Determinación de péptidos liberados por la técnica de Micro-Lowry

Se adicionaron 200 μ L de muestra en tubos de vidrio, en agitación constante, 200 μ L 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 μ L del reactivo Folín-agua en una

proporción de 1:20. La mezcla se incubo por 45 minutos a 37°C y los péptidos liberados se leyeron a una λ de 660 nm.

V.6.4. 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 fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), leupeptina, pepstatina, bestatina, pefabloc, β -mercaptoetanol 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 con Bz-Tyr-pNA como sustrato. La actividad de la enzima ensayada en ausencia de inhibidores fue tomada como 100% (Liu *et al.*, 2004; Haddar *et al.*, 2009; Sánchez-Mundo *et al.*, 2010a).

V.6.5. 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: Ba^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Mn^+ , Fe^+ , Hg^{2+} , y AgNO_3 . La actividad de la enzima tcCP fue determinada como se indicó previamente en V.5.3., usando Bz-Tyr-pNA como sustrato. La actividad de la enzima en ausencia de los iones metálicos fue considerada como 100% (Liu *et al.*, 2004; Haddar *et al.*, 2009; Sánchez-Mundo *et al.*, 2010a).

V.6.6. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima

El efecto del pH sobre la actividad de la enzima purificada fue determinada llevando a cabo el experimento a diferentes pH's usando regulador de acetato de sodio 100 mM (pH 4-5), regulador de fosfato 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 V.5.3 usando Bz-Tyr-pNA como sustrato (Mercado-Flores *et al.*, 2004; Drzymara y Bielawski, 2009; Sánchez-Mundo *et al.*, 2010a).

V.6.7. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima tcCP purificada de *T. cacao* L.

La temperatura óptima para la actividad de la enzima purificada fue determinada siguiendo el método descrito en V.5.3, incubando la mezcla de reacción a diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70 y 80°C). Se utilizó el regulador Tris-HCl 100 mM (pH 7.0) en la mezcla de reacción (Mercado-Flores *et al.*, 2004; Sánchez-Mundo *et al.*, 2010a).

VI. RESULTADOS

VI.1. Germinación de semillas de *T. cacao* L.

Durante el estudio se observaron las tres etapas de germinación descritas por Sánchez-Mundo *et al.*, (2010b) (Fig. 9): a) Semillas desprovistas de mucílago en la primera etapa (1-3 días), se observa que a partir del tercer día de imbibición, los cotiledones emergen del sustrato debido al crecimiento del hipocótilo; b) desaparece el color blanco de la semilla tornándose a un color verde claro atribuido a la diferenciación de los cloroplastos en los cotiledones, transformándolos en órganos fotosintéticos como si fueran hojas, correspondientes al tipo de germinación epigea que presenta el cacao; c) Semillas en la segunda etapa del proceso de germinación (Días 4-7) en cual se observó que la radícula penetra y atraviesa la cubierta del cotiledón, en algunos casos alcanza la ruptura del mismo, a continuación los cotiledones totalmente verdes se elevan por encima del nivel del suelo dando paso en los días siguientes al desarrollo del epicótilo; d) y e) Semillas en la tercera etapa del proceso de germinación (Días 8-15) en cual se observó que los cotiledones se abren exponiendo a la plúmula, la cual empieza a crecer al mismo tiempo que la raíz pero es mucho más pequeña y da inicio a 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), tcAPE y tcCP (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).

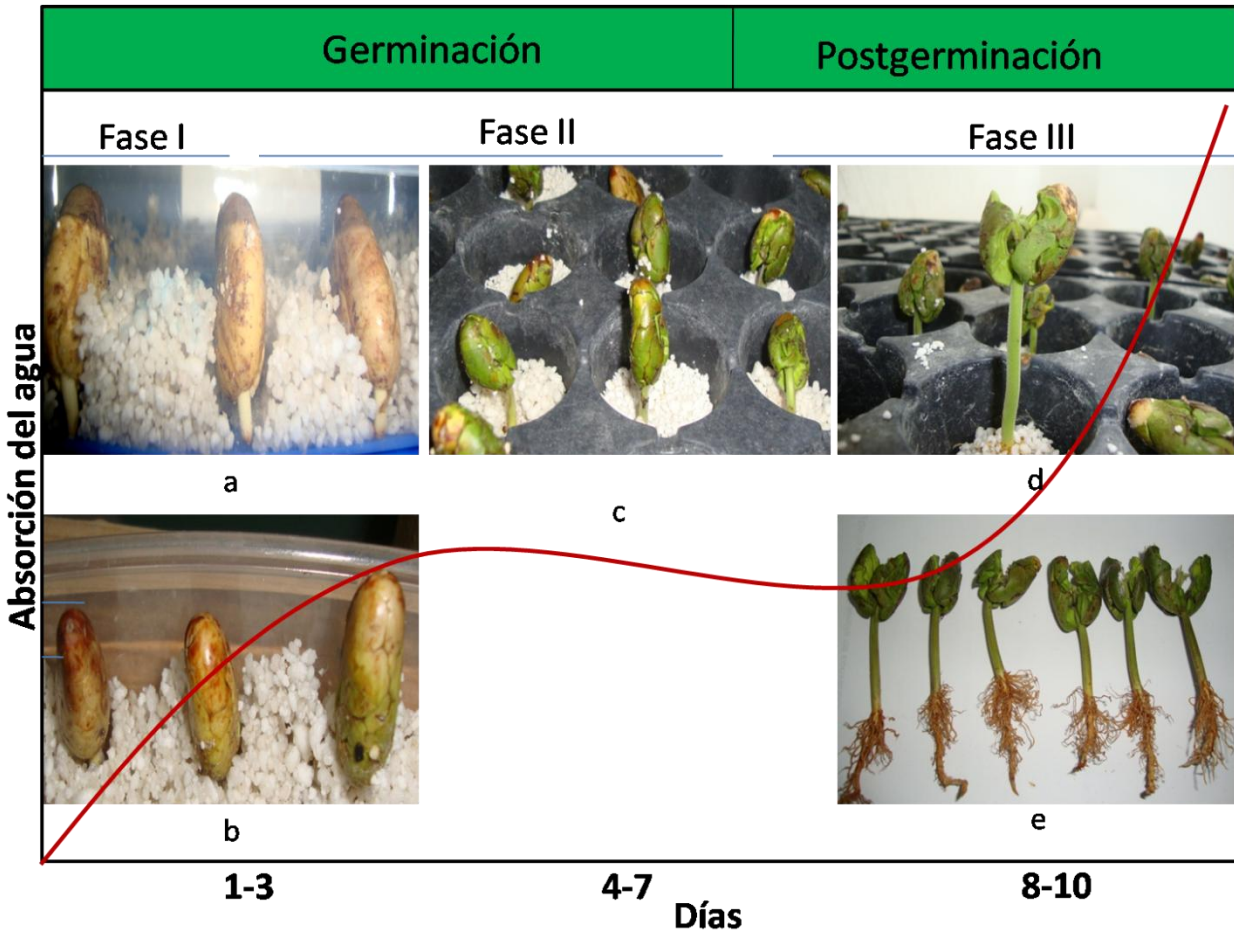


Figura 9. Germinación de semillas de cacao. a) y b) Semillas desprovistas de mucílago en la primera etapa (1-3 días); c) Semillas en la segunda etapa del proceso de germinación (Días 4-7); d) y e) Semillas en la tercera etapa del proceso de germinación (Días 8-15).

VI.2. Purificación y caracterización de la enzima tcCP

VI.2.1 Purificación de la tcCP

La carboxipeptidasa de la semilla de cacao (tcCP) fue aislada y purificada a partir de los cotiledones de semillas de 10 días de germinación. La enzima fue purificada en tres pasos que incluyeron los procedimientos de 1) homogenización y extracción de la fuente de enzima, precipitación con sulfato de amonio al 40% de saturación y cromatografía de intercambio iónico

El perfil de elución de la cromatografía de intercambio iónico mostró cuatro picos (QSP1, QSP2, QSP3 y QSP4) que presentaron actividad de tcCP (Figura 10). El pico QSP1 (fracciones 6-8) eluyó a 0.26 M NaCl, y por lo tanto la fracción fue retenida débilmente por la columna, posiblemente debido a una baja concentración de residuos de aminoácidos con una carga neta negativa. Dicho pico mostró la mayor actividad enzimática específica de tcCP (14.303 UAE/mg de proteína total). El pico QSP2 (fracción 24), eluyó a 0.9 M NaCl, aunque fue retenido fuertemente por la columna, presentó menor actividad de tcCP en comparación con el pico QSP1. Finalmente se observaron el pico QSP3 (fracción 24) y QSP4 (fracciones 31 y 33) pero con valores negativos a 280 nm de longitud de onda. El pico 1 (QSP1) de la cromatografía de intercambio iónico que mostró la mayor actividad enzimática, fue el que se utilizó para realizar la caracterización bioquímica de la tcCP. La enzima fue purificada 11.57 veces con un rendimiento de 45.51% y una actividad específica de 14.303 UAE/mg de proteína total. Los resultados del procedimiento de purificación son resumidos en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Purificación de tcCP de la semilla de cacao (*Theobroma cacao L.*).

Estado de Purificación	Actividad Total (U^a)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (UAE/mg)	Factor de Purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	2.041	2.617	0.780	1	100
Precipitación con sulfato de amonio (40%)	1.833	1.483	1.237	1.59	89.82
Intercambio Iónico con Q-Sepharosa	0.929	0.065	14.303	11.57	45.51

^a Una unidad de enzima está definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar una mol pNA por min, usando Bz-Tyr-pNA como sustrato.

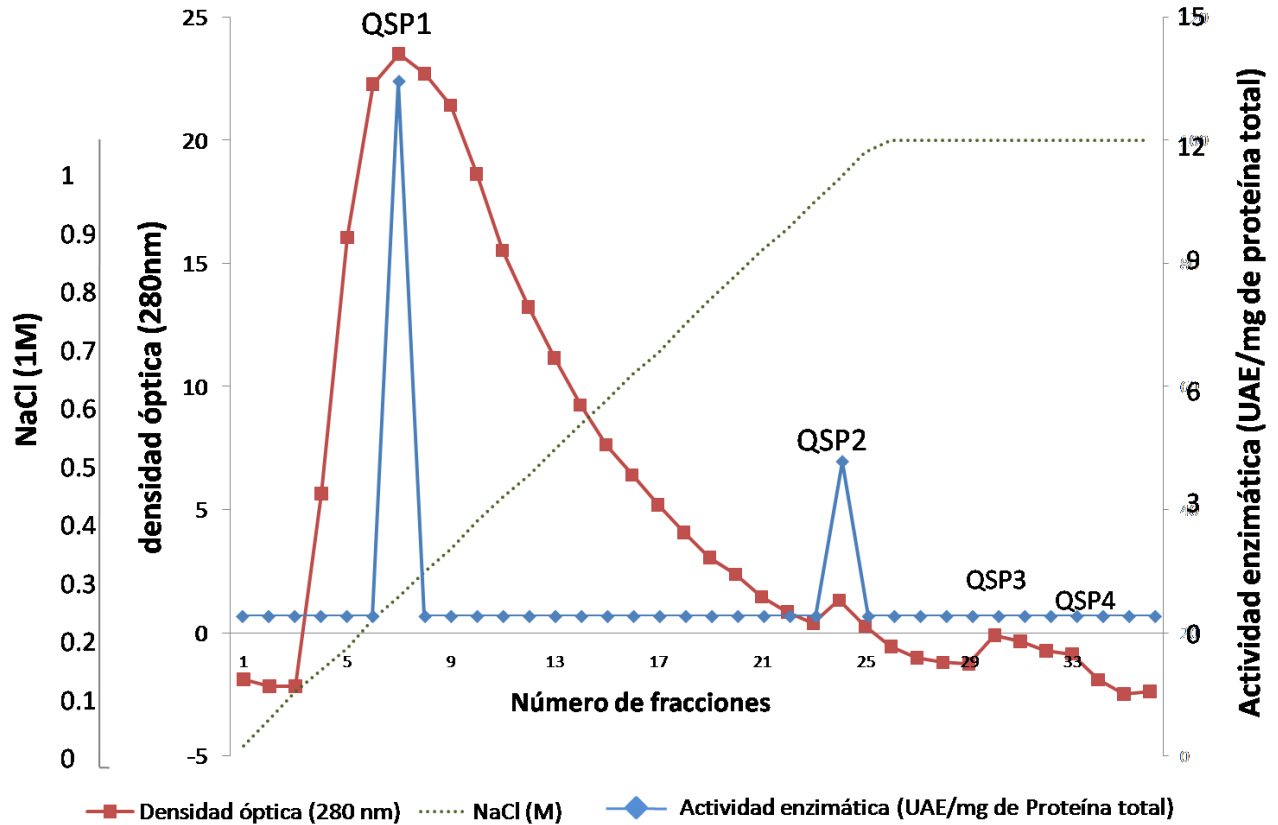


Figura 10. Purificación de la tcCP de semillas de cacao (*Theobroma cacao* L) germinadas. Las proteínas fueron detectadas por medición de la absorbencia a 280 nm (línea roja); la actividad de tcCP fue ensayada contra Bz-Tyr-pNA, a pH 7.0 (línea azul); cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharosa con gradiente de NaCl (línea verde punteada).

VI.2.2. Determinación de actividad de las exopeptidasas tcAPE y Xaa-Pro-DAP sobre la enzima tcCP purificada.

El sustrato Bz-Tyr-pNA fue hidrolizado a una mayor proporción a 10 mM que a 1 mM (13.576 UAE/mg de proteína total y 9.786 UAE/mg de proteína total respectivamente), confirmando la presencia de actividad carboxipeptidasa (CP) (E.C. 3.4.16). En relación a los sustratos Leucina-p-nitroanilida (Leu-pNA) y Lisina-p-nitroanilida (Lys-pNA) para detectar actividad de aminopeptidasa, Alanina-prolina-p-nitroanilida (Ala-pro-pNA) para detectar la actividad Xaa-Pro-DAP, en ambas concentraciones 1 y 10 mM, no se detectó actividad de las enzimas mencionadas con ninguno de los sustratos ensayados.

VI.2.3. Determinación de actividad de la endopeptidasa aspartil proteínasa (tcAP) sobre la enzima tcCP purificada.

En relación al sustrato (BSA), no se detectó actividad de la endopeptidasa tcAP en la fracción de enzima purificada.

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

Sustrato ^a	Actividad específica (UAE/mg)	
	1 mM	10 mM
H-Ala-pro-pNA	n.d	n.d
H-Lys-pNA●2HBr	n.d	n.d
H-Leu-pNA	n.d	n.d
Bz-Tyr-pNA	9.786	13.550

n.d. = No detectada.

^a pNA = p-Nitroanilida, Bz = benzoil.

^b Una unidad de enzima es definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μmol de pNA por min.

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

Sustrato	Actividad específica (UAE/mg)
	0.1 mM
BSA	n.d.

n.d. = No detectada.

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

VI.2.4. Efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática de la fracción de la enzima tcCP purificada.

El cuadro 7 muestra los efectos de los inhibidores sobre la actividad de la enzima tcCP purificada. Los mejores inhibidores a fueron PMSF 1mM, leupeptina 1 mM, y pefabloc 0.1 mM, descritos como inhibidores de serina proteasas, causaron una disminución de 89.47%, 81.58% y 76.31% con respecto a la actividad máxima considerado como el 100%, respectivamente. El β -mercaptoetanol que reacciona con los grupos sulfhidrilo causó una inactivación de la enzima en 2.61% a una concentración de 1 mM. El agente quelante EDTA 1 mM y el inhibidor de carboxipeptidasas 1,10-fenantrolina 1 mM, causaron una inactivación de la enzima en 2.61 y 7.88 % respectivamente. La pepstatina A descrito como inhibidor específico de aspartil proteasas no tuvo efecto significativo sobre la actividad de la enzima tcCP purificada.

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

Inhibidores	Actividad relativa ^a (%)	
	0.1 mM	1 mM
Leupeptina	39.48	18.42
Pefabloc	23.69	28.95
Pepstatina A	78.96	97.39
PMSF ^a	27.11	10.53
EDTA	97.39	94.76
1,10- Fenantrolina	76.33	92.12
2- β -Mercaptoetanol	76.33	97.39

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

^b PMSF, fenil metil sulfonil fluoruro; EDTA, ácido etilen diamino tetracético

VI.2.5. Efecto de iones metálicos sobre la actividad tcCP de *T. cacao* L.

El cuadro 8 muestra el efecto de iones metálicos sobre la actividad de la enzima tcCP purificada. La actividad de la tcCP purificada mostró una leve disminución de la actividad en el caso de las muestras preincubadas con las sales de bario, magnesio, sodio y aluminio en 23.67%, 23.67%, 28.93%, 42.09%, respectivamente a una concentración de 0.1 mM. La enzima fue inhibida fuertemente por manganeso 1 mM, fierro 0.1 mM y cobre 0.1 mM en 76.31%, 76.31% y 84.21%, respectivamente. Los iones de plata y mercurio a las concentraciones ensayadas, inhibieron completamente la actividad de la enzima tcCP purificada. Los iones de calcio 1mM, fierro mM, cadmio 0.1 mM, zinc 0.1 mM y cobalto 1 mM, activaron a la enzima aumentando la actividad enzimática en 2.65%, 5.28, 10.55%, 13.18% y 21.08% respectivamente. El incremento de la actividad de la enzima tcCP purificada se explica por el efecto del cobalto sobre la activación de las carboxipeptidasas previamente descrito (Kishimura *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 1999). La enzima también fue completamente inhibida por los iones de mercurio como el HgCl₂, lo que indica la presencia de grupos sulfhidrilo libres próximos al sitio activo de la tcCP de cacao. El efecto de los compuestos mercúricos sobre la actividad de las serina carboxipeptidasas fue previamente demostrado (Mikola *et al.*, 1983, Breddam *et al.*, 1985; Breddam y Sorensen, 1987).

Cuadro 8. Efecto de iones metálicos sobre la actividad de tcCP en *Theobroma cacao* L.

Metales	Actividad relativa (%)	
	0.1 mM	1 mM
NaCl ₂	71.07	84.23
CaCl ₂	60.54	102.65
BaCl ₂	76.33	94.76
CuCl ₂	15.79	26.32
CoCl ₂	81.60	121.08
HgCl ₂	n.d	n.d
AgNO ₃	n.d	5.26
AlCl ₃	57.91	84.23
MgCl ₂	76.33	94.76
FeCl ₂	23.69	105.28
ZnCl ₂	94.76	113.18
CdCl ₂	110.55	23.69
MnCl ₂	23.69	81.60

^a Expresada como un porcentaje de hidrólisis de Bz-Tyr-pNA en la ausencia de cualquier sal metálica añadida, a el cual fue dado el valor 100%.

VI.2.6. Determinación del peso molecular con Electroforesis en Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE) de la tcCP de *T. cacao* L.

El peso molecular de la enzima tcCP purificada se determinó por el método SDS-PAGE teñido con por el procedimiento de nitrato de plata. En la figura 11 se muestran las fracciones activas de la tcCP de *T. cacao* L. obtenidas en cada uno de los diferentes pasos de purificación de la enzima, obteniendo una banda de 30.77 kDa correspondiente a la muestra del pico 1 (QSP1) de la cromatografía de intercambio iónico que mostró la mayor actividad enzimática de la tcCP (Fig. 11, Cuadro 4). La presencia de una banda única nos indica que la enzima fue purificada a homogeneidad.

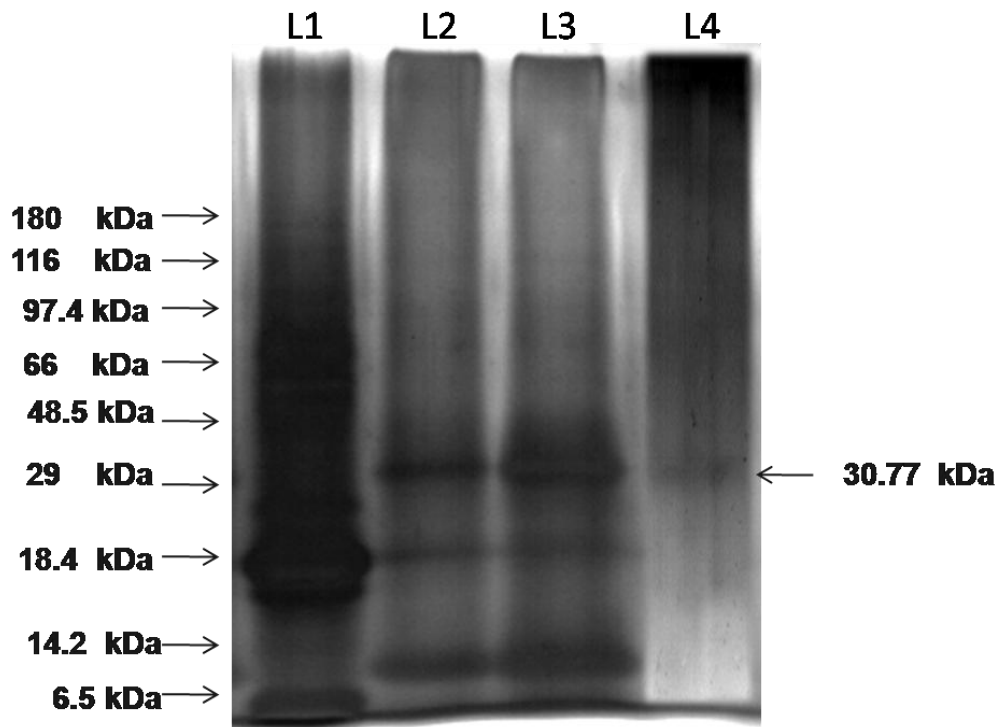


Figura 11. Análisis electroforético de las fracciones activas de la tcCP de *Theobroma cacao* L. obtenidas en los diferentes pasos de purificación. La fracción con máxima actividad enzimática obtenida en cada paso de purificación fueron analizadas por PAGE-SDS en condición reductora y desnaturizante. 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 40%; L4, cromatografía de intercambio iónico realizada en la Columna XK 16/20 empacada con Q-Sepharosa.

VI.2.7. pH óptimo de la tcCP.

Los resultados de la actividad relativa de la enzima a diferentes pH's se muestran en la Figura 10. La actividad hidrolítica de la tcCP sobre el sustrato Bz-Tyr-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. A partir de pH's 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0 la actividad enzimática disminuyó progresivamente alcanzando valores 76.33 %, 55.27%, 19.74 % y 7.9 % de actividad relativa, respectivamente con el regulador de Tris-HCl 0.1 M con 1% de Tritón X-100. La actividad de la tcCP purificada disminuyó a pH's 4.0, 4.5, 5.0 utilizando acetato de sodio con 1% de Tritón X-100 obteniendo una actividad relativa de 3.95 %, 22.37 % y 35.53 %, respectivamente. A pH's de 6.0, 6.5 y 7.0, la actividad disminuyó considerablemente alcanzando una actividad relativa de 28.95 %, 15.79 % y 14. %, respectivamente con el regulador de fosfato de sodio con 1% de Tritón X-100.

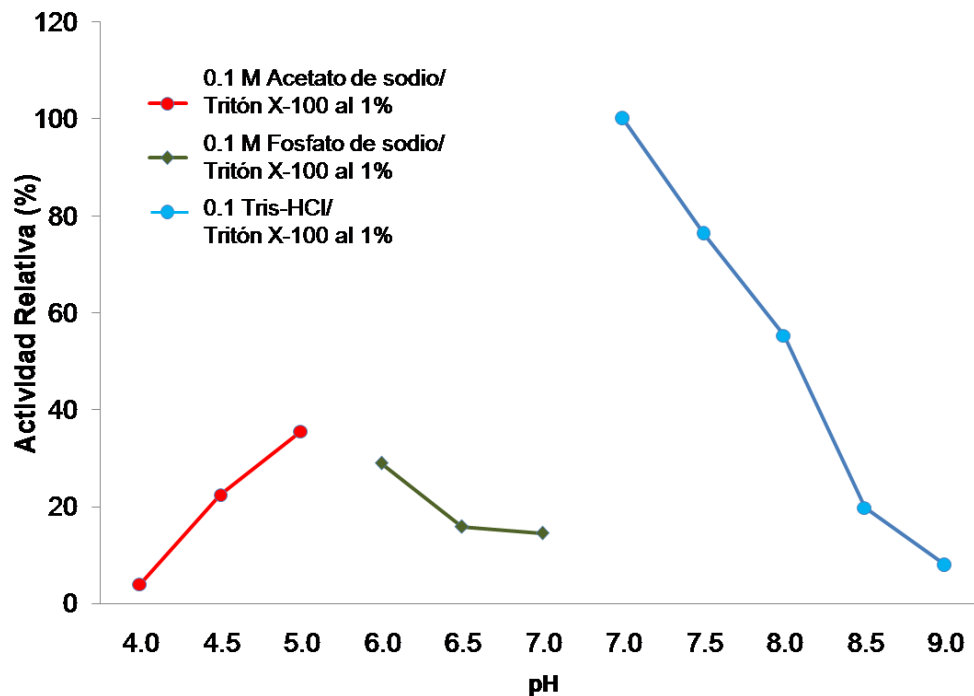


Figura 12. Efecto del pH sobre la actividad de tcCP purificada a partir de *Theobroma cacao* L., sobre el sustrato Bz-Tyr-pNA. La actividad de tcCP fue determinada a pH 4.0-5.0 con regulador de acetato de sodio 0.1 M con 1% de Tritón X-100 (Línea roja), pH 6-7 con regulador de fosfato de sodio 0.1 M 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 azul) a 37 °C.

VI.2.8. Temperatura óptima de la tcCP.

La actividad de la enzima purificada fue óptima a 40°C, sin embargo, mostro niveles significativos de actividad a 50°C y 60 °C (Figura 13) con una actividad relativa de 178.98%, 160.56 y 128.97%, respectivamente. La actividad de la enzima disminuyó significativamente a 70 y 80 °C con una actividad relativa de 28.95 % y 11.84 %.

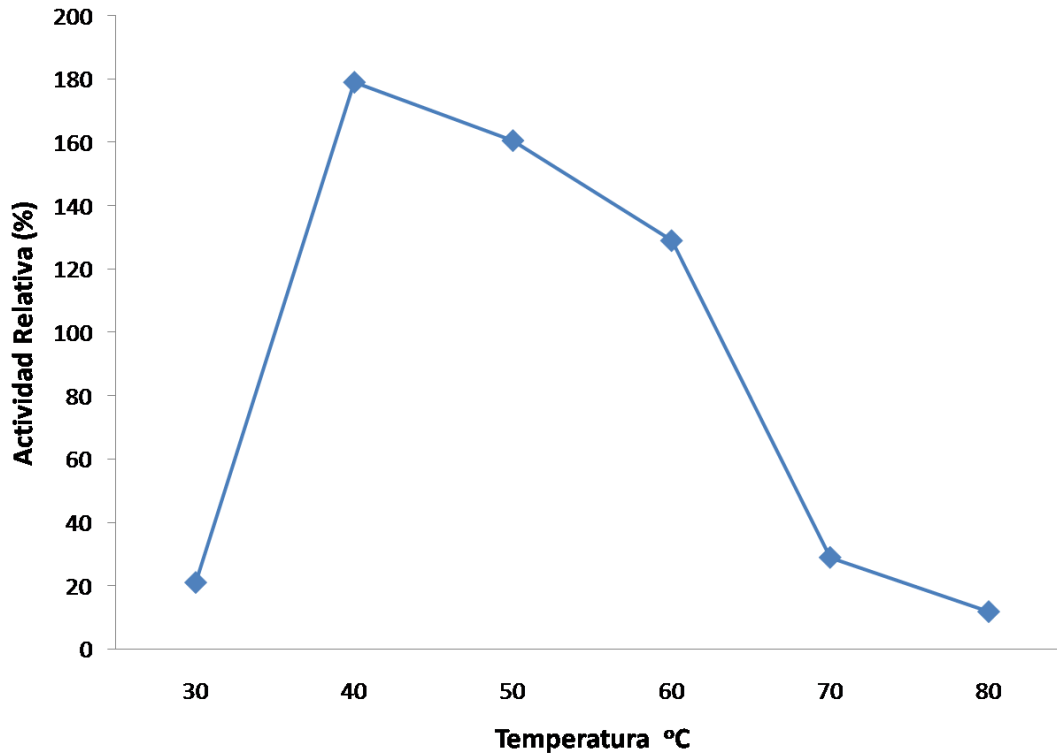


Figura 13. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la serina carboxipeptidasa de *Theobroma cacao* L., sobre el sustrato Bz-Tyr-pNA. La actividad fue medida a 30-60°C y pH 7.0.

VII. DISCUSIÓN

La tcCP 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 fue purificada a partir de semillas de cacao de 10 días de germinación, 11.57 veces con un rendimiento de 45.51% y una actividad específica de 14.303 UAE/mg de proteína total. La enzima fue purificada con tres pasos de extracción: homogenización y extracción de la fuente de enzima, precipitación con sulfato de amonio al 40% de saturación y cromatografía de intercambio iónico. Una gran cantidad de enzimas conocidas se han reportado por estar presente en la germinación de las semillas como algodón (Ihle y Dure, 1972), arroz (Doi *et al.*, 1980), malta (Enari, 1980), frijol mungo (Yamaoka *et al.*, 1993) y trigo (triticale) (Preston y Kruger, 1976; Drzymala y Bielawski, 2009). La carboxipeptidasa del arroz CPA_{ASE-4} y la carboxipeptidasa III del frijol mungo fueron purificadas 187.13 y 91 veces con rendimientos de 5 % y 0.5 % respectivamente. Dichos rendimientos fueron inferiores al obtenido en la purificación de tcCP de cacao, pero la actividad específica de ambas enzimas fue superior al obtenido para la tcCP, para la CPA_{ASE-4} del arroz 60 UAE/mg de proteína total y para la carboxipeptidasa III del frijol mungo 55.6 UAE/mg de proteína total.

Por otra parte en la determinación de actividad de las exopeptidasas tcAPE y Xaa-Pro-DAP sobre la enzima tcCP purificada; los substratos Leucina-p-nitroanilida (Leu-pNA) y Lisina-p-nitroanilida (Lys-pNA) para detectar actividad de aminopeptidasa, así como Alanina-prolina-p-nitroanilida (Ala-pro-pNA) para detectar la actividad Xaa-Pro-DAP, en ambas concentraciones 1 y 10 mM, no se detectó actividad de las enzimas mencionadas con ninguno de los substratos ensayados. El sustrato Bz-Tyr-pNA fue hidrolizado a una mayor proporción a 10 mM 13.576 UAE/mg de proteína total confirmando la presencia de la actividad de carboxipeptidasa (CP) (E.C. 3.4.16). Sánchez-Mundo *et al.*, (2010b) emplearon el sustrato Bz-Tyr-pNA en el extracto enzimático para detectar actividad enzimática de tcCP en la fracción de la enzima Xaa-Pro-DAP purificada a partir de semillas de cacao germinadas durante 10 días, encontrando actividad de tcCP (0.54 UAE/mg de proteína total). Debido a la presencia

de otras enzimas como leucina-aminopeptidasa (APE), y carboxipeptidasa (CP) en la fracción de la enzima Xaa-Pro-DAP purificada, los autores concluyen que dichas peptidasas pueden participar de una manera sinérgica en la degradación de las proteínas de almacenamiento durante la germinación de la semilla de cacao.

Los mejores inhibidores sobre la inactivación de la enzima tcCP purificada fueron PMSF 1mM, leupeptina 1 mM, y pefabloc 0.1 mM, descritos como inhibidores de serina proteasas, los cuales causaron una disminución de 89.47 %, 81.58 % y 76.31 %, respectivamente, con respecto a la actividad máxima considerada como el 100 %. Esto indica que la enzima es una carboxipeptidasa tipo serina, como es el caso de otras serina carboxipeptidasas aisladas a partir de semillas germinadas de frijol mungo y trigo las cuales fueron inhibidas por PMSF en 100 % y 81.5 %, respectivamente (Yamaoka *et al.*, 1993; Drzymala y Bielski, 2009).

La enzima también fue inhibida por un compuesto de mercurio como el HgCl_2 en un 100%, lo cual sugiere la presencia de un grupo sulfhidrilo adyacente al sitio activo de la enzima tcCP purificada. El efecto de compuestos de mercurios sobre la actividad de las serina carboxipeptidasas ha sido demostrado en el salvado de arroz con un porcentaje de actividad relativa de 92%, malta de la cebada (carboxipeptidasa II) con un porcentaje de actividad relativa de (90%) y trigo con un porcentaje de actividad relativa (81.5%) (Doi *et al.*, 1980; Breddam y Sorensen, 1987; Drzymala y Bielawski 2009). Se ha descrito que las serina carboxipeptidasas de hongos son inhibidas por bajas concentraciones de mercurio, debido a la modificación de un grupo sulfhidrilo (Bai y Hayashi, 1979; Breddam, 1983; Hofmann, 1976). Sin embargo, las enzimas correspondientes de plantas superiores son generalmente inhibidas únicamente por mercurio (Breddam *et al.*, 1983; Kubota *et al.*, 1973; Kubota *et al.*, 1980; Matoba *et al.*, 1974). De igual forma se ha demostrado que la inhibición de la carboxipeptidasa I de malta no es debida a la modificación de su grupo sulfhidrilo puesto que requiere de altas concentraciones de mercurio y depende de la desprotonación de un grupo ionizable con un pKa de 6.7. La influencia del Hg^{++} sobre la carboxipeptidasa II de la malta la cual no contiene grupos sulfhidrilos, es esencialmente idéntica a la carboxipeptidasa I de la malta, sugiriendo que el sitio de reacción de ambas enzimas contiene otro residuo capaz de enlazar a este metal, por ejemplo His, Glu o Asp (Webb, 1963; Breddam *et al.*, 1985). La

presencia del agente quelante EDTA, mismo que ha sido descrito como un inhibidor de metalo-carboxipeptidasa no afectó significativamente la actividad de la enzima, indicando que la enzima purificada tcCP no es una metaloenzima.

El peso molecular de la tcCP se determinó por SDS-PAGE, obteniendo una sola banda de 30.77 kDa. La masa molecular de la carboxipeptidasa III del trigo (triticale) determinada por el método de filtración en gel, resultó ser de 40.4 kDa, reportada por Drzymala y Bielawski (2009). Otras carboxipeptidasas reportadas con masa molecular similar fueron la carboxipeptidasa III de la cebada y la carboxipeptidasa III del trigo con masa molecular de 43 y 40 kDa, respectivamente (Mikola, 1983; Mikola 1986). La masa molecular de la carboxipeptidasa III de la cebada determinada por el método de SDS-PAGE fue de 48 kDa, 11% mayor que la obtenida por el método de filtración en gel (43 kDa) (Breddam y Sorensen, 1987). Wilson *et al.*, 1995 reportó que la masa molecular de la carboxipeptidasa Cpase I de semillas de frijol mungo fue de 42 kDa, utilizando el método de filtración en gel, mientras que por SDS-PAGE fue de 41.7 kDa, es decir un tamaño menor comparado con el método de filtración en gel. Como puede apreciarse los valores encontrados por los diferentes autores presentan variación no solamente por el método empleado en la determinación de los pesos moleculares sino también por el tipo de semilla, sin embargo el valor de la masa molecular de la tcCP purificada a partir de semillas de cacao (30.77 kDa), se aproxima a los valores de muchas de las serina carboxipeptidasas previamente reportadas. Por otro lado, se ha reportado que las serina carboxipeptidasas ácidas de tejidos de plantas y células de levaduras, representan una larga familia de enzimas homólogas (Mikola y Mikola, 1980). Sin embargo, la masa molecular de la carboxipeptidasa de semillas varía grandemente, por ejemplo, los granos de cebada contienen una carboxipeptidasa de masa molecular de 43-170 kDa (Mikola, 1982). Los patrones de variación en los niveles de actividad de las carboxipeptidasas de semillas durante la germinación, también varía grandemente, como se ha reportado Shutov y Vaintraub (1987).

La Serina-Carboxipeptidasa de *Theobroma cacao* L. (tcCP) fue más activa a un pH de 7.0 utilizando 1% de Tritón X-100, al respecto entre muchas carboxipeptidasas aisladas de varios tejidos de diferentes plantas como cebada, algodón, pino, salvado de arroz, frijol mungo y trigo han sido reportadas por estar presentes durante la germinación. La

mayoría de las enzimas anteriormente mencionadas fueron más activas a un pH's alrededor de 5 o 6, excepto algunas enzimas como la de trigo (CP III), salvado de arroz (CPAase-5) y pino, las cuales fueron más activas a pH 4.5 o 4.5 ~ 3.8 dependiendo del tipo de regulador usado (Ihle y Dure 1972, Salmia y Mikola, 1976; Doi *et al.*, 1980, Breddam *et al.*, 1987; Yamaoka *et al.*, 1993; Drzymala y Bielawski 2009). En la semilla de cacao, la actividad de la tcCP purificada fue mayoritaria a un intervalo de pH 7-8, utilizando regulador Tris-HCl 0.1 M conteniendo 1% de Tritón X-100, confirmando que esta enzima podría estar ligada a membranas o asociadas a la pared celular y son solubilizada a un pH alcalino, utilizando Tritón X-100 (Hansen *et al.*, 1998), Por otra parte, Doi *et al.*(1980) reportaron que la enzima CPAase-4 de salvado de arroz se activa a pH alcalino (pH 8), semejante a la carboxipeptidasa II de la malta que fue estable hasta pH 8 (Breddam *et al.*,1985) y la carboxipeptidasa II del salvado de trigo que fue estable hasta pH de 8.7 (Breddam *et al.*, 1987).

La actividad de la enzima purificada fue óptima a 40°C, sin embargo, mostro niveles significativos de actividad a 50°C y 60 °C (Figura 13) con una actividad relativa de 178.98%, 160.56 y 128.97%, respectivamente. La actividad de la enzima disminuyó significativamente a 70 y 80 °C con una actividad relativa de 28.95 % y 11.84 %.

En relación a efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima tcCP purificada, la actividad fue óptima a 40 °C, sin embargo, mostro niveles significativos de actividad a 50°C y 60 °C. Se ha reportado que la carboxipeptidasa III de grano de triticales presenta actividad óptima en un intervalo de temperatura de 30-50°C, con un máximo de actividad a 45°C (Drzymala y Bielawski, 2009).

VIII. CONCLUSIONES

1. La enzima tcCP purificada a partir de semillas germinadas de cacao (*Theobroma cacao* L.) fue purificada 11.57 veces con un rendimiento de 45.51% y una actividad específica de 14.303 UAE/mg de proteína total.
2. La enzima tcCP purificada mostró una alta especificidad por el sustrato Bz-Tyr-pNA a una concentración de 10 mM, y no se detectó actividad de ninguna de las enzimas aminopeptidasa, Xaa-Pro-DAP y aspartil proteasa.
3. La enzima tcCP purificada fue inhibida por PMSF 1mM, leupeptina 1 mM, y pefabloc 0.1 mM, descritos como inhibidores de serina proteasas, concluyendo que es una serina carboxipeptidasa.
4. La enzima tcCP no es una enzima metaloproteasa debido a que no fue inhibida por EDTA y 1,10-Fenantrolina descritos como inhibidores específicos de metaloproteasas.
5. La enzima tcCP fue inhibida por compuesto de mercurio como HgCl₂, indicando que tiene grupos libres de sulfhidrilo adyacente en su sitio activo.
6. La tcCP fue óptima a una temperatura de 40°C y pH de 7.0.

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

IX. LITERATURA CITADA

- Alverson, W. S., Whitlock, B. A., Nyffler, R., Bayer, C., Baum, D. A. 1999. Phylogeny of the core Malvales: evidence from *ndhF* sequence data. *Am J Bot.* 86:1474–1486
- Bai, Y and Hayashi, R. 1979. Properties of the single sulfhydryl group of carboxypeptidase Y. Effects of alkyl and aromatic mercurials on activities toward various synthetic substrates. *J. Biol. Chem.* 254: 8473-8479.
- Barret, A. J. 1994. Clasification of peptidases. In: *Methods in Enzymology*, 244: 1-15.
- Barret, A., Rawlings, N., Woessner, J. 1998. Handbook of proteolytic enzymes. Londres Academic Press.
- Baulcombe, D. C., Barker, R. F., Jarvis, M. G. 1987. A gibberellin responsive wheat gene has homology to yeast carboxypeptidase Y. *J Biol Chem.* 262:13726–13735.
- Baum, D. A., Smith, S. D., Yen, A., Alverson, W. S., Nyffeler, R., Whitlock, B. A., Oldham, R. L. 2004. Phylogenetic relationships of Malvaceae (Bombacoideae and Malvoideae; Malvaceae sensu lato) as inferred from plastid DNA sequences. *Am J Bot.* 91:1863–1871.
- Benedek, K. 2004. High-Performance Hydrophobic Interaction Chromatography. *Methods in Molecular Biology* vol. 251. Edi. M.-I. Aguilar Human Press Inc., Towana, NJ pp: 45-53.
- Bentsink, L. and Koornneef, M. 2008. Seed Dormancy and Germination. American Society of Plant Biologists. doi:10.1199/tab.0119.
- Bewley, J. D., and Black, M. 1994. Seed: Physiology of development and germination. Plenum Press, New York.
- Bewley, J. D. 1997. Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell.* 9:1055-1066.
- Beynon, R. J., and Bond, J. S. 1989. In: *Proteolytic enzymes*. Beynon, R. J. and Bond, J.S. (Eds). IRL Press, Oxford University.
- Biehl, B., and Voigh, J. 1999. Biochemistry of cocoa flavor precursors. In *Proceedings of the 12th International Cocoa Research Conference, Salvador, Brazil 1996*. Lagos, Nigeria: Cocoa Producers Alliance, pp 929-938.

- Biehl, B., Brunner, E., Passern, D., Quesne, V. C., Adomak, D. 1985. Acidification, proteolysis and flavour potential in fermentating cocoa beans. *J Sci Food Agric.* 36:583–598.
- Biehl, B., Heinrichs, H., Ziegler-Berghause, H., Srivastava, S., Xiong, Q., Passern, D., Senyuk, V. I., and Hammoor, M. 1993. The proteases of ungerminated cocoa seeds and their role in the fermentation process. *Angew Bot.* 67:59-65.
- Biehl, B., Passern, D., Sagemann, W. 1982. Effect of acetic acid on subcellular structures of cocoa bean cotyledons. *J Sci Food Agric.* 33: 1101–1109.
- Biehl, B., Heinrichs J., Voigt G., Bytof G. & Serrano P. 1996. Nature of proteases and their action on storage protein in cocoa seeds during germination as compared with fermentation. *In the 12th International Cocoa Research Conference, Salvador, Lagos, Nigeria: Cocoa Producers Alliance*, pp 18-23.
- Breddam, K., Sorensen, S. B., Svendsen, I. 1987. Primary structure of carboxypeptidase I1 from malted barley. *Carlsberg Res Commun* 52:297-311.
- Breddam, K. 1986. Serine carboxypeptidases: a review. *Carlsberg Res Commun.* 51: 83–128.
- Breddam, K., Sorensen, S. B. and Ottensen, M. 1985. Isolation of carboxypeptidase II from malted barley by affinity chromatography. *Carlsberg Res Commun.* 50: 199–209.
- Breddam, K., Sorensen, S. B., and Ottensen, M. 1983. Isolation of carboxypeptidase from malted barley by affinity chromatography. *Carlsberg Res Commun.* 48: 217–230.
- Buttazzoni, S. M., and Caffani, O. N. 1982. Panorama actual de las enzimas proteolíticas vegetales. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 1:23-38.
- Bytof, G., Biehl, B., Heinrichs, H., and Voigt, J. 1995. Specificity and stability of the carboxypeptidase activity in ripe, ungerminated seeds of *Theobroma cacao* L. *Food Chem* 54:15-21.
- Cheng, T., Ramakrishnan, V., Chan, S. 1999. Purification and characterization of cobalt-activated carboxipeptidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Protein Science* 8: 2474-2486.

- Coligan, J. 1995. In: Current Protocols in Protein Science. John Wiley and Sons. Unit i.1.
- Davies, H. V., Slack, P. T. 1981. The control of food mobilization in the seed of dicotyledonous plants. *New Phytol.* 88:41-51.
- 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.
- Diogo, M. M., Queiroz, J. A., and Prazeres, D. M. F. 2002. Hydrophobic interaction chromatography of homo-oligonucleotides on derivatized Sepharose CL-6B. Application of the solvophobic theory. *J. Chromatogr. A.* 944: 119–128.
- Doi, E., Komori N., Matoba T., Morita Y. 1980. Purification and some properties of a carboxypeptidase in rice bran. *Agric Biol Chem* 44: 85–92.
- Dominguez, F and Cejudo, F. J. 1999. Patterns of starchy endosperm acidification and protease gene expression in wheat grains following germination. *Plant Physiol,* 119: 81–87.
- Drzymała, A and Bielawski, W. 2009. Isolation and characterization of carboxypeptidases III from germinating triticales grains. *Acta Biochim Biophys,* 41: 69–78.
- Drzymała, A., Prabucka, B and Bielawski W. 2005. Carboxypeptidases of germinating triticales grains. *Acta Physiol Plant,* 27: 539–547.
- Drzymała, A., Prabucka, B., Gajo, I and Bielawski, W. 2008. Endogenous action of cysteine endopeptidase and three carboxypeptidases on triticales prolamins. *Cereal Chem.* 85: 366–371.
- Duguma, B., Gochowski J., Bakala, J. 2001. Smallholder cacao (*Theobroma cacao* Linn.) cultivation in agroforestry systems of West and Central Africa: Challenges and opportunities. *Agrofor Syst* 51:177–188.
- Enari, T. M. 1980. "Break-down. of proteins during malting and mashing". *Proc.European Brewery Convention.* Monograph-VI. Helsinki, 88-98.
- Endrizzi, J. A., Breddam, K., Remington, S. J. 1994. 2.8-Å structure of yeast serine carboxypeptidase. *Biochemistry* 33: 11106–11120.
- FAOSTAT 2006. <http://apps.fao.org>

- Feller, U., Soon, TST and Hageman, R. H. 1978. Patterns of proteolytic enzyme activities in different tissues of germinating corn (*Zea mays* L), *Planta (Heidelberg)* 140, 155-162.
- Forsyth, W. G. C., Quesnel, V. C and Roberts, J. B. 1958. The interaction of polyphenols and proteins during cacao curing. *J Sci Food Agric* 9:181–184.
- FNC. 2003. Foro Nacional Cacaotero.
- Garcia-Carreño, F.L. 1992. Protease inhibition in theory and practice. *Biotechnol.* 58, 87-106.
- Haddar, A., Bougatef, A., Agrebi, R., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M. 2009. A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and characterization. *Process Biochem.* 44:29-35.
- 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.
- Hammerton, R. W and Ho T-H. D. 1986. Hormonal regulation of the development of protease and carboxypeptidase activities in barley aleurone layers. *Plant Physiol*, 80: 692–697.
- Hansen, C. E., Mañez, A., Burri, C and Bousbaine, A. 2000. Comparison of enzyme activities involved in flavor precursor formation in unfermented beans of different cocoa genotypes. *J Sci Food Agric* 80:1193-1198.
- Hansen, C. E., del Olmo M. and Burri, C. 1998. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *J Sci Food Agric* 77:273-281.
- Hayashi, R. 1976. Carboxypeptidase Y. *Methods Enzymol* 45: 568-582.
- Hayashi, R., Bai Y., Hata, T. 1975. Evidence for an essential histidine in carboxypeptidase Y. Reaction with the chloromethyl ketone derivative of benzyloxycarbonyl-L-phenylalanine. *J Biol Chem.* 250: 5221–5226.
- Herrera, J., Alizaga, R., Guevara, E., Jiménez, V. 2006. Germinación y crecimiento de la planta. 1ª. Ed. Editorial Universidad de Costa Rica. Costa Rica. pp. 18-22.
- Hoemann, Z. 1976. Penicillocarboxypeptidases S-1 and S-2. In: *Methods Enzymol.*, L. Lorand, ed., Academic Press, vol. XLV pp. 587-599.

<http://www.merriamwebsternr.mx>

- Ihle, J. N., Dure, L. S. 1972. The developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination. 11. Catalytic properties of the cotton carboxypeptidase. *J Biol Chem* 247: 5041-5047.
- ITC. 2001. Cocoa. A Guide to trade practices. International Trade Centre. Product and Market Development. Geneva. pp.180.
- 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.
- Kishimura, H., Hayashi, K., Ando, S. 2006. Characteristics of carboxipeptidase B from pyloric of the starfish *Asterina pectinifera*. *Food Chem* 95:264-269.
- Krauss, U., Soberanis, W. 2001. Rehabilitation of diseased cacao field in Perú through shade regulation and timing of biocontrol. *Agrofor Syst.* 53:179–184.
- Krishna, M. M., Powell, N. B., and Borriello, S. P.1996. Cell surface properties of *Clostridium difficile*: haemagglutination, relative hydrophobicity and charge. *J. Med. Microbiol.* 44: 115–123.
- Kruger, J. E and Preston, K. R. 1977. The distribution of carboxypeptidase in anatomical tissue of developing and germinating wheat kernels, *Cereal Chem.* 54:167-174.
- Kubota, Y., Funakoshi T., Shoji S., Moriyama M and Ueki H. 1980. " Carboxypeptidases from the exocarp of mandarin orange. II. Chemical and enzymatic properties of carboxypeptidases C_{ua} and C_{ub}. *Chem. Pharm. Bull.* 12: 3479-3487
- Kubota, Y., Shoji S., Funakoshi T and Ueki H. 1973. Carboxypeptidase CN. I. Purification and characterization of the enzyme from the exocarp of *Citrus natsudaldai* Hayata. *J. Biochem.* 74: 757-770.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage TA. *Nature.* 227: 680-685.
- Lauer, I., Bonnewitz, B., Meunier, A., and Beverini, M. 2000. New approach for separating *Bacillus subtilis* metalloprotease and alpha-amylase by affinity chromatography and for purifying neutral protease by hydrophobic chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 737: 277–284.
- León, J. 2000. Botánica de los Cultivos Tropicales. Tercera edición. Costa Rica, San José, IICA. pp. 678-688.

- Liao, D., Breddam K., Sweet, R. M., Bullock, T., Remington, S. J. 1992. Refined atomic model of wheat serine carboxypeptidase II at 2.2-Å resolution. *Biochemistry* 31: 9796–9812.
- Liao, D., Remington, S. J. 1990. Structure of wheat serine carboxypeptidase II at 3.5-Å resolution. A new class of serine proteinase. *J Biol Chem* 265:6528–653.
- Liao, D-I and Reminton S. J. 1990. Structure of wheat serine carboxypeptidasell at 3,5- A° resolution. *J Biol Chem*, 265: 6528–6531.
- Liao, D-I, Breddam K, Sweet R. M., Bullock T and Remington S. J. 1992. Refined atomic model of wheat serine carboxypeptidase II at 2.2-A° resolution. *Biochemistry*, 31: 9796–9812.
- Liu, F., Tachibana, S., Taira, T., Ishihara, M and Yasuda, M. 2004. Purification and characterization of a new type of serine carboxypeptidase from *Monascus purpureus*. *J. Ind Microbiol Biotechnol* 31:23-28.
- López, A., Lehrian, D. W and Lehrian, L. V. 1978. Optimum temperature and pH of invertase of the seeds of *Theobroma cacao* L. *Rev Theobroma (Brazil)* 8:105–112.
- López-Andrade, P. A., V. H. Delgado-Nuñez and A. Azpeitia-Morales. 1996. El cacao (*Theobroma cacao* L.) en Tabasco. INIFAP-Huimanguillo, México.
- Lowry, O. H., Rasembrough, N. J., Farr, A.L., Randall, R. .J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biochen.* 193: 265-275.
- MacDonald, J. K., Schwabe, C. 1977. Intracellular exopeptidases. *In* AJ Barrett, ed, *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*. Elsevier/North-Holland, Amsterdam, The Netherlands, pp. 311-342.
- 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.
- Matoba, T., and Doi, E. 1974. Carboxypeptidase activity of tomato fruit during the ripening process and some enzymatic properties. *Agric Biol Chem* 38: 1901-1905.

- Matsumoto, I., Koyama, T., Kitagaki-Ogawa, H., and Seno, N. (1987) Separation of isolectins by high-performance hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr.* 400: 77–81.
- Mehta, R. A., Mattoo, A. K. 1996. Isolation and identification of ripening- related tomato fruit carboxypeptidase. *Plant Physiol* 110: 875-882
- Mehta, R. A., Warmbardt, R. D and Mattoo, A. K. 1996. Tomato fruit carboxypeptidase. Properties, induction upon wounding, and immunocytochemical localization. *Plant Physiol* 110: 883-892.
- Mikola, L. 1983. Germinating barley grains contain five acid carboxypeptidases with complementary substrate specificities. *Biochim Biophys Acta* 747:241-252.
- Mikola, L. 1986. Acid carboxypeptidase in grains and leaves of wheat, *Triticum aestivum* L. *Plant Physiol* 81:823-829.
- Mikola, L and Mikola J. 1986. Occurrence and properties of different types of peptidases in higher plants. *In* MJ Dalling, ed, *Plant Proteolytic Enzymes*, Vol 1. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 97-117.
- Mikola, L and Mikola, J. 1980. Mobilization of proline in the starchy endosperm of germinating barley grain. *Planta (Heidelb)* 149:149-154.
- 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.
- Mohr, W., Landschreiber, E and Severin, T, 1976. Zur Spezifität des Kakaoaromas. *Fett Wiss Technol.* 78:88-95.
- Mossu, G. 1990. Le cacaoyer. *Le Technicien d'agriculture Tropicale*. Editions Maisonneuve et Larose. p.159.
- Motamayor, J. C., Risterucci, A.M., López, P.A., Ortiz C. F., Moreno A and Lanaud, C. 2002. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 89: 380–386.
- Muck, A., Ramm, M., and Hamburger, M. 1999. Efficient method for preparation of highly purified lipopolysaccharides by hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 732: 39–46.

- Mullally, M.M., O'Callaghan, D. M., Fitzgerald, J., Donnally, W. J. and Dalton, J. P. 1995. Zymogen activation in pancreatic endoproteolytic preparations and a influence on some whey protein hydrolysate characteristics. *J. Food Sci.*, 60: 227-233.
- Müntz, K., Belozersky, M.A., Dunaevsky, Y.E., Schalereth, A and Tiedemann J. 2001. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *J. Exp. Bot.* 362:1741-1752.
- Nandi, S. K., Palni, L. M. S., Deklerk, J. M. 1995. The influence of the embryonic axis and cytokinins on reserve mobilization in germinating lupine sedes. *J. Exp. Bot.* 46: 329-226.
- Neurath H. 1989. The diversity of proteolytic enzymes. In: *Proteolytic Enzymes*. Beynon R.J. and Bond J.S. (Eds): IRL Press Oxford University. pp. 1-12.
- Nishimura M. and Beevers H. 1978. Hydrolases in vacuolas from castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 62: 44-48.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M, Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J. 1992. The α/β hydrolase fold. *Protein Eng* 5: 197–211.
- Rohan, T. A and Stewart, T. 1967. The precursors of chocolate aroma: production of reducing sugars during fermentation of cocoa beans. *J Food Sci* 32: 399-402.
- Osborne, T.B. 1924: *The Vegetable Proteins*. Longman, Green and Co., London.
- Pettipher, G. 1990. The extraction and partial purification of cocoa storage proteins. *Café Cacao Thé.* 34(1):23-26.
- Polgár, L. 1987. Structure and function of serine proteases. In: *Hydolytic Enzymes*. Neuberger A. and Brocklehurst K. (Eds). pp. 159-185.
- Preston, K. R and Kruger, J.E. 1976. Purification and properties of two proteolytic enzymes with carboxypeptidase activity in germinated wheat. *Plant Physiol.* 58: 516-520.
- Ramirez, O. A., Somarriba, E., Ludewigs, T. 2001. Financial returns, stability and risk of cacao-plantain-timber agroforestry systems in central America. *Agrofor Syst* 51:141–154.
- Ramirez-Zavala, B., Mercado-Flores, Y., Hernández-Rodríguez, C., and Villa-Tanaca, L. 2004. Purification and characterization of a serine carboxypeptidase from

- Kluyveromyces marxianus*. International Journal of Food Microbiology 91:245-252.
- Rawlins, N. D and Barret, A. J. 1994. Families of cysteine peptidases. Methods in Enzymology, 244, 461-487.
- Rawlins, N. D., Fraser, R. M and Barret, A. J. 2007. An introduction to peptidases and MEROPS database. In Industrial Enzymes. Springer (Eds) pp 161-179.
- Raynes, J. G and McAdam, K. P. 1988. Purification of serum amyloid A and other high density apolipoproteins by hydrophobic interaction chromatography. *Anal. Biochem.* 173: 116–124.
- Saheki, T and Holzer, H. 1975. Proteolytic activities in yeast. *Biochem. Biophys. Acta.* 348: 203-214.
- Salmia, M. A., Mikola, J. 1976. Activities of two peptidases in resting and germinating seeds of Scots pine, (*Pinus. Sylvestris*). *Plant.* 33: 261-265.
- Sánchez-Mundo, M. L. 2010b. Caracterización bioquímica de la actividad de Xaa-prolil dipeptidil aminopeptidasa (Xaa-Pro-DAP) de la semilla de cacao (*Theobroma cacao L.*)". Instituto Politecnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biologicas. Mexico. Tesis Doctoral p.55-57.
- Sanchez-Mundo, M. L., Bautista-Muñoz, C., Jaramillo-Flores, M. E. 2010a. Characterization of the exopeptidase activity existing in *Theobroma cacao L.* *Process Biochemistry* 45 (7):1156-1162.
- Schaller, A. 2004. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220:183-197.
- Schwimmer, S. 1995. Fifty-one years of food related enzyme research. A review. *J. Food Biochem.*, 29:1-25.
- 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.
- Shotwell, M. A., Larkins, B. A. 1988. The biochemistry and molecular biology of seed storage proteins. In the *Biochemistry of Plants. A comprehensive Treatise*, Vol. 15, ed. A Marcus Academic Press, New York, pp. 297-345.
- Shutov, A. D., Vaintraub, I. A., 1987: Degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry* 26:1557-1566.

- Soberanis, W., Ríos, R., Arévalo, E., Zúñiga, L., Cabezas, O., Krauss, U. 1999. Increased frequency of phytosanitary pod removal in cacao (*Theobroma cacao*) increases yield economically in eastern Peru. *Crop Protec* 18:677–685.
- Sørensen, S. B., Svendsen, I and Breddam, K. 1989. Primary structure of carboxypeptidase III from malted barley. *Carlsberg Res Commun*, 54: 193–202.
- Soria, J. V. 1970. Principal varieties of cocoa cultivated in Tropical America. *Cocoa Grower's Bull* 15:12–21
- Spencer, M. E and Hodge, R. 1992. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the major storage proteins of *Theobroma cacao*. *Planta*, 186: 567-576.
- Srivastava, M. L. 2002. *Plant Growth and Development*. 1^a. Ed. Academi Preess. Elsevier Science, San Diego California 19:447-469.
- Stanton, P. 2004. Ion-Exchange Chromatography. *Methods in Biology*, vol. 251. Ed. M.-1 Aguilar Humana Press Inc., Totowa, NJ. pp 23-43.
- Stryer L., Mark B. J., Tymoczko. *Bioquímica*. 5^a Edición. España: Reverte Eds.
- Tate, J. A., Aguilar, J. F., Wagstaff, S. J., La Duke, J. C., Bodo Slotta, T. A., Simpson, B. B. 2005. Phylogenetic relationships within the tribe Malveae (Malvaceae, subfamily Malvoideae) as inferred from ITS sequence data. *Am J Bot* 92:584–602.
- Toxopeus, H. 1985. *Botany. Types and population in Cocoa*. London. Longman. p. 11-37.
- UNCTAD. 2005. Based on the data from International Cocoa Organization, quarterly bulletin of cocoa statistics 2004-05. <http://www.unctad.org>.
- Valls, L. A., Hunter, C. P., Rothman, J. H., Stevens, T. H. 1987. Protein sorting in yeast: the localization determinant of yeast vacuolar carboxypeptidase Y resides in the propeptide. *Cell*48: 887-897.
- Van der Hoorn, R. A. 2008. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 59:191–223. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092835.
- Voigt J and Biehl B. 1993. The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. *Food Chem* 47:145-151.

- Voigt, J., Biehl, B., Heinrichs, H., Kamaruddin, S., Gaim Marsoner, G., Hugi A. 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., Heinrichs, H., Voigt, G., Biehl, B. 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., Kamaruddin S., Heinrichs H., Wrann D., Senyuk V., Biehl B. 1995. Developmental stage-dependent variation of the levels of globular storage protein and aspartic endoprotease during ripening and germination of *Theobroma cacao* L. seeds. *J Plant Physiol* 145:299–307.
- Walker-Simmons M and Ryan CA. Isolation and properties of carboxypeptidase from leaves of wounded tomato plants. *Phytochemistry* 1980, 19: 43–47.
- Webb, J. L. 1963. Mercurials. In: *Enzyme and metabolic inhibitors*. Academic Press, Vol. II, pp. 729
- Welling, G. A. W. K., Van der Zee, R., and Welling-Wester, S. 1987. Column liquid chromatography of integral membrane proteins. *J. Chromatogr.* 418: 223–243.
- Whitaker, J. R. 1994. The Proteolytic Enzymes. Cap. 19 In: *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, 2a Ed. Marcel Dekker, Inc. pp. 469-497.
- Wilden, W. V., Herman, E. M. and Chrispeels, M. J. 1980. Protein bodies of mung bean cotyledons as autophagic organelles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 77, 428-432.
- 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.
- Wilson, K. A., Rusell, M., Quackenbush, J. F., and Tan-Wilson, A. 1995. Characterization of carboxypeptidase I of mung bean seeds. *Seed Science Research*. 5:209-218.
- Wilson, M. J., Haggart, C. L., Gallagher, S. P., and Walsh, D. 2001. Removal of tightly bound endotoxin from biological products. *J. Biotechnol.* 88: 67–75.

- Wu, S. L., Hancock, W. S., Pavlu, B., and Gellerfors, P. 1990. Application of highperformance hydrophobic-interaction chromatography to the characterization of recombinant DNA-derived human growth hormone. *J. Chromatogr.* 500: 595–606.
- Zuber, H. 1964. Purification and properties of a new carboxypeptidase from citrus fruit. *Nature* 201: 613-615.

X. ANEXOS

Fórmula para calcular las actividades enzimáticas de tcCP, tcAPE, tcDAP.

Actividad total (U/ml).

$$\text{U/ml} = \frac{(\text{Abs}_{405 \text{ nm}}) (\text{factor de dilución}) (\text{Factor de la curva tipo de } p\text{-nitroanilida})}{\text{Tiempo de incubación}}$$

Actividad específica (U/mg Proteína total)

$$\text{U/mg Proteína total} = \frac{\text{U/ml}}{\text{mg/ml de Proteína total}}$$

Fórmula para determinar la actividad enzimática de tcAP

Actividad total (U/mL)

$$\text{U/mL} = \frac{(\text{Abs}_{405 \text{ nm}}) (\text{factor de dilución}) (\text{Factor de la curva tipo de } p\text{-nitroanilida})}{\text{Tiempo de incubación}}$$

Actividad específica (U/mg de Proteína total)

$$\text{U/mg Proteína total} = \frac{\text{U/ml}}{\text{mg/ml de Proteína total}}$$

Fórmula para determinar la concentración de la proteína total (mg/ml de Proteína total)

Actividad total (U/ml)

$$\text{mg/mL} = \frac{(\text{Abs}_{660 \text{ nm}}) (\text{Factor de dilución}) (\text{Factor de la curva de albúmina})}{1000}$$

1. Factor de la curva tipo de *p*-nitroanilida = 110
2. Factor de la curva tipo de albúmina = 95.04
3. Factor de la curva tipo de Tirosina = 23.36