

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y CINÉTICA DE LISIL OXIDASA
DE CALAMAR GIGANTE (*Dosidicus gigas*) Y SU RELACIÓN CON
EL COLÁGENO PRESENTE**

POR:

WILFRIDO TORRES ARREOLA

**TESIS APROBADA POR LA
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN
ANIMAL**


**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

HERMOSILLO, SONORA

MAYO DEL 2010

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Wilfrido Torres Arreola, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



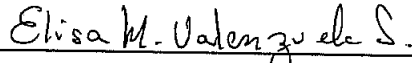
Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director de Tesis



Dra. Josafat Marina Ezquerria Brauer

Co-director de Tesis




Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto

Asesora



Dra. Ofelia Rouzaud Sanchez

Asesora



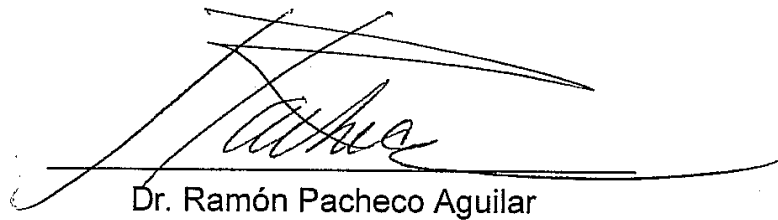
Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo

Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar crédito al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de tesis.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Pacheco', is written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico durante mis estudios de doctorado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), en especial a la coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal por brindarme la oportunidad de culminar mis estudios.

A Dios, por permitirme la fortuna de terminar satisfactoriamente una mas de mis metas y dar un paso mas en mi formación profesional.

A mi director de tesis, Dr. Ramón Pacheco Aguilar que contribuyó enormemente en mi formación durante esta etapa. Muchas gracias por permitirme formar parte de las filas del LCPP.

A la Dra. Marina Ezquerro, no solo por ser mi co-directora en este trabajo y una de las piezas más importante durante mi formación como investigador, sino por brindarme su amistad y apoyo incondicional en todo momento de mi vida personal y académica.

Al Dr. Rogerio Sotelo por las excelentes aportaciones echas al trabajo, principalmente por ser el primero en apoyarme y orientarme al inicio de esta investigación.

A la Dra. Elisa Valenzuela, por compartir su experiencia conmigo. Agradezco su amable disposición a brindarme el tiempo necesario para que pudiera salir adelante en los momentos mas complicados dentro y fuera del laboratorio.

A la Dra. Ofelia Rouzaud, le agradezco de todo corazón por estar al pendiente de mi formación profesional, desde mis estudios de licenciatura, siempre con una gran disposición de ayudarme.

A las investigadoras asociadas del LCPP, muchas gracias por cuidarme y apapacharme en todo momento, cada una con su muy particular estilo.

- *A la maestra Gisela Carvallo por su apoyo técnico durante todos los muestreos (dentro y fuera del mar), muchas gracias por su profesionalismo... Pero sobre todo por brindarme su amistad.*
- *A la maestra Guillermina García que fue un pequeño sargento dentro del laboratorio, también fue la primera en hacerme sentir en confianza a mi llegada... Muchas gracias por ser la mamá de todos en el laboratorio.*
- *A la maestra María Elena Lugo mi mas sincero agradecimiento por los excelentes momentos de convivencia y por brindarme su amistad... Muchas gracias por aguantarme el tiempo que invadí su cubículo.*

A los integrantes del LCPP, los doctores: Juan Carlos Ramírez, Teresa Gollas y Susana Scheuren, muchas gracias por las atinadas observaciones echas a este trabajo. Además de los excelentes momentos de convivencia en la planta piloto. También a la Dra Ana María Calderón por compartir su experiencia y profesionalismo conmigo.

A las M.C. Mónica Villegas, Karina García y Ciria Figueroa por el apoyo técnico y práctico durante las diferentes etapas de mi trabajo experimental.

A mis compañeros de laboratorio, los que ya se han ido y los que se quedan: Santiago Valdez, Celia Olivia García, Juan Antonio Cortez, Angélica Ávila, Iván Guillermo Ortiz, Marco Santis, Lucina Ledezma y Hugo Ramírez por los buenos momentos que compartimos, un agradecimiento muy especial para ellos.

Al personal de docencia y biblioteca, Laura Elizabeth García, Argelia Marín, Verónica Araiza, Héctor Galindo, Luis Conde, Gerardo Reyna y Fernando Leyva, por brindarme su ayuda y orientación a lo largo de mi estancia en el CIAD. También a Faby Gil Lamadrid, Héctor Cota y María Eugenia López por su apoyo durante los últimos 3 años. Siempre con la mejor disposición.

Dicen que los amigos son la familia que uno escoge, un agradecimiento muy especial a mis amigos, que desde hace años se han convertido en parte de mi familia:

- *A Elva Jeanette (mi primita), Ana Gloria (con todo y muecas) y Aristeo Villalobos, quienes se convirtieron en mis hermanitos dentro del laboratorio, siempre me apoyaron en los momentos mas complicados. Muchas Gracias por todo. También a Enrique Márquez (Dr tin) por ser primero un excelente compañero y después un verdadero amigo, de quien he aprendido muchas cosas (unas buenas y otras no tanto jeje).*
- *A los revueltos (y no tan revueltos), Luis Castillo, Erika Acosta, Ismael Amaya, Hilda Gracia, Antonio G. Triana, Roberto Rodríguez, Maritza Álvarez, Daniel Godínez y Jesus Tanori, por su honesta y fiel amistad, aun siendo tan diferentes hicimos un buen equipo. O no mi Rober?*
- *A mis excompañeras y amigas, Miroslava Suarez, María Elena Heras, Zulema Morales, Beatriz Montaña y Hiessu García. Muchas Gracias por los agradables momentos de “sana” diversión que pasamos.*
- *A mis hermanos: Ramón Gutiérrez, por demostrarme siempre su amistad y apoyo incondicional durante los momentos más difíciles. A Zulema Valencia por su honesta y fiel amistad, muchas gracias por hacerme parte de su familia. A Francisco Cabrera por ser más que un amigo, dispuesto a ayudarme y orientarme desde los años de maestría en el DIPa hasta los de doctorado en el CIAD, es un placer conservar su amistad.*

A Oliviert Martínez por todo lo que me ayudó durante los últimos 2 años de mi doctorado. Su apoyo incondicional y desinteresado hacen que agradezca infinitamente a Dios haberla conocido. Siempre voy a estar en deuda contigo, MUCHAS GRACIAS Oly.

DEDICATORIA

*Quiero dedicar este trabajo a mis padres,
quienes sin escatimar esfuerzo, han sacrificado
gran parte de su vida para formarme y educarme.*

*A quienes su ilusión
ha sido convertirme en una persona de provecho,
nunca podré pagar todos sus desvelos ni aún
con las riquezas más grandes del mundo.*

*Ustedes me han dado todo sin esperar nada a cambio.
No hay mayor riqueza que el amor, apoyo y comprensión
que me brindan, eso es todo lo que necesito para salir adelante.*

*Silvia y Marco Antonio,
MUCHAS GRACIAS.*

A MI FAMILIA:

Por darme todo su apoyo y confianza no solo en esta etapa de mi vida, sino en todas las que he pasado. Este logro no es solo mío sino también de ustedes. Les dedico con mucho cariño este trabajo. Especialmente a mi tío Alberto Arreola[†], con toda mi admiración y respeto, hasta donde quiera que se encuentre.

Tabla de contenido

SINOPSIS.....	ix
CAPÍTULO 1: Caracterización parcial de la estructura del colágeno presente en el músculo fresco de tres regiones anatómicas del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	xxxii
Torres-Arreola, W., Pacheco-Aguilar R., Sotelo-Mundo, R., Rouzaud-Sandez, O. & Ezquerro-Brauer, M. (2008) Caracterización parcial del colágeno extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>). <i>Ciencia y Tecnología Alimentaria</i> 6 , 101-108.	
CAPITULO 2: Detección y evaluación de actividad de lisil-oxidasa en el músculo de tentáculos de calamar gigante.....	xxxii
Torres-Arreola, W., Ezquerro-Brauer, M.; Valenzuela-Soto, E. M., Garcia-Sanchez, G. & Pacheco-Aguilar R. Lysyl Oxidase from jumbo squid (<i>Dosidicus gigas</i>) muscle: Detection and partial Purification. <i>Journal of Food Science and Technology</i> (Manuscript, 2010).	
CAPITULO 3. Purificación de lisil-oxidasa del músculo de calamar gigante: evaluación de sus constantes cinéticas y estabilidad bioquímica	xxxiii
Torres-Arreola, W., Ezquerro-Brauer M., Pacheco-Aguilar R., Rouzaud-Sandez O., Sotelo-Mundo R., Figueroa-Soto C.G. & Lugo-Sanchez M. Characterization of Lysyl oxidase purified from jumbo squid (<i>Dosidicus gigas</i>) muscle. <i>Food Chemistry</i> (Manuscript, 2010).	

Nota de la numeración: Los números romanos en la parte central inferior corresponden a los que se señalan en la tabla de contenido. Los números arábigos corresponden a la numeración del artículo según el formato de numeración propia la revista donde fue publicado.

SINOPSIS

Las proteínas son el centro de la acción en diferentes procesos biológicos, pudiendo tener función catalítica, regulatoria y estructural. Dentro de las proteínas estructurales se encuentra el colágeno, el cual provee a huesos, tendones y ligamentos sus características. El colágeno está compuesto por tres cadenas que forman una triple hélice y se caracteriza por ser una de las pocas proteínas que contiene hidroxiprolina e hidroxilisina. Esta última, junto con la lisina forman enlaces covalentes induciendo el entrecruzamiento entre una triple hélice y otra. La enzima responsable de este entrecruzamiento en la molécula de colágeno es la lisil oxidasa (LO; EC 1.4.3.13), La prolina e hidroxiprolina están relacionadas con la estabilidad del colágeno, a mayor contenido de estos, la estabilidad de la proteína es mayor. Se ha demostrado que hay una gran diferencia en cuanto al contenido y concentración de aminoácidos, así como en la estabilidad térmica entre el colágeno de los animales terrestres y los acuáticos.

Colágeno de organismos marinos

El contenido de colágeno en organismos marinos es menor que en mamíferos, variando del 1 al 12% de la proteína y entre el 0.2 y 2.2 % del peso del músculo (Haard, 1995). Se ha demostrado que el colágeno juega un papel importante en el mantenimiento de la estructura del músculo y está estrechamente relacionado con la capacidad natatoria de los peces (Sato y col., 1989), ya que proporciona la fuerza tensil del músculo (Yoshimura y col., 2000; Espe y col., 2003; Duodu y col., 2004).

El colágeno de organismos acuáticos es heterogéneo en composición, sus características varían entre especies. Los colágenos tipo I y V frecuentemente forman parte del tejido conectivo de los organismos marinos. No se ha encontrado en cantidades detectables el tipo III, abundante en mamíferos (Mizuta y col., 2004).

Montero y col. (2000) aislaron y caracterizaron parcialmente dos tipos de colágeno (I y V) en cefalópodos, encontraron mayor concentración en los brazos que en el manto. Esto atribuido posiblemente a la función que llevan a cabo en el organismo vivo. La edad y el sexo también afecta el contenido de colágeno, por ejemplo en el manto del calamar volador (*Illex coindetii*) los machos tienen mas colágeno mientras que en los brazos sucede lo contrario. Todo lo anterior refuerza la teoría de que el contenido de colágeno presenta una gran variación entre especies, e incluso dentro de la misma especie (sexo, estado de madurez, periodo estacionario o región dentro del mismo organismo).

Estabilidad térmica. Los músculos de animales terrestres y acuáticos difieren en su composición química, por lo que se puede suponer que el colágeno de organismos acuáticos posee diferencias en su estructura química comparado con el terrestre.

El colágeno de organismo marinos tiene una mayor concentración de aminoácidos esenciales y menor contenido de hidroxiprolina y prolina, siendo estos últimos los que le confieren la estabilidad térmica (Badii, y Howell, 2003; Sikorski, y Borderias, 1994; Doeringy col., 1982).

Badii y Howell (2003) caracterizaron el colágeno del músculo de bacalao (*Gadus morua*), encontraron una composición de aminoácidos muy similar entre la fracción soluble en sal con respecto a la soluble en ácido. Estos resultados fueron similares a los reportados por Sikorski, y Borderias en 1994. Por otra parte, las diferentes especies de cefalópodos, también presentan características muy similares en cuanto a la composición aminoácida de su colágeno. Montero y col. (2000) caracterizaron 2 tipos de colágeno en manto y brazos de calamar y pulpo, sin encontrar diferencias entre ellos. Los autores concluyeron que la composición de aminoácidos no difiere entre esas especies, lo cual sugiere que se trata de colágeno del mismo tipo. Los mismos resultados han sido reportados para diferentes especies de tiburón, donde la composición de aminoácidos en colágeno extraído de cartílago de tiburón bambú (*Chiloscyllium punctatum*) fue muy similar al de tiburón macuira (*Carcharhinus limbatus*). Ambos contienen colágeno tipo I y II en una relación 2:1 (Kittiphattanabawon y col., 2010).

Nomura y col. (2000) llevaron a cabo una serie de estudios donde se compararon las propiedades del colágeno tipo I de tiburón azul (*Prionace glauca*) con el de cerdo. Los resultados indicaron que el colágeno proveniente de tiburón presentó una menor temperatura de desnaturalización, lo cual se explica por su menor contenido de prolina e hidroxiprolina. Sin embargo, el colágeno (tipo I) extraído de escamas de carpa (*Cyprinus carpio*) presentó una estabilidad térmica similar al de piel de cerdo. Cabe mencionar que la Carpa es un pez de agua dulce que vive a temperaturas que oscilan desde los 5°C en invierno hasta los 45°C en verano (Pati y col., 2010). El colágeno extraído de espina de bacalao (*Gadus morua*) tiene una temperatura de desnaturalización inferior a los 15 °C que es un

valor característico para colágeno extraído de especies de aguas frías (Zelechowska y col., 2010).

Solubilidad. La solubilidad del colágeno de organismos marinos ha sido ampliamente estudiada (Ando y col., 2006; Badii y Howell, 2003; Montero y col., 2000; Nagai y col., 2001; Montero y Borderias, 1990; Sikorski y col., 1984). Es generalmente más alta que en organismos terrestres, además no es afectada por la edad del animal, como ocurre en colágeno de mamíferos. Sin embargo, ésta puede ser afectada por el periodo estacional del año, debido a la madurez sexual del organismo (Sikorski y Borderias, 1994).

El colágeno de los organismos marinos es soluble en soluciones salinas y ácidas diluidas (Kolodziejska y col. 1999). Dicho comportamiento es atribuido a la región muscular de la cual proviene el colágeno (*endomisio, perimisio o miotomos*) (Sikorski y Borderias, 1994).

En un estudio realizado por Sato y col. (1989), en el cual se determinó el grado de solubilidad en ácido de la molécula de colágeno del músculo de pescado, se reportaron valores que oscilan entre 23 y 73% con un valor promedio aproximado de 57% (Sikorski y Borderias, 1994). Esta información indica la gran variabilidad que puede llegar a presentarse entre diferentes especies de organismos marinos. La solubilidad de la proteína también puede verse afectada por el manejo *post-captura* del producto.

Al igual que en músculo de pescado, los cefalópodos también presentan una amplia variabilidad en solubilidad de la molécula de colágeno. Montero y col. (2000) reportan diferencias en la solubilidad del colágeno del calamar volador,

siendo mayor en manto que en los brazos. En términos generales, se ha reportado una mayor solubilidad del colágeno presente en el manto y en organismos jóvenes (Montero y col., 2000), lo cual puede indicar un mayor grado de entrecruzamiento del colágeno en los tentáculos y especímenes adultos.

Factores que afectan la solubilidad del colágeno. Una importante modificación proteica a nivel estructural es el mecanismo de entrecruzamiento, que ocurre intra o intermolecularmente. Estos cambios en el colágeno pueden presentarse durante el crecimiento y desarrollo del animal, o bien durante el manejo post-captura del producto (Badii y Howell, 2003; Ando y col. 2001).

Ando (1997) reportó que aproximadamente el 70% del colágeno del manto de calamar no se solubilizó después de 30 min en agua hirviendo, detectando las fibras del colágeno bajo observación al microscopio electrónico. Lo anterior indica que en el músculo de calamar existe un “colágeno termoestable” y que el músculo de calamar, después de la cocción presenta características diferentes al de pescado, ya que es relativamente duro y no se torna frágil durante el calentamiento.

En un estudio realizado por Ando y col. (2001) donde aislaron tejido conectivo del manto de varias especies de calamares (*Loligo forbesii*, *Loligo pealei*, *Sepia pharaonis* y *Sepia officinalis*) reportaron que un 45-70% de colágeno no se solubilizó después de 30 min de calentamiento, manteniendo sus estructuras intactas. En este trabajo se cuantificó la presencia de una molécula que forma parte de las fibras del colágeno, llamada piridinolina (Belitz y Grosch, 1999); responsable del entrecruzamiento covalente de la molécula de colágeno

(Eyre y col., 2005; Ando y col., 2001; Fujimoto y col., 1977). Se detectó una mayor concentración en la fracción de colágeno insoluble después del periodo de calentamiento, lo cual hizo suponer que la piridinolina tiene influencia en la estabilidad térmica del colágeno del manto en los calamares estudiados y que esto a su vez influye en la textura del músculo. Sin embargo, establecen que se requiere realizar estudios adicionales acerca del comportamiento de dicha molécula, ya que no se tiene elucidado el mecanismo de formación durante el manejo post-captura del producto (Ando y col., 2001).

El mecanismo de formación de la piridinolina ha sido ampliamente estudiado en mamíferos (Eyre y col., 2005). Hay pocos estudios realizados en especies marinas donde se elucide dicha reacción, la cual se inicia por un mecanismo enzimático a través de la enzima lisil oxidasa.

Lisil Oxidasa (LO)

La piridinolina, molécula relacionada con el entrecruzamiento de la molécula del colágeno, es producida a partir de la oxidación de los aminoácidos lisina e hidroxilisina por acción de la LO la cual cataliza la eliminación del grupo amino libre del aminoácido para generar un grupo aldehído. Los pasos subsecuentes de la reacción se llevan a cabo entre los mismos productos de la oxidación y aminoácidos (lisinas o hidroxilisinas) de otras moléculas de colágeno (Smith-Mungo & Kagan, 1998; Kagan & Li, 2003).

Biosíntesis de lisil oxidasa. La lisil oxidasa es sintetizada dentro de la célula como una pre-proenzima de 46 kDa, seguido de una glicosilación dentro de

la región del propéptido, dando como resultado una proenzima de 50 kDa. Posteriormente es secretada al ambiente extracelular, donde es procesada por medio de una metaloproteasa (Pachenko y col., 1996) para finalmente dar lugar a una enzima activa con un peso molecular que puede variar entre 28 y 32 kDa, dependiendo de la especie de la cual se extrae. La enzima activa es acompañada de un péptido de menor peso molecular (24 kDa) resultado de la hidrólisis enzimática antes mencionada (Uzel y col., 2001; Palamakumbura y Trackman, 2002; Kagan y Li, 2003). La LO contiene un átomo de cobre (Cu^{+2}) presente en su estructura proteica, el cual le confiere a la enzima una mayor eficiencia durante la actividad enzimática. Dicho comportamiento se comprobó al separar el cobre de la proteína, lo que provocó pérdida de la actividad enzimática. Una vez libre de metales, la enzima inactiva fue reactivada por medio de la adición de cobre. La adición de otros cationes divalentes no mostró el mismo efecto, por lo que el cobre se considera un cofactor esencial para un adecuado funcionamiento de lisil oxidasa (Gacheru y col., 1990; Smith-Mungo y Kagan, 1998). La enzima también contiene covalentemente unido al grupo carbonilo prostético lisil tirosil quinona (LTQ) (Fig. 1) el cual ha sido identificado como cofactor durante el mecanismo de catálisis (Wang y col., 1996)

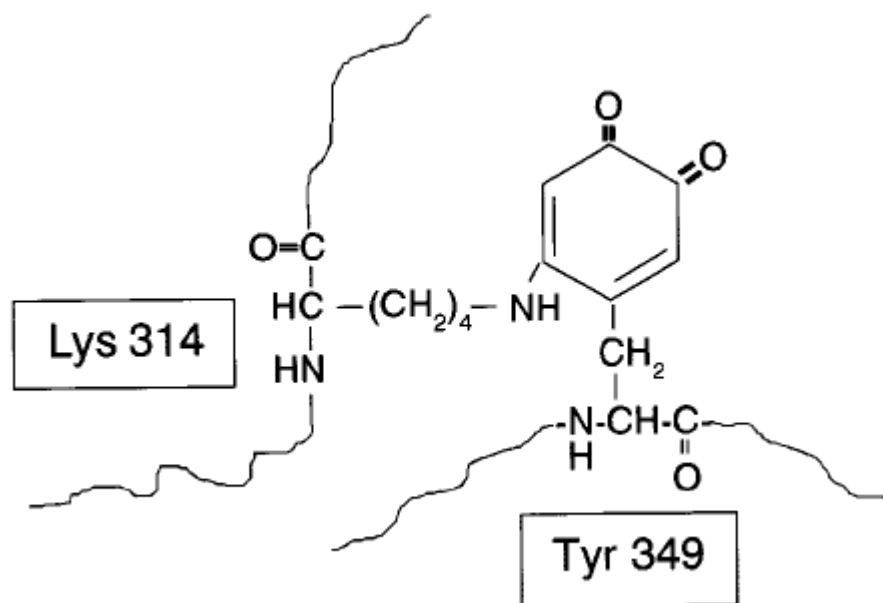
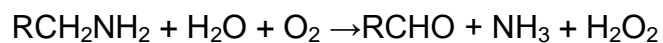


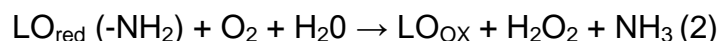
Figura 1. Lisil tirosil quinona (LTQ), cofactor de lisil oxidasa LO presente en el sitio activo.

Mecanismo de acción. La oxidación del grupo amino es catalizada por LO siguiendo un mecanismo cinético ping pong (Williamson y Kagan, 1986). La estequiometría de la reacción catalizada por LO es:



la cual involucra 2 etapas para completar el ciclo catalítico. Durante la primera parte de la reacción, el grupo amino del sustrato se enlaza al sitio activo de la enzima a través de la LTQ (cofactor). Seguido de la remoción de un hidrógeno del sustrato enlazado para posteriormente convertirlo en un aldehído el cual permanece unido en forma de aldimina al cofactor reducido. Dicho enlace es posteriormente eliminado por medio de una hidrólisis liberando el producto (aldehído) y dejando el grupo amino atado a la enzima reducida. Después, en la

segunda parte de la reacción, oxígeno molecular (O_2) se enlaza a la enzima reduciendo el grupo amino y mediante hidrólisis se forman los productos finales de la reacción (peróxido de hidrógeno y amoníaco) donde la enzima regresa a su estado original (oxidada) (Trackman y col., 1981; Williamson y Kagan, 1986; Kagan y Li, 2003). Este mecanismo puede ser resumido de la siguiente manera:



Aún cuando se sabe que el cobre es esencial durante el mecanismo de catálisis, su función no ha sido elucidada por completo. Se ha reportado que es un eficiente mediador de la transferencia de electrones desde las quinonas reducidas hasta el oxígeno para formar peróxido de hidrógeno, por lo cual posiblemente participa en la re-oxidación de LO_{red} durante la segunda parte de la reacción (Kagan y Li, 2003). Sin embargo, la formación del grupo aldehído al inicio de la catálisis también requiere la presencia de cobre a pesar de que no se da dicha transferencia de electrones en esta etapa de la reacción (Shah y col., 1993). Por lo tanto, el cobre podría jugar un papel muy importante durante la primera etapa de la reacción, posiblemente orientando el grupo amino del sustrato con el cofactor LTQ (Kagan y Li, 2003).

Propiedades estructurales. Inicialmente no fue posible purificar LO del tejido conectivo debido a su insolubilidad en soluciones salinas neutras. Se detectó que la enzima se solubiliza rápidamente en buffers conteniendo entre 4-6 M de urea (Narayanan y col., 1974), lográndose de esta forma establecer un esquema de purificación a homogeneidad (Kagan y Li, 2003).

El cofactor LTQ, además de ser esencial durante el mecanismo de catálisis de la LO, le proporciona una alta estabilidad a la enzima durante el proceso de extracción y purificación con urea. Lo anterior debido a que presenta un entrecruzamiento covalente en el sitio activo, (Figura 1) (Trackman y col., 1981; Wang y col., 1996; Dove y Klinman, 2001). Esta configuración también contribuye de manera importante en la estabilidad térmica de la enzima, reflejada en su temperatura óptima de actividad (55°C utilizando un sustrato sintético) y su elevada temperatura de desnaturalización (>90°C) (Duff y col., 2006).

Especificidad por el sustrato. Los aminoácidos que rodean a los residuos de lisina dentro de moléculas de elastina y colágeno pueden variar ampliamente, así como la estructura tridimensional de la proteína, lo cual sugiere una baja especificidad de la LO, puede ser flexible y oxidar una amplia variedad de proteínas globulares básicas. La actividad de la enzima se ve influenciada particularmente por la longitud del péptido, lográndose observar una mayor eficiencia catalítica a medida que aumenta el tamaño de la proteína (Nagan y Kagan, 1994). Por otra parte, la LO tiene una alta afinidad por proteínas con punto isoeléctrico superior a 8 y no presenta actividad sobre proteínas con punto isoeléctrico menor a 8 (Kagan y col., 1984).

Lisil Oxidasa en Organismos Marinos

Desde que la LO fue descubierta en los organismos terrestres (Pinnell y Martin, 1968) las investigaciones sobre esta enzima se han enfocado en su afinidad específica por sustratos como colágeno y elastina, definiendo protocolos de

purificación, propiedades fisicoquímicas y mecanismo de catálisis en la aorta de bovino, piel de cerdo y humanos (Kagan, 1986; Kagan y Trackman, 1991; Kagan y col., 1995). Sin embargo, su purificación en organismos acuáticos no está documentada en la bibliografía. Existen reportes acerca de su presencia en peces como pez cebra y salmón del atlántico (*Salmo salar*) (Consuegra y Johnston, 2006; Reynaud y col., 2008; van Boxtel y col., 2010). Dichos estudios se han enfocado a la sobre expresión del gen, pero no se reporta un proceso de aislamiento, purificación y caracterización de la enzima a partir de dichos organismos. La enzima obtenida mediante técnicas de ingeniería genética presenta algunas características similares a las reportadas para mamíferos. Reynaud y col. (2008) encontraron que el gen de LO extraído de pez cebra y sobre expresado en células HeLa, puede secretar una proteína y procesarla como una pro-enzima con un peso molecular de 50 kDa y una enzima activa de 32 kDa.

En el músculo del calamar se ha sugerido la presencia de LO debido a las elevadas concentraciones de piridinolina presente en las fibras de colágeno (Ando y col., 2001). La presencia de piridinolina repercute directamente en la textura del músculo de calamar, sin tenerse aún reportes que comprueben la presencia de LO en éste organismo. Dentro de los calamares de mayor importancia comercial está la especie *Dosidicus gigas* de la cual se ha reportado que su músculo presenta propiedades de estabilidad térmica y textura diferentes a las de otras especies de calamares, por lo que existen aspectos no estudiados en los calamares, como es el de la detección, purificación y caracterización de la enzima lisil-oxidasa. Este tipo de investigaciones permite generar información imprescindible para explicar el papel que desempeña la piridinolina en el colágeno del músculo del calamar y

como esto se relaciona a su vez con las diferencias detectadas entre las especies de calamares, en cuanto a textura y estabilidad térmica.

Hipótesis

El músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) sintetiza lisil-oxidasa y su actividad tiene una estrecha relación con las características del colágeno.

Para verificar la hipótesis, primeramente se determinó la presencia de actividad de LO en el músculo del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y sus características bioquímicas y cinéticas se relacionaron con las propiedades fisicoquímicas del colágeno.

Descripción del Trabajo Experimental

Este estudio se dividió en tres etapas:

Primera etapa. Se extrajo, caracterizó y comparó estructuralmente las fibras de colágeno del músculo fresco de manto, aletas y tentáculos del calamar gigante.

Segunda etapa. En esta fase se llevó a cabo la detección y extracción de LO en los tentáculos y se evaluó su actividad específica. Lo anterior en base a las características que presentó el colágeno extraído de dicho tejido.

Tercera etapa. Se estableció un esquema de purificación de la enzima a partir del músculo, una vez purificada la enzima se evaluaron sus constantes cinéticas y características bioquímicas

Los resultados obtenidos se describen en los siguientes tres capítulos, los cuales están ordenados de acuerdo a las etapas antes descritas.

CAPÍTULO 1: Caracterización parcial de la estructura del colágeno del músculo fresco de tres regiones anatómicas del calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Este capítulo se compone de un artículo publicado en el 2008, que lleva por título: Caracterización parcial del colágeno extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*), fue publicado en *Journal of Food (Cienc. y Technol. Aliment.)* 6(2) 101-108.

El artículo de investigación original, muestra el contenido y algunas propiedades fisicoquímicas de colágeno soluble en pepsina (CSP) e insoluble (CI) extraídos de manto, aleta y tentáculos de calamar gigante fresco. El contenido de colágeno total, así como el perfil electroforético fueron diferentes para cada región anatómica evaluada, donde los tentáculos presentaron el mayor contenido de CI. En estudios de microscopia electrónica de barrido (MEB) se observó un arreglo estructural similar en el CSP de las tres regiones y en el CI, marcadas diferencias en el empaquetamiento de las fibras. Las tres fracciones proteicas de colágeno, mostraron una alta resistencia térmica (115-120 °C), siendo superior para tentáculos en comparación con aleta y manto, situación que se relaciona con un alto grado de entrecruzamiento covalente. Definiendo esta región anatómica como la más viable para identificar y caracterizar lisil oxidasa en su músculo.

CAPITULO 2: Detección y evaluación de actividad de lisil-oxidasa en el músculo de tentáculos de calamar gigante. Este capítulo esta formado por un artículo titulado “Lysyl Oxidase from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle: Detection and parcial Purification”, el cual fue enviado a la revista *International Journal of Food Science and Technology*.

El manuscrito de investigación original, muestra el protocolo diseñado para el aislamiento e identificación de la enzima a partir del músculo de tentáculos de calamar gigante. Se realizaron modificaciones a las técnicas de purificación descritas en la literatura para LO de organismos terrestres. Se estandarizó una técnica fluorométrica para la evaluación de su actividad específica reportada en nm de peróxido de hidrógeno por mg de proteína. La LO fue detectada y parcialmente purificada por primera vez del músculo de calamar gigante. El procedimiento desarrollado consistió en una extracción con urea y posteriores cromatografías de filtración en gel (Sephadex G-75) e intercambio aniónico (Q-fast). Se lograron aislar 2 proteínas con peso molecular aproximado de 32 kDa y 24 kDa en una relación 4:1, respectivamente. La actividad específica fue 390 veces más alta que la detectada en el extracto crudo y fue fuertemente inhibida por un inhibidor específico de LO (β -aminopropionitrilo). Este procedimiento dio un rendimiento del 3.8% con una actividad específica de 0.078 U/mg. Dado que la actividad de LO podría afectar la estabilidad de las fibras de colágeno del músculo de calamar gigante, estos resultados proveen las bases para un mejor entendimiento de las características fisicoquímicas tan particulares que presenta el colágeno del calamar gigante.

CAPITULO 3. Purificación de lisil-oxidasasa del músculo de calamar gigante: evaluación de sus constantes cinéticas y características bioquímica. Este capítulo está integrado por un manuscrito de investigación original titulado “Characterization of Lysyl oxidase purified from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle”, el cual fue preparado para enviarse a la revista *Food Chemistry*.

Prosiguiendo con el capítulo anterior, en esta fase se continuó con la purificación, lográndose purificar una proteína con peso molecular aproximado de 32 kDa y derivado de los ensayos de actividad e inhibición específica, se concluyó que corresponde a lisil oxidasa. Uno de los productos del presente capítulo fue establecer un protocolo de purificación para lisil oxidasa del músculo de calamar gigante, mediante la aplicación de una cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel (Sephadex G-50). El rendimiento de LO en músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) fue menor (0.6 µg/g de músculo) al reportado para organismos terrestres (1.14 µg/350 g de músculo) (Palamakumbura y Trackman, 2002). Estas diferencias se atribuyen al hecho de que la concentración de tejido conectivo (10-15%) en el músculo de calamar es menos abundante que en bovino (>60 %) (Bartos y Ledvina, 1979).

Finalmente se hizo una caracterización parcial de sus propiedades cinéticas y características bioquímicas. La temperatura óptima de la enzima estuvo en un rango de 60-65 °C con una estabilidad térmica superior a los 80 °C; mientras que el pH óptimo fue de 8-8.2. Estas características son similares a lo reportado por otros autores para LO de bovino. Por otro lado se encontró un pK experimental de 7.9 y una energía de activación (E_a) de 60.76 J°K⁻¹mol⁻¹.

Conclusiones

Basándose en los objetivos planteados al inicio de este trabajo, y con la integración de los resultados obtenidos a lo largo de la fase experimental fue posible contrastar la hipótesis propuesta.

El tejido conectivo presente en músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) contiene un alto grado de colágeno insoluble. Presentando una elevada resistencia térmica, tanto en la fracción soluble como la insoluble. La región anatómica que presentó la mayor concentración de colágeno insoluble fueron los tentáculos del calamar.

El músculo del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) presenta actividad de lisil oxidasa con características similares a las reportados para organismos terrestres.

Se logró corroborar que la enzima tiene una estrecha relación con las características del colágeno extraído del músculo de calamar gigante. Basándose principalmente en los ensayos de termo-estabilidad.

Es necesario extraer, purificar y caracterizar la LO del músculo de aletas y manto, con la finalidad de comparar dicho comportamiento en las tres regiones anatómicas. Además es necesario cuantificar la presencia de piridinolina como un índice de entrecruzamiento covalente de las fibras de colágeno.

- Ando, M. (1997) Correspondence of collagen on the heat-induced softening of frozen-thawed cuttlefish *Sepia officinalis* mantle. *Journal of Home Economics of Japan* **48**, 315-321.
- Ando, M., Nakagishi, Y., Yoshida, K., Nakao, M., Nakawawa, T., Makinodan, Y., Tsukamasa, Y. & Kawasaki, K. (2006). Pyridinoline concentration in muscular and skin collagen of fish and relationship between collagen solubility and pyridinoline concentration in fish muscular collagen. *Fisheries Science*, **72**, 1104-1108.
- Badii, F. & Howell, N. (2003) Elucidation of the effect of formaldehyde and lipids on frozen stored cod collagen by FT-Raman spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 1440-1446.
- Belitz, H. & Grosch, W. (1999) *Food chemistry*. 2nd ed. Ed. Springer. Germany. 426-430
- Consuegra, S. & Johnston I. (2006) Polymorphism of the lysyl oxidase gene in relation to muscle collagen cross-link concentration in Atlantic salmon. Short communication. *Agriculture Research*, **37**, 1699-1702.
- Doering, T.; Eikenberry, E.; Olsen, B.; Fietzek, P. & Brodsky, B. (1982) Secondary structure of collagen prepeptides and telopeptides. *Biophysical Journal* **37**, 395a.
- Dove, J. & Klinman, J. (2001) Trihydroxyphenylalanine quinone (TPQ) from copper amine oxidases and lysyl tyrosylquinone (LTQ) from lysyl oxidase. *Advances in Protein Chemistry* **58**, 141–174.

- Duff, A.; Cohen, A.; Ellis, P.; Hilmer, K.; Langley, D.; Freeman, H. & Guss, M. (2006) The 1.23 Å structure of pichia pastoris lysyl oxidase reveals a lysine cross-link. *Biological Crystallography* **62**, 1073-1084.
- Duodu, K.; Muyonga, J. & Cole, C. (2004) Characterization of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch. *Food Chemistry* **85**, 81-89.
- Espe, M.; Haguenes, T. & Guldransen, K. (2003) Age of farmed Atlantic salmon at seawater transfer affects muscle collagen content and solubility at harvest. *Journal of Food Science* **68**, 814-1817.
- Eyre, D. & Wu, J. (2005) Collagen Cross-links. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. **247**, 207–229
- Fujimoto, D.; Akiba, K. & Nakamura, N. (1977) Isolation and characterization of a fluorescent material in bovine Achilles tendon collagen. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **76**, 1124-1129.
- Gacheru, S.; Trackman, P.; Shah, M.; O’Gara, C.; Spacciapoli, P.; Greenaway, F. & Kagan, H. (1990) Structural and catalytic properties of copper in lysyl oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* **265**, 19022-19027.
- Kagan, H.; Williams, M.; Williamson, P. & Anderson, J. (1984). Influence of sequence and charge on the specificity of lysyl oxidase toward protein and synthetic peptide substrates. *The Journal of Biological Chemistry* **259**, 11203–11207.
- Kagan, H.; Vaccaro, C.; Bronson, R.; Tang, S. & Brody J. (1986). Ultrastructural immunolocalization of lysyl oxidase in vascular connective tissue. *The Journal of Cell Biology* **103**, 1121-1128.

- Kagan, H. & Trackman, P. (1991) Properties and function of LO *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **5**, 206-210.
- Kagan, H.; Reddy, V.; Narasimhan, N. & Csiszar, K. (1995) Catalytic properties and structural components of lysyl oxidase. *Ciba Foundation Symposium* **192**, 100-121.
- Kagan, H. & Li, W. (2003) Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *Journal of Cellular Biochemistry* **88**, 660-672.
- Kittiphattanabawon, P.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Kishimura, H. & Shahidi, F. (2010) Isolation and Characterization of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) *Food Chemistry* **119**, 1519-1526
- Kolodziejska, I.; Zdzislaw, E.; Sikorski, E. & Niecikowska, C. (1999) Parameters affecting the isolation of collagen from squid (*Illex argentinus*) skins. *Food chemistry* **66**, 153-159.
- Mizuta, S.; Nishimoto, M. & Yoshinaka, R.(2004) Characterization of molecular species of collagen in muscles of japanese amberjack. *Food Chemistry* **84**, 127-132.
- Montero, P. & Borderias, J. (1990) Effect of rigor mortis and aging on collagen in trout (*Salmo irideus*) muscle. *Journal of the Science Food and Agriculture* **52**, 141-176.
- Montero, P.; Morales, J. & Moral, A. (2000) Isolation and Partial Characterization of two types of muscle collagen in some cephalopods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **48**, 2142-2148.

- Nagai, T.; Yamashita, E.; Taniguchi, K.; Kanamori, N. & Suzuki, N. (2001) Isolation and characterization of collagen from the outer skin waste material of cuttlefish. *Food Chemistry* **72**, 425-429.
- Nagan, N. & Kagan, H. (1994) Modulation of lysyl oxidase activity toward peptidyl lysine by vicinal dicarboxylic amino acid residues. Implications for collagen crosslinking. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 22366–22371.
- Narayanan, A.; Siegel, R. & Martin, G. (1974) Stability and purification of lysyl oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **162**, 231–237.
- Nomura, Y.; Toki, S.; Ishii, Y. & Shirai, K. (2000) The physicochemical property of shark type I collagen gel and membrane. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **48**, 2028-2032.
- Palamakumbura A. & Trakman P. 2002. A fluorometric assay for detection of lysyl oxidase enzyme activity in biological samples. *Analytical Biochemistry* **300**, 245-251.
- Panchenko, M.; Stetler-Stevenson, W.; Trubetskoy, O.; Gacheru, S.; & Kagan, H. (1996) Metalloproteinase activity secreted by fibrogenic cells in the processing of prolyl oxidase: Potential role of procollagen C-proteinase. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 7113–7119.
- Pati, F.; Adhikari, B. & Dhara, S. (2010) Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresource Technology* **101**, 3737-3742.
- Pinell, S. & Martin, G. (1968) The cross-linking of collagen and elastin: enzymatic conversion of lysine in peptide linkage to a α -amino adipic-d-semialdehyde (allysine) by an extract from bone. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **61**, 708-714.

- Reynaud, C., Baas, D.; Gleyzal, C., Le Guellec, D., & Sommer, P. (2008) Morpholino knockdown of lysyl oxidase impairs zebrafish development, and reflects some aspects of copper metabolism disorders. *Matrix Biology* **27**, 547–560.
- Sato, K.; Reiji, Y.; Sato, M. & Tomita, S. (1989) Biochemical characterization of collagen in myocommata and endomysium fractions of carp and spotted mackerel muscle. *Journal of food Science* **54**, 1511-1514.
- Shah, M., Scaman, C., Palcic, M. & Kagan, H. (1993) Kinetics and stereospecificity of the lysyl oxidase reaction. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 11573–11579.
- Smith-Mungo, L. & Kagan, H. (1998) Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix biology* **16**, 387-398.
- Sikorski, Z.; Scott, D. & Buisson, D. (1984) The role of collagen in the quality and processing of fish. *Critical reviews in Food Science and Nutrition* **20**, 301-343.
- Sikorski, Z. & Borderias, J. (1994) Collagen in the muscles and skins of marine animals. In *Sea Food Proteins*; Sikorski, Z. E., Pan, B. S., Shahidi, F., Eds.; Chapman and Hall: New York, pp 58-70.
- Trackman, P.; Zoski, C. & Kagan, H. (1981) Development of a peroxidase-coupled fluorometric assay for lysyl oxidase. *Analytical Biochemistry* **113**, 336–342.
- Uzel, M.; Scott, I.; Babakhanlou-Chase, H.; Palamakumbura, A.; Pappano, W.; Hong, H.; Greenspan, D.; & Trackman, P. C. (2001) Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metalloproteinases process pro-lysyl oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase

- activation in mouse embryo fibroblast cultures. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**, 22537–22543.
- Van Boxtel, A.; Kamstra, J.; Fluitsma, D., & Legler, J. (2010) Dithiocarbamates are teratogenic to developing zebrafish through inhibition of lysyl oxidase activity, *Toxicology and Applied Pharmacology*. (Article in press).
- Wang, S.; Mure, M.; Medzihradszky, K.; Burlingame, A.; Brown, D.; Dooley, D.; Smith, A.; Kagan, H. & Klinman, J. (1996) A crosslinked cofactor in lysyl oxidase: Redox function for amino acid side chains. *Science* **273**,1078–1084.
- Williamson, P. & Kagan, H. (1986) Reaction pathway of bovine aortic lysyl oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* **261**, 9477–9482.
- Yoshimura, K.; Terashima, M.; Hozan, D. & Shirai, K. (2000) Preparation and dynamic viscoelasticity characterization of alkali-solubilized collagen from shark skin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **48**, 685-69.
- Zelechowska, E.; Sadowska, M. & Turk, M. (2010) Isolation and some properties of collagen from the backbone of Baltic cod (*Gadus morhua*) *Food Hydrocolloids* **24**, 325-329.

CAPÍTULO 1:

Caracterización parcial de la estructura del colágeno del músculo fresco de tres regiones anatómicas del calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DEL COLÁGENO EXTRAÍDO A PARTIR DEL MANTO, ALETA Y TENTÁCULOS DE CALAMAR GIGANTE (*Dosidicus gigas*)

PARTIAL CHARACTERIZATION OF COLLAGEN FROM MANTLE, FIN, AND ARMS OF JUMBO SQUID (*Dosidicus gigas*)

Torres-Arreola, W.¹; Pacheco-Aguilar, R.¹; Sotelo-Mundo, R. R.¹; Rouzaud-Sández, O.²; Ezquerro-Brauer, J. M.^{2*}

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C, México

²Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, México

Recibido/Received 05-02-2008; aceptado/accepted 29-05-2008

*Autor para la correspondencia/Corresponding author. E-mail: ezquerro@guayacan.uson.mx

Abstract

In *Dosidicus gigas* or jumbo squid, collagen plays an important role in squid swimming mechanisms. Scarce information is available on collagen. The content as well some physical and chemical properties of pepsin-soluble (PSC) and insoluble collagen (IC) were compared in mantle, arm, and fin from adult fresh jumbo squid. The total collagen content and SDS-electrophoresis profile were different in each anatomic part evaluated, the highest IC value was in arms. Scanning electron microscopy (SEM) studies showed same structural arrangement in the PSC from the three anatomical parts and different structural arrangement in the IC. DSC showed a very high transition at 115-120 °C for PSC. The highest T_{max} and ΔH was detected in arms collagen. This knowledge will aid to acquire a better understanding and to improve the commercial application of this economically important commodity.

Resumen

El colágeno en el *Dosidicus gigas* o calamar gigante participa en los mecanismos natatorios del organismo. Sin embargo, la información fisicoquímica sobre esta proteína es escasa. En este estudio se comparó el contenido y algunas propiedades fisicoquímicas de colágeno soluble en pepsina (CSP) e insoluble (CI) extraídos de manto, aleta y tentáculos de *Dosidicus gigas* fresco. El contenido de colágeno total, así como el perfil electroforético fueron diferentes para cada región anatómica evaluada. Los tentáculos presentaron el mayor contenido de CI. En estudios de microscopía electrónica de barrido (MEB) se observó un arreglo estructural similar en el CSP de las tres regiones y en el CI, marcadas diferencias en el empaquetamiento de las fibras. Las tres fracciones proteicas de colágeno, mostraron una alta resistencia térmica (115-120 °C), siendo superior para tentáculos en comparación con aleta y manto. Esta información contribuye a un mayor conocimiento de la especie y una mejor aplicación comercial de la misma.

Keywords: Squid, collagen, mantle, fin, arms

Palabras clave: Calamar, colágeno, manto, aleta, tentáculos

INTRODUCCIÓN

El colágeno es el principal constituyente del tejido conectivo y juega un papel muy importante ya que es el encargado de la unión entre varias células. Existe una estrecha relación entre la firmeza del músculo y el comportamiento del colágeno en organismos marinos (Eyre, 1987; Ando *et al.*, 2001; Badii y Howell, 2003).

La concentración de colágeno en músculo de pescado depende de la temperatura del agua (Ando *et al.*, 2006). Un mayor contenido de colágeno fue encontrado en especies con temperaturas más elevadas. También se ha reportado que los niveles de colágeno insoluble son mayores que el soluble (Ando *et al.*, 2001; Ando *et al.*, 2006). Sin embargo, existe una escasa información en

calamar gigante (*Dosidicus gigas*) sobre el contenido y las características estructurales del colágeno que pueden variar dependiendo del nivel de entrecruzamiento que presente la molécula (Ando *et al.*, 2001).

El calamar gigante se captura en México principalmente en el Golfo de California, siendo Sonora y Baja California Sur los principales estados productores (Salinas *et al.*, 2005) donde la temperatura promedio del agua es superior a los 15 °C (<http://www.inegi.gob.mx>). En consideración de las características fisiológicas específicas y hábitat de este organismo, existe la posibilidad de que el colágeno presente una estrecha relación con la estabilidad de las fibras.

Por otro lado, cada parte anatómica del calamar gigante tiene una función diferente, proporcionándole

balance y propulsión al organismo. Por lo tanto cada región anatómica debe contener una cantidad distinta de colágeno y grado de agregación (O'Dor, 1988).

Los desechos de la industria procesadora de pescados y mariscos, después del fileteado, pueden representar hasta un 75 % del peso de la captura total en forma de huesos, aletas, cabezas, vísceras y escamas (Shahidi, 2006). En la pesquería del calamar sólo se aprovecha la parte comestible (42 %) y el resto es desechado. Tales desechos pueden ser utilizados para obtener enzimas y otros subproductos de alto valor nutricional y comercial, como es el colágeno. Cerca del 30 % de los desechos contienen alto contenido del mismo, que pueden ser empleados para la producción industrial de colágeno y gelatina, con fines cosméticos o de alimentos balanceados para animales, dándole así un valor agregado a la pesquería de este organismo e impulsando un desarrollo sustentable y redituable.

Las principales fuentes de colágeno industrial son la piel y huesos de cerdos y bovinos; sin embargo, existe la posibilidad de transmisión de enfermedades tales como encefalopatía espongiiforme bovina (Nagai, 2004), además que su uso está limitado por ciertas prácticas religiosas en algunos países de Asia como la India (Nagai, 2004). Por tanto, la obtención de colágeno a partir de organismos acuáticos se ha incrementado considerablemente en dicha región, ya que por su origen representan una fuente de colágeno alternativa a los animales terrestres y su uso en la industria de alimentos, cuero, cosméticos y productos biomédicos (tales como membranas biológicas) se ha potenciado en los últimos años (Shahidi, 2006).

En este trabajo se estudiaron las características del colágeno de manto, aletas y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Los resultados de este estudio pueden servir de base para futuras investigaciones, enfocadas a la utilización y aprovechamiento de esta proteína de una manera más eficiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El calamar gigante utilizado fue capturado del Golfo de California en las costas de Bahía de Kino (28,75° N / 112,25° W, 15-18° C) durante la temporada de otoño y transportado en hielo al laboratorio de Productos Pesqueros del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Las muestras tenían una longitud de 45-50 cm y un peso de 5-6 kg. El marcador de peso molecular fue adquirido de los laboratorios Bio-Rad. Todos los otros reactivos fueron adquiridos en Sigma (EUA).

Extracción del colágeno

La extracción del colágeno fue desarrollada de acuerdo a la metodología descrita por Sivakumar y Chandrakasan (1998) con ligeras modificaciones. Todo el

proceso de extracción se llevó a cabo a 4 °C. El músculo fresco de las 3 regiones anatómicas (manto, aletas y tentáculos) del calamar gigante fue mezclado y homogenizado por 24 h con una solución de urea 6 M conteniendo 0,5 M de acetato de sodio (pH 6,8) con la finalidad de remover las proteínas miofibrilares y proteoglicanos. Después de la centrifugación a 39200 xg por 40 min, el residuo insoluble fue secuencialmente extraído con un buffer neutro (Tris/1M NaCl 0,05 M, pH 7,2) (colágeno soluble en sal neutra), ácido acético 0,5 M (colágeno soluble en ácido) y pepsina (10 mg/g de tejido en ácido acético, CH₃COOH 0,5 M) (colágeno soluble en pepsina, CSP). El remanente final fue considerado como colágeno insoluble (CI). Las soluciones de colágeno extraídas fueron precipitadas con cloruro de sodio (NaCl) hasta una concentración final de 2 M y colectadas por centrifugación (39200 g during 40 min). Los precipitados fueron redisueltos en ácido acético 0,5 M y dializados contra fosfato de sodio (Na₂HPO₄) 0,02 M (pH 8,6) en membrana de celulosa de 10 kDa a 4 °C. El precipitado fue redisuuelto en la misma solución de ácido acético y dializado con ácido acético 0,05 M para finalmente ser liofilizado.

Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida

La pureza de las soluciones de colágeno fue analizada por electroforesis en gel de duodesil sulfato de sodio-poliacrilamida basándose en el método de Laemmli (1970). Se utilizaron geles de poliacrilamida al 7,5%, se inyectaron 5 µg de muestra. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 y desteñidos en una solución de metanol: agua: ácido acético (5:4:1, v/v/v).

Análisis de proteína

La concentración de proteína fue determinada colorimétricamente a 600 nm utilizando un estándar de albúmina de suero bovino (Bradford, 1976).

Calorimetría diferencial de barrido (CDB)

El comportamiento térmico del colágeno extraído del músculo de calamar gigante fue estudiado por medio de calorimetría de barrido diferencial de 25 a 150 °C. La temperatura de transición y entalpía fueron medidas usando un sistema de análisis térmico 1020 serie DSC7 (PerkinElmer, Norwalk, CN). La evaluación de las señales fue realizada con computadora utilizando un equipo Perkin Elmer Nelson modelo 1022. Las muestras (4-5 mg) fueron colocadas en cápsulas herméticas para CDB (Perkin Elmer no. 0319-0218) y la prueba fue realizada con un flujo de calor de 10 °C/min. Una cápsula vacía fue usada como referencia (Ramírez-Olivas *et al.*, 2004).

Composición de aminoácidos

El perfil de aminoácidos fue analizado de acuerdo a lo descrito por Vázquez *et al.* (1997) con ligeras modificaciones. Tres mg de colágeno liofilizado fueron

Tabla 1. Contenido y distribución del tejido conectivo extraído de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Los datos son promedio de tres determinaciones. Letras diferentes en la misma columna muestran diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Table 1. Content and distribution of connective tissue extracted from jumbo squid (*Dosidicus gigas*). Values are mean of three replicates. Different letter for each column, are statistically different ($P \leq 0.05$).

Región anatómica	Tejido conectivo (g/kg de músculo)
Manto	76,7 ± 5,6 ^a
Aleta	126,7 ± 8,7 ^b
Tentáculo	283,3 ± 13,3 ^c

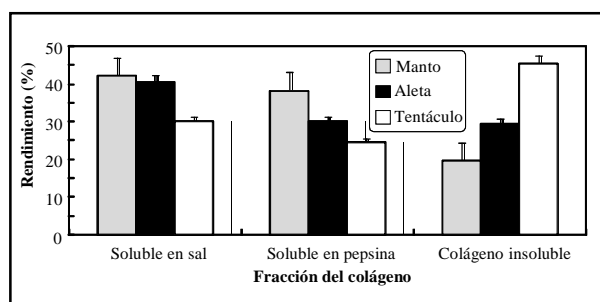


Figura 1. Rendimiento y distribución del colágeno presente en tejido conectivo de manto, aleta y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Promedio de tres determinaciones. Porcentaje en base a la concentración de tejido conectivo extraído en cada región anatómica.

Figure 1. Collagen yield and distribution from connective tissue of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle, fin, and arms. Values are mean of three replicates. Percentage considering connective tissue concentration extracted from each anatomical region.

hidrolizados en ácido clorhídrico (HCl) 6 M por 6 h a 150 °C (utilizando tioglicolato de sodio como antioxidante, 1:1, v/v) y secados en un evaporador. Las muestras hidrolizadas fueron disueltas en 2 mL de buffer de citratos 0,5 M y el contenido de aminoácidos fue determinado por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) Hewlett Packard Modelo GmbH (Hewlett-Packard Co. Waldbrom, Germany), conectado a un detector de fluorescencia. Las muestras fueron derivatizadas durante 5 min a 60 °C con 2 mg/mL de NBD-Cl en metanol (la reacción fue detenida con HCl 1 M). La separación de aminoácidos fue llevada al cabo en una columna en fase reversa C18 octa-decil dimetilsilano (10 cm x 4,6 mm ID y un tamaño de partícula de 3 µm, Varian, Cat No. R0089200E3).

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para el análisis del CSP y CI se utilizó un microscopio electrónico de barrido de bajo vacío Jeol JSM 6360 LV, con un sistema de microanálisis por EDS para análisis elemental por rayos-X. Para ello, una diminuta cantidad de muestra se fijó a una tira de papel carbón autoadhesiva de 13 mm y se polarizó con una capa fina de

oro-platino para observarse en un microscopio electrónico de barrido con un voltaje de aceleración de 15 kV.

Análisis de datos

Los análisis y determinaciones de contenido y distribución del tejido conectivo, contenido y distribución del colágeno en el tejido conectivo y el contenido de hidroxiprolina y prolina se realizaron por triplicado. El análisis calorimétrico se realizó por quintuplicado. Los datos fueron comparados mediante un análisis de varianza (ANDEVA) de una sola vía, con una prueba de comparación de medias por el método de Tukey, con un nivel de significancia del 5%. Los datos fueron analizados empleando el paquete estadístico JMP versión 4,04 (Statsoft, Tulsa, OK).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Extracción del colágeno

Durante el aislamiento y caracterización parcial del colágeno presente en las diferentes regiones anatómicas del calamar gigante se obtuvieron tres fracciones en base a sus características de solubilidad. Con la utilización de urea 6 M en buffer de acetato de sodio (0,5 M; pH de 6,8) se logró solubilizar la fracción de proteínas miofibrilares y por consiguiente una precipitación del tejido conectivo (Tabla 1). En estudios llevados a cabo en otras especies de calamar como *Loligo patagonica*, *Illex argentinus*, *Illex cndenti*, *Tadoropsis eblanae* (Sikorski y Borderias, 1994; Morales *et al.*, 2000) se ha detectado un contenido de tejido conectivo entre el 3 y 18 % en las diferentes regiones anatómicas, incluyendo al manto y aletas. La gran variabilidad en los valores encontrados para las tres regiones anatómicas analizadas en este trabajo ($P \leq 0,05$) y con respecto a lo reportado previamente, sustentan que dependiendo de las funciones que desempeña el organismo y considerando que los cefalópodos son especies de rápido crecimiento, implica un alto grado de reemplazo o recambio proteico y por lo tanto puede presentarse variabilidad en el contenido de tejido conectivo en el músculo (Sikorski y Borderias, 1994; Morales *et al.*, 2000).

En la Figura 1 se presentan los porcentajes de las fracciones obtenidas a partir de las tres regiones anatómicas evaluadas en este estudio. La fracción de colágeno soluble en sal (CSS) presentó el mayor contenido en manto y aleta en comparación con tentáculos ($P \leq 0,05$). Para el caso del colágeno insoluble (CI) se presentó un fenómeno contrario, obteniéndose un mayor contenido en tentáculos ($P \leq 0,05$), indicando un alto grado de entrecruzamiento por parte de la molécula. Debido a las funciones biológicas en los diferentes tejidos de calamar se esperaba obtener diferencias de solubilidad en cuanto al tejido conectivo presente en ellos, específicamente colágeno. Los solventes como la sal neutra utilizada en este estudio permiten solubilizar solo parte del colágeno, específicamente las

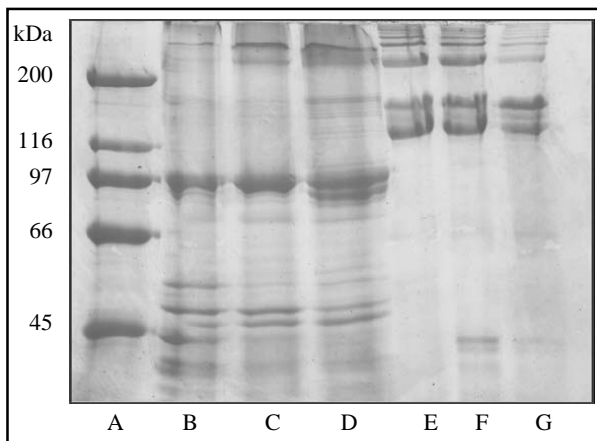


Figura 2. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes del colágeno extraído de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Carril A: marcador de peso molecular; B: colágeno soluble en sal extraído de manto; C: colágeno soluble en sal extraído de aleta; D: colágeno soluble en sal extraído de tentáculos; E: colágeno soluble en pepsina extraído de manto; F: colágeno soluble en pepsina extraído de aleta; G: colágeno soluble en pepsina extraído de tentáculos.

Figure 2. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the collagen extracted from jumbo squid (*Dosidicus gigas*). Lane A: standard protein; lane B: salt soluble collagen from mantle; lane C: salt soluble collagen from fin; lane D: salt soluble collagen from arms; lane E: pepsin soluble collagen from mantle; lane F: pepsin soluble collagen from fin; lane G: pepsin soluble collagen from arms.

moléculas recién sintetizadas y que no están unidas dentro de las fibras mediante enlaces covalentes (Friess, 1998). En este contexto el manto, debido a sus funciones biológicas, es la región donde se presenta un mayor recambio de sus proteínas, entre ellas el colágeno. Fenómeno contrario al que se presenta en los tentáculos, donde esta proteína es altamente entrecruzada.

La fracción de colágeno soluble en pepsina (CSP) presentó un fenómeno similar al del CSS, obteniéndose mayor contenido en manto y menor a partir de tentáculos ($P \leq 0,05$). Sin embargo, los porcentajes del contenido de proteína fueron menores a los obtenidos a partir de la solución salina. El contenido de colágeno soluble en pepsina reportado para otros moluscos fue de 10 a 20 % (Mizuta *et al.*, 2002). Dichos resultados son inferiores a los encontrados en este estudio (38 % para manto) corroborando la amplia variabilidad en el contenido proteico que se puede presentar en este tipo de organismos. Cabe mencionar que este solvente es uno de los más versátiles y ampliamente utilizados para la extracción del colágeno nativo.

Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida

En la Figura 2 se observa el patrón electroforético de las fracciones de colágeno obtenidas en este estudio. Se pueden apreciar diferencias entre CSS con respecto al CSP ya que para el primero se encontraron bandas alrededor de los 97 kDa en las tres regiones anatómicas

del calamar gigante (Figura 2; carriles B, C y D). Estos resultados sustentan lo reportado por otros autores, quienes obtuvieron una molécula de colágeno con tres cadenas α de un peso molecular inferior a los 100 kDa (Sugiyama *et al.* 1989; Sirkoski y Borderias, 1994; Badii y Howell, 2003). El CSS extraído a partir de manto y aletas presenta una sola banda a dicho peso molecular, a diferencia de la muestra obtenida de los tentáculos donde se aprecia la aparición de dos bandas en posiciones muy próximas. Lo anterior sugiere la presencia de dos cadenas proteicas ($\alpha 1$ y $\alpha 2$) en esta región anatómica, a diferencia de las anteriores (manto y aleta) donde se observan dos cadenas α idénticas. Varios autores han reportado al colágeno nativo como un heteropolímero con un peso molecular de aproximadamente 300 kDa, el cual presenta dos bandas proteicas claramente diferenciadas y en posiciones próximas (Sugiyama *et al.*, 1989; Badii y Howell, 2003) y, en base a esto, probablemente el CSS aislado de tentáculos de calamar gigante pudiera ser de tipo I pues está compuesto por al menos dos cadenas α (Badii y Howell, 2003). Por otra parte, al realizar la comparación del CSS con el CSP mediante el perfil electroforético (Figura 2) se aprecian claras diferencias en cuanto al peso molecular de las bandas obtenidas. Las fracciones proteicas de colágeno extraídas de las 3 regiones anatómicas a partir de una solución con pepsina presentaron un peso molecular alrededor de los 170-180 kDa (Figura 2; carriles E, F y G). Si bien es cierto que el colágeno está constituido por tres cadenas polipeptídicas (α) con pesos moleculares cercanos a los 100 kDa (Sirkoski y Borderias, 1994; Badii y Howell, 2003), también se ha reportado por medio de electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida que dos de éstas cadenas α pueden estar unidas entre si por medio de entrecruzamiento intramolecular para formar lo que se conoce como una cadena β (Kimura y Ohno, 1987; Giraud *et al.*, 2000; Nagai *et al.*, 2001; Mizuta *et al.*, 2002). Por todo esto, la banda obtenida a partir del CSP puede ser atribuida a una cadena β .

Es importante mencionar que la aparición de cadenas α en el CSS y de cadenas β en el CSP concuerda con lo reportado por varios autores donde se informa que la sal (NaCl) presenta la menor capacidad de solubilizar al colágeno puro debido a la alta fuerza iónica del medio, permite solubilizar parte del colágeno, es decir las cadenas α y β sin entrecruzamiento intra e intermolecular. Además, este solvente es capaz de solubilizar componentes miofibrilares de bajo peso molecular remanentes después de su extracción con urea afectando así la pureza de su extracción (Miller y Rhodes, 1982; Friess, 1998). Lo anterior podría explicar la presencia de bandas con peso molecular inferior a los 50 kDa en el CSS de las 3 regiones anatómicas evaluadas en este estudio (Figura 2; carriles B, C y D). Por otra parte, el uso de pepsina como solvente radica principalmente en la habilidad de degradar aquellas porciones de moléculas de colágeno a partir de las cuales se originan los entrecruzamientos (Miller y Rhodes, 1982;

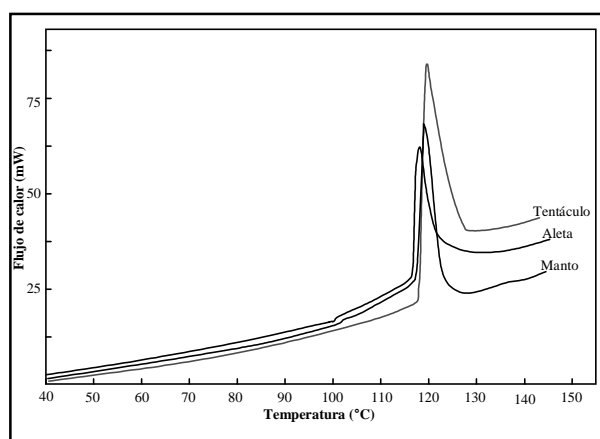


Figura 3. Termograma de los colágenos extraídos a partir de las regiones anatómicas evaluadas del calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Cada termograma es la representación promedio de cuatro determinaciones.

Figure 3. Differential scanning calorimetry thermograms of collagen from each anatomical region of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) evaluated. Each thermogram is the mean of four replicates.

Jongjareonrak *et al.*, 2005). Es por esto que las bandas encontradas en el CSP presentan pesos moleculares muy superiores a los encontrados para el CSS.

Una vez determinado el perfil electroforético de los extractos de colágeno, se procedió a trabajar con el CSP para los ensayos subsecuentes. Lo anterior en base al grado de pureza en la extracción del colágeno, aunado a que este solvente es uno de los más versátiles y ampliamente utilizados para la extracción del colágeno nativo ya que degrada las porciones de la molécula a partir de las cuales se originan los entrecruzamientos (Miller y Rhodes, 1982; Jongjareonrak *et al.*, 2005).

Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría es una técnica útil que permite establecer la estabilidad térmica de una molécula, a mayor temperatura de transición indica una molécula más resistente. Las fracciones de colágeno soluble en pepsina (CSP) e insoluble (CI) fueron sometidas a un análisis de calorimetría diferencial de barrido con la finalidad de elucidar la resistencia térmica de los extractos proteicos. La Figura 3 muestra los termogramas del CSP obtenido a partir de manto, aletas y tentáculos de calamar gigante. En los 3 extractos se puede apreciar la aparición de un solo pico endotérmico alrededor de 120 °C indicando una alta resistencia del CSP a ser desnaturalizado. Sin embargo, el valor de DH fue superior para el CSP extraído a partir de tentáculos en comparación con aletas y manto ($P < 0,05$) (Tabla 2). Lo cual sugiere un mayor grado de entrecruzamiento en las muestras provenientes de esta región anatómica, producto posiblemente de la presencia de piridinolina en el colágeno (Ando *et al.*, 2001). Esta molécula puede estar presente en mayores concentraciones que en aletas y manto respectivamente. Valencia *et al.*

Tabla 2. Temperatura de transición y entalpía de colágeno extraído del músculo de *Dosidicus gigas* (calamar gigante). Las determinaciones son promedio de cinco repeticiones. Letras diferentes en la misma columna muestran diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Table 2. Denaturation enthalpy and transition temperature of collagen extracted from *Dosidicus gigas* (jumbo squid) muscle. Values are mean of five replicates. Different letter for each column are statistically different ($P \leq 0,05$).

Región anatómica	To (°C)	H (J/g)
Manto	119,50 ± 0,43 ^{ab}	38,30 ± 3,02 ^a
Aleta	118,60 ± 0,67 ^a	34,70 ± 2,78 ^a
Tentáculo	120,25 ± 0,55 ^b	50,75 ± 3,44 ^b

(2007) reportan para tejido conectivo de manto de calamar gigante un pico endotérmico a 105 °C, mientras que en el músculo *in situ* se ha reportado un pico exotérmico a 107 °C (Ramirez Olivas *et al.*, 2004). Por otra parte, en colágeno extraído de músculo fresco de bacalao se ha reportado una entalpía de 2,75 J/g (pico endotérmico) y una temperatura de transición de 27,6 °C (Badii y Howell, 2003). Estos reportes confirman la presencia de una molécula de colágeno en calamar gigante resistente a altas temperaturas posiblemente debido a la influencia, en mayor o menor grado, de una molécula entrecruzadora como la piridinolina.

Perfil de aminoácidos

Las fracciones de CSP extraído de las tres regiones anatómicas del calamar gigante (manto, aleta y tentáculos) fueron sometidas a una detección cualitativa de aminoácidos primarios (Figura 4) y para determinar el contenido de colágeno se realizó un análisis cuantitativo de los aminoácidos secundarios (Figura 5). En las tres regiones evaluadas, los aminogramas correspondientes muestran una abundante presencia de glicina seguida por alanina y ácido glutámico, estos resultados concuerdan con lo reportado por los autores para colágeno de pulpo y algunas especies de calamares de agua fría (Ando *et al.*, 2001; Nagai, *et al.*, 2001). Una evaluación del contenido de aminoácidos en el colágeno presente en músculo de calamar gigante puede contribuir en parte a entender sus propiedades de solubilidad, entrecruzamientos y estabilidad térmica (Lin y Liu, 2006).

En los tres extractos de colágeno a base de pepsina se logró detectar la presencia de lisina, en menor concentración que los aminoácidos antes mencionados, lo que puede ser un factor clave para entender el comportamiento y estabilidad térmica del colágeno ya que se ha reportado que es el principal sustrato sobre el cual actúa la lisil oxidasa provocando un entrecruzamiento covalente (formación de piridinolina) de las fibras de colágeno (Ando *et al.*, 2006; Eyre y Wu, 2005; Palamakumbura y Trackman, 2002; Ando *et al.*, 2001).

Los aminoácidos secundarios (prolina e hidroxiprolina) se relacionan con la presencia de colágeno en la muestra, ya que estos aminoácidos no se encuentran

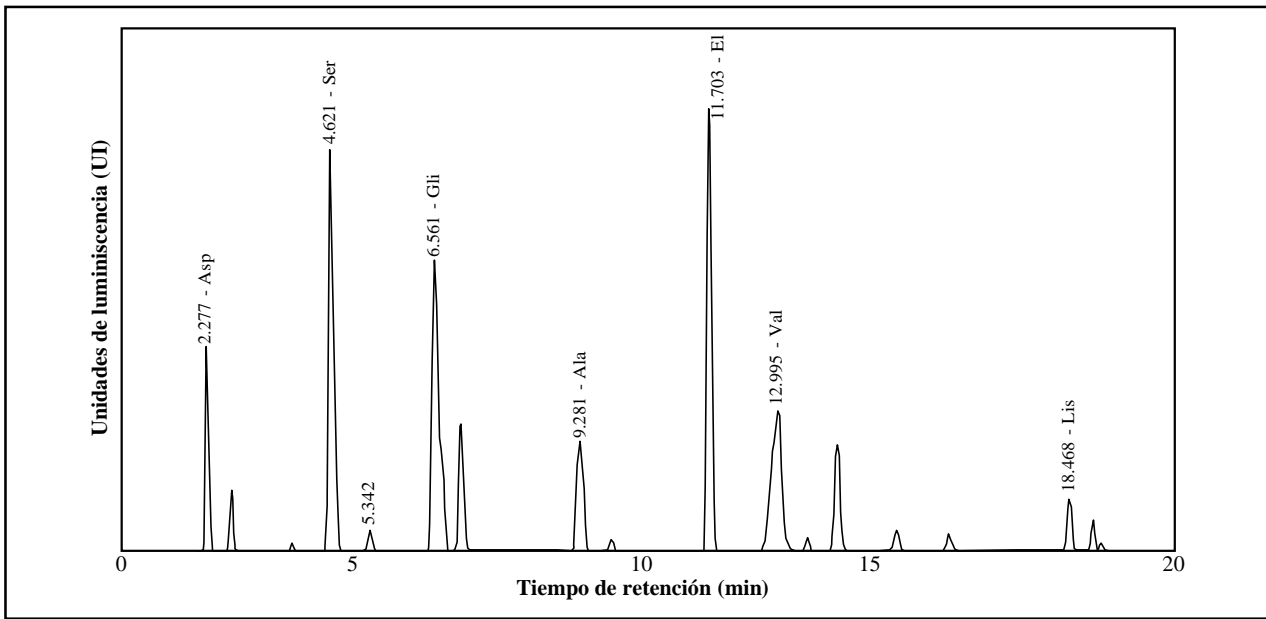


Figura 4. Aminograma típico de aminoácidos primarios presentes en el colágeno del manto de calamar gigante. EI= Estándar interno.

Figure 4. Aminogram of collagen primary amino from jumbo squid mantle. EI= Internal standard.

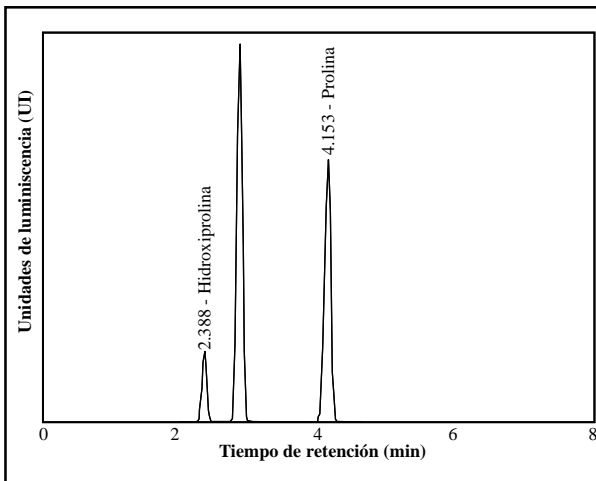


Tabla 3. Contenido de hidroxiprolina, prolina y colágeno de las regiones anatómica de clamar gigante (*Dosidicus gigas*). Promedio de tres determinaciones. El porcentaje de colágeno se obtuvo al multiplicar el contenido de hidroxiprolina por 21,56. Letras diferentes en la misma columna muestran diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Table 3. Hydroxyproline, proline and collagen contents of jumbo squid anatomic regions. Values are means of three replicates. Percentage of collagen was established by multiplying hydroxyproline content by 21,56. Different letter for each column are statistically different ($P \leq 0,05$).

de manera habitual en otras proteínas (Vázquez *et al.*, 1997). Específicamente el contenido de hidroxiprolina en colágeno difiere de una especie (peces y cefalópodos) a otra, dependiendo del tipo genético de colágeno y tejido del cual es aislado por lo que es recomendable utilizar factores de conversión específicos para el cálculo de la

Tabla 3. Contenido de hidroxiprolina, prolina y colágeno de las regiones anatómica de clamar gigante (*Dosidicus gigas*). Promedio de tres determinaciones. El porcentaje de colágeno se obtuvo al multiplicar el contenido de hidroxiprolina por 21,56. Letras diferentes en la misma columna muestran diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Table 3. Hydroxyproline, proline and collagen contents of jumbo squid anatomic regions. Values are means of three replicates. Percentage of collagen was established by multiplying hydroxyproline content by 21,56. Different letter for each column are statistically different ($P \leq 0,05$).

Región anatómica	Hidroxiprolina (%)	Prolina (%)	Colágeno (%)
Manto	0,85 ± 0,13 ^a	1,67 ± 0,21 ^a	18,33 ± 0,56 ^a
Aleta	2,15 ± 0,17 ^b	4,34 ± 0,33 ^b	46,59 ± 1,23 ^b

cantidad de colágeno en las diferentes especies (Sirkoski y Borderias, 1994). El contenido de prolina e hidroxiprolina del CSP del músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) utilizado como indicador de la presencia de colágeno muestra diferencias en las tres regiones anatómicas evaluadas ($P \leq 0,05$) (Tabla 3). Los tentáculos presentaron un contenido de colágeno superior al 70 % mientras que en manto se detectaron valores inferiores al 20 % ($P \leq 0,05$). Lo anterior se relaciona con el perfil calorimétrico, respecto a una mayor resistencia térmica en las muestras provenientes de tentáculos de calamar gigante. Por otra parte, estos resultados contrastan con el contenido reportado durante el proceso de extracción proteica a base de pepsina, donde aparentemente existe un mayor contenido en la extracción del colágeno a partir del manto en comparación con aleta y tentáculos, fenómeno

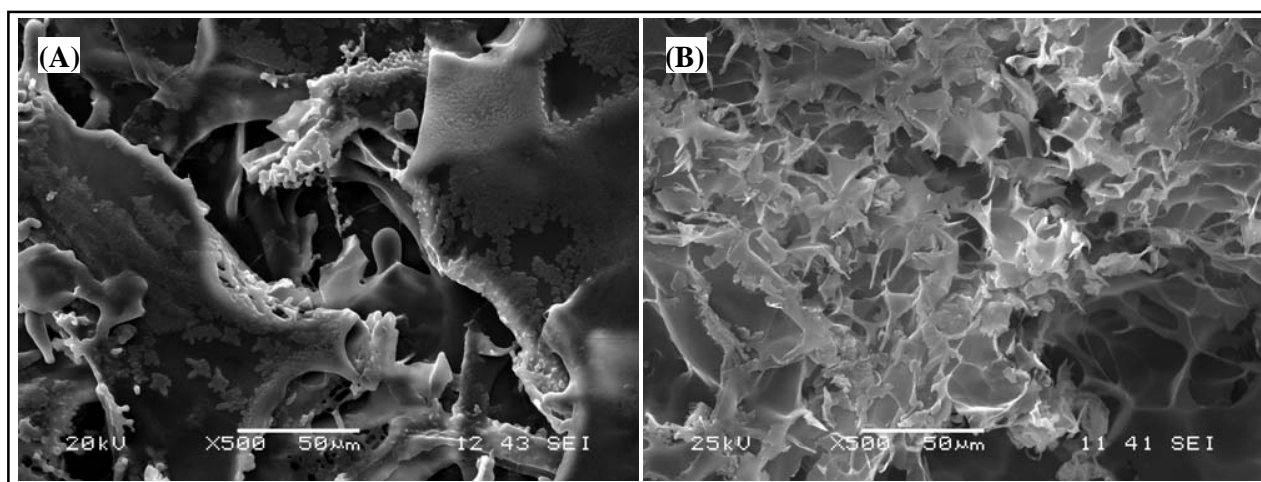


Figura 6. Micrografías de colágeno extraído de músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). (A): colágeno soluble en pepsina extraído del manto; (B): colágeno insoluble extraído del manto. Las imágenes tienen una magnificación de 500X.

Figure 6. Micrography of collagen from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle. (A): pepsin soluble collagen from mantle; (B): insoluble collagen from mantle. Zoom image 500X.

debido principalmente a la presencia de otras proteínas durante la extracción.

Microscopía electrónica de barrido

Fueron analizadas muestras de CSP y CI en un microscopio electrónico de barrido (MEB) (Figura 6) encontrando claras diferencias entre ambas fracciones proteicas. En el CI se aprecia un mayor grado de empaquetamiento por parte de las fibras, posiblemente debido a la presencia de piridinolina en la molécula de colágeno (Ando *et al.*, 2001; Ando *et al.*, 2006). Se distinguen pequeñas fibras, predominando los conglomerados característicos para este tipo de material proteico (Han, 2006; Rigo y Bairati, 1998; Kadler *et al.*, 1996). Por otra parte, al realizar las observaciones al MEB de la fracción soluble en pepsina se aprecia un arreglo estructural diferente al que presenta el CI. Los resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, pequeñas agregaciones en la superficie de las fibras de colágeno, las cuales aparentemente son agregaciones radiculares salinas (Kuhn, 1987). Estos resultados han sido reportados para colágeno de cerdo, donde se observa un arreglo que se asemeja a pequeñas flores divididas en su interior (Kuhn, 1987). Los patrones observados en este estudio corroboran los resultados obtenidos en análisis previos donde se hace referencia a un alto grado de entrecruzamiento.

CONCLUSIONES

El colágeno del músculo de calamar gigante extraído con base a pepsina presenta bandas electroforéticas que corresponden a cadenas β mientras

que en el extracto soluble en sal se muestran cadenas α con un mayor grado de pureza.

El perfil calorimétrico y los estudios de microscopía electrónica sugieren una alta resistencia térmica en el CSP; situación que se relaciona con un alto grado de entrecruzamiento covalente. Por la alta resistencia térmica detectada en el colágeno presente en las partes anatómicas evaluadas en el calamar gigante, este estudio podría marcar la pauta para que se lleven a cabo estudios tendientes a evaluar el uso del colágeno extraído principalmente de los tentáculos y región caudal en la industria plástica y cosmética.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Dra. Maria Goreti Campos-Ríos por su apoyo en las observaciones realizadas en el microscopio electrónico de barrido. A la M.C. Guillermina García-Sánchez por su asesoría durante el análisis de aminoácidos. Al proyecto 43058 financiado por CONACyT.

REFERENCIAS

- Ando, M.; Nakagishi, Y.; Yoshida, K.; Nakao, M.; Nakawawa, T.; Makinodan, Y.; Tsukamasa, Y.; Kawasaki, K. 2006. Pyridinoline concentration in muscular and skin collagen of fish and relationship between collagen solubility and pyridinoline concentration in fish muscular collagen. *Fisheries Science* **72**, 1104-1108.
- Ando, M.; Ando, M.; Makino, M.; Tsukamasa, Y.; Makinodan, Y.; Miyoshi, M. 2001. Interdependence between heat

- stability and pyridinoline contents of squid mantle collagen. *Journal of Food Science* **66**, 265–269.
- Badii, F.; Howell, N. 2003. Elucidation of the effect of formaldehyde and lipids on frozen stored cod collagen by FT-raman spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51** 1440-1446.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Eyre, D. 1987. Collagen crosslinking amino acids. *Methods in Enzymology* **144**, 115–139.
- Eyre, D.; Wu, J. 2005. Collagen Cross-Links. *Topisc in Current Chemistry* **247**, 207-229.
- Friess, W. 1998. Collagen - biomaterial for drug delivery. *European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **45**(2), 113-136.
- Giraud, G.; Besseau, L.; Chopin, C.; Durand, P.; Herbage, D. 2000. Structural aspects of fish skin collagen which forms ordered arrays via liquid crystalline states. *Biomaterials* **21**, 899-906.
- Han, X. 2006. Electron Microscope Observation of Collagen fibers. The Institute of Optics, University of Rochester.
- Jongjareonrak, A.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Tanaka, M. 2005. Isolation and characterization of collagen from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) skin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**, 1203-1210.
- Kadler, K.; Holmes, D.; Trotter, J.; Chapman, J. 1996. Collagen fibril formation. *Biochem. Journal* **316**, 1-11.
- Kimura, S.; Ohno, Y. 1987. Fish type I collagen: Tissue-specific existence of 2 molecular forms, $(\alpha_1)_2\alpha_2$ and $\alpha_1\alpha_2\alpha_3$, in alaska pollock. *Comparative Biochemistry and Physiology* **88B**, 409-413.
- Kuhn, K. 1987. The Classical Collagens: Types I, II, and III. En: Structure and Function of collagen types. Academic Press, Mayne y Burgeson editors.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227** 680-685.
- Lin, Y. K.; Liu, D. C. 2006. Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species. *Food Chemistry* **99**(2):244-251.
- Miller, E.; Rhodes, R. 1982. Preparation and characterization of the different types of collagen. *Methods in Enzymology* **82A**, 33-64.
- Mizuta, S.; Miyagi, T.; Nishimiya, T.; Yoshinaka, R. 2002. Partial characterization of collagen in mantle and adductor of pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Food Chemistry* **79**, 319-325.
- Morales, J.; Montero, P.; Moral, A. 2000. Isolation and partial characterization of two types of muscle collagen in some cephalopods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **48**, 2142-2148.
- Nagai, T.; Yamashita, E.; Taniguchi, K.; Kanamori, N.; Suzuki, N. 2001. Isolation and characterisation of collagen from the outer skin waste material of cuttlefish (*Sepia lycidas*). *Food Chemistry* **72** 425-429.
- Nagai, T. 2004. Characterization of collagen from Japanese sea bass caudal fin as waste material. *European Food Research and technology* **218**, 424-427.
- O'Dor, R. 1988. Limitations on locomotor performance in squid. *Journal of Applied Physiology* **64**, 1 128-134.
- Palamakumbura, A.; Trakman, P. 2002. A fluorometric assay for detection of lysyl oxidase enzyme activity in biological samples. *Analytical Biochemistry* **300**, 245-251.
- Ramirez Olivas, R.; Rouzaud, O.; Haard, N.; Pacheco, R.; Ezquerria, J. 2004. Changes in firmness and thermal behavior of ice-stored muscle of jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *European Food Research and Technology* **219**, 312-315.
- Rigo, C.; Bairati, A. 1998. Use of rotary shadowing electron microscopy to investigate the collagen fibrils in the extracellular matrix of cuttle-fish (*Sepia officinalis*) and chicken cartilage. *Tissue & Cell* **30**(1), 112-117.
- Shahidi, F. 2006. Maximising the value of marine by-products, pp 532. En Woodhead Publishing, Cambridge, UK,
- Salinas, Z.; Sánchez, H.; Aragón, N.; Sánchez, V.; Soria, M.; Escoto, G.; Moctezuma, C.; Camarillo, C.; Mejía, R.; Bazzino, F. 2005. Programa Maestro de la pesquería de Calamar gigante. Comité Sistema Producto de la pesquería de calamar gigante en el Estado de Sonora.
- Sikorski, Z.; Borderias, J. 1994. Collagen in the muscles and skins of marine animals, pp 58-70. En: Sea Food Protein, Sikorski, ZE, Pan, BS, Shahidi, F (eds). Chapman and Hall, New York.
- Sivakumar, P.; Chandrakasan, G. 1998. Occurrence of a novel collagen with three distinct chains in the cranial cartilage of the squid *Sepia officinalis*: comparison with dark cartilage collagen. *Biochimica et Biophysica Acta* **1381**, 161-169.
- Sugiyama, M.; Kousu, S.; Hanabe, M.; Okuda, Y. 1989. Utilization of Squid, pp 251 en Balkeman/Rotterdam Editors, Japan.
- Valencias, A.; García, M.; Cárdenas, J.; Herrera, J.; Rouzaud, O.; Ezquerria, J. 2007. Effect of thermal process on connective tissue from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle. *Food Chemistry* **107**, 1371-1378.
- Vázquez, F.; Pacheco, R.; Lugo, M.; Villegas, O. 1997. Application of the freshness quality index (K value) for fresh fish to canned sardines from Northwestern Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis* **10**, 158-165.

CAPITULO 2:

Detección y evaluación de actividad de lisil-oxidasa en el músculo de tentáculos de calamar gigante.

1 **Lysyl Oxidase from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle: Detection and partial Purification**

2 **Running title:** Jumbo squid tentacles lysil oxidase

3 Torres-Arreola Wilfrido¹, Ezquerra-Brauer Marina ² Valenzuela-Soto Elisa M.¹, Garcia-Sanchez
4 Guillermina¹ & Pacheco-Aguilar Ramón.^{1*}

5

6 ¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C, P.O.Box 1735 Hermosillo, 83000
7 Mexico.

8

9 ²Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora.

10

11 ***Correspondent:** Ramón Pacheco Aguilar, Ph.D. Centro de Investigación en Alimentación y
12 Desarrollo A.C. Carretera a la Victoria km 0.6. P.O. Box 1735. Hermosillo, Sonora. Mexico. Zip Code
13 83000. E-mail: rpacheco@ciad.mx

14

15 **Summary**

16 Lysyl oxidase (LOX), the enzyme which oxidately deaminates lysine residues in collagen and widely
17 studied in mammalian tissues, was detected and partially purified for the first time from jumbo
18 squid (*Dosidicus gigas*) muscle. The procedure developed for purification of LOX from jumbo squid
19 muscle consisted of urea extraction, Sephadex G-75, and anion-exchange chromatography. Two
20 protein fractions were isolated as shown by polyacrylamide gel electrophoresis. The specific
21 activity was 390-fold higher than the original extract. The molecular weight of both proteins
22 isolated were estimated to be 32 kDa (the major fraction 80%) and 24 kDa (the lower one 20%).
23 The enzyme was strongly inhibited by β -aminopropionitrile fumarate, specific LOX inhibitor. The
24 procedure gave the oxidase in 3.8% yield, with a specific activity of 0.078 IU/mg protein.

25 **Key Words:** Lysyl oxidase, jumbo squid, tentacles, purification.

26

27 **Introduction**

28 Collagen is a principal constituent of intramuscular connective tissue in animal tissues and plays an
29 important role by forming connections between cells. For instance, a close relationship has been
30 found between muscle firmness and collagen behaviour in seafood (Eyre, 1987; Ando *et al.*, 2006;
31 Badii and Howell, 2003). Amino acids such as Lysine (Lys) and Hydroxyllysine (Hyl) play an important
32 role in collagen fibrils covalent crosslink mechanism (Sikorski and Borderias, 1994). The major
33 crosslinking molecule in mature collagen is pyridinoline (Pyr). The Pyr molecule is formed from the
34 oxidation of Lys and Hyl by the enzyme named lysyl oxidase (LOX) (Ando *et al.*, 2001; Morales and
35 Montero, 2000). LOX has been widely studied in mammals (chick, bovine and human).
36 Palamakumbura and Trackman (2002) reported that LOX is synthesized as a proenzyme of 50 kDa
37 and secreted into extracellular environment and then activated by proteolytic cleavage resulting in
38 a functional enzyme with molecular weight of 32 kDa and a pro-peptide of 24 kDa. Activity or even
39 presence of LOX has not been reported in marine tissues. However, it is well known for instance
40 that in Atlantic salmon, despite their low collagen concentration, the amount of Pyr cross-links
41 affects the textural properties of fresh or smoked salmon fresh products (Johnston *et al.*, 2005). On
42 the other hand, in mantle of different squid species (*Loligo pealei* and *Todarodes pacificus*) was
43 reported an increase in their Pyr and insoluble collagen fraction contents after heat treatment
44 (Ando *et al.*, 2001). Specifically in jumbo squid, (*Dosidicus gigas*), scarce information about
45 collagen characterization is available.

46 In previous studies, the content as well some physical and chemical properties of pepsin-soluble
47 (SPC) and insoluble collagen (IC) were compared in mantle, arm, and fin from adult fresh jumbo
48 squid (Torres-Arreola *et al.*, 2008). In those, the use of differential scanning calorimetry (DSC)
49 showed a very high molecular structure transition at 115-120 °C for SPC. The highest T_{max} and ΔH

50 were detected for arms collagen. These facts lead to suggest the presence of LOX in jumbo squid
51 tissues. The procedures followed for the seafood enzyme purification are always based on those
52 developed for mammalian, however most of the time this would be modify to obtain better
53 results. LOX was not previously extracted from seafood products; therefore it is necessary
54 development a right methodology to purify this enzyme. Therefore, the aims of this work were:
55 the determination of LOX activity in jumbo squid muscle; the establishment of a procedure to
56 partially purified LOX from jumbo squid muscle tentacles; the determination of the IC50 for the
57 inhibition of LOX by β -aminopropionitrile fumarate, the specific LOX inhibitor. This report
58 confirmed the presence of lysyl oxidase in jumbo squid.

59

60 **Material and methods**

61 Jumbo squid was caught from the Gulf of California (28.75° N / 112.25° W, 15-18°C)
62 during the fall season of 2008. Samples were frozen immediately with N₂ (-80°C) and transported
63 to the laboratory. Squid specimens had a length of 45-50 cm and a weight of 5-6 kg.

64

65 Preparation of enzyme extract

66 The ground tissue (350 g of squid tentacles) was extracted twice with 200 mL of 0.4 M NaCl, 16
67 mM potassium phosphate buffer (KH₂PO₄ and K₂HPO₄), pH 7.8. The extracted pellets were mixed
68 and the protein extracted with 4 M urea, 16 mM potassium phosphate buffer , pH 7.8 (EC1)
69 (Kagan and Kai, 1995).

70

71 Purification procedure

72 The procedure developed for the purification of LOX from jumbo squid tentacles included the
73 following steps: (1) the EC1 was concentrated using an amicon-10 ultrafiltration disc (Millipore
74 Co.); (2) then the EC1 concentrated was isolated by gel filtration using a Sephadex G-75 column
75 (1.6 X 110 cm) (GE Healthcare Co.) equilibrated with 6 M urea, 16 mM potassium phosphate buffer
76 (KH_2PO_4 and K_2HPO_4), pH 7.8; (3) the enzymatically active fractions were pooled, and the urea
77 concentration was adjusted from 6 to 2 M by dilution with 16 mM potassium phosphate buffer
78 (KH_2PO_4 and K_2HPO_4), pH 7.8; (4) the sample obtained were loaded to an anion-exchange column
79 at a flow rate of 0.66 mL/min. The column was previously equilibrated with 2 M urea, 16 mM
80 potassium phosphate buffer, pH 7.8, then with 16 mM potassium phosphate buffer, pH 7.8,
81 followed by 0.4 M NaCl, 16 mM potassium phosphate buffer, pH 7.8. The enzyme was eluted using
82 6 M urea 0.4 M NaCl, 16 mM potassium phosphate buffer, pH 7.8.

83

84 Estimation of molecular mass

85 The molecular mass of the purified enzyme was estimated by sodium dodecyl sulphate-12%
86 polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing conditions (Laemmli, 1970). The gel
87 was stained with silver nitrate (Blum et al., 1987). Images of samples on electrophoresis gels were
88 captured by using imagen densitometer (Bio-Rad Model GS-700).

89 Assay for LOX activity.

90 The activity was measured by fluorometric detection using the amplex red-based method
91 (Palamakumbura and Trackman, 2002), adjusting the methodology to use less reactive. Substrate
92 (1,5-diaminopentane) solution (959 μL) was prepared before the enzyme (50 μL) was added.

93 Substrate solution containing 1.2 M urea, 0.05 M sodium borate, pH 8.2, 1 unit/mL horseradish
94 peroxidase, 10 mM Amplex red (N-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine), and 10 mM 1,5-
95 diaminopentane. The reaction mixture was incubated for 30 min at 37 °C and stopped by cooling
96 on ice. The amount of hydrogen peroxide produced by the action of LOX was determined by
97 comparing fluorescence changes to a standard plot relating fluorescence change to nmol of
98 hydrogen peroxide added to assays lacking LOX.

99

100 Inhibition assays.

101 The specific inhibitor β -aminopropionitrile (BAPN) (Palamakumbura and Trackman, 2002) was
102 used for the enzyme inhibition study. To the enzyme was added BAPN for the inhibitor
103 concentrations to be 0.5-500 μ M. The enzyme with and without inhibitor was incubating for 30
104 min at 37°C. The remaining activity was determined under standard assay conditions. Inhibition of
105 enzyme activity was expressed as a percentage of the activity without modifiers. The half maximal
106 inhibitory concentration (IC_{50}) was determined by constructing a dose-response curve.

107

108 Statistics

109 Statistical design of the present study aimed to reduce the variation by replication. Reported data
110 of LOX activity during purification and inhibition assay are based on the average from three
111 determinations. The variation among replicates was <10%. Descriptive statistics was used to
112 analyze the data (Glover and Mitchell, 2008).

113

114 **Results**

115

116 Previously, we suggested that LOX-like activity was present in jumbo squid tentacles due to the
117 high thermal resistance detected in the collagen extracted as the results of covalent cross-linkages
118 generated by a LOX-like enzyme present in tissue (Torres-Arreola *et al.*, 2008). This hypothesis was
119 probed in this work as a LOX-like activity in the extract of jumbo squid tentacles was detected
120 (Table 1).

121

122 Purification

123 In the present study, the partial purification procedure for LOX from jumbo squid tentacles was
124 development. Three purification steps were established. The chromatography profile on anion-
125 exchange chromatography showed that one enzymatic active peak was eluted from a linear
126 gradient from 2 to 6 M urea (Figure 1), where most of the contaminating proteins were removed.
127 A summary of the purification is shown in Table 1. About 2.04mg of LOX were obtained from 350 g
128 of jumbo squid tentacles; the overall recovery was 3.8 % with a 390-fold increase in specific
129 activity.

130

131 Electrophoresis analysis

132 After anion exchange chromatography the SDS-PAGE electrophoresis analysis revealed two
133 fractions (Figure 2), one with a molecular weight in the range of 30-32 kDa, that represented 80%
134 of total protein according with densitometric analysis (Figure 3), and the second one with 24-26
135 kDa (20%).

136

137 Assay of LOX inhibition

138 The effect of β -aminopropionitrile fumarate (BAPN) on LOX from jumbo squid tentacles was
139 evaluated. As shown in table 2, the activity was strongly inhibited (<90%) in the presence of BAPN
140 in concentration of 500 μ M and it was dose–response related, with EC_{50} of 67.99 μ M (Figure 4).

141

142 **Discussion and conclusions**

143 Lysyl oxidase has been widely studied in mammalian tissues, mainly with a biomedical approach.
144 In seafood products the LOX activity was measured only on over expressed protein from
145 freshwater fish (Anderson *et al.*, 2007; Gansner *et al.*, 2007; Reynaud *et al.* 2008). However, no
146 enzyme was extracted and purified directly from tissue. Moreover, as any enzyme the LOX can
147 present genetic variability (Consuegra and Johnston, 2006).

148 In the present work, we developed a protocol for the partial purification of LOX from the Sea of
149 Cortez jumbo squid tentacles by gel filtration and anion exchange column chromatography. The
150 gel filtration was developed from the purification of Kagan *et al* (1995) with some modification,
151 whereas anion exchange was based on Palamakumbura and Trackman (2002) with some
152 modifications. On the anion exchange the LOX was eluted with 2 to 6 M urea, which is similar to
153 the purification of bovine aorta muscle. The LOX can hydrolyze specific substrate for lysyl oxidases,
154 but showed less activity than those reported for bovine aorta muscle extracted (Palamakumbura
155 and Trackman, 2002). The partial purified LOX showed two bands, one with an apparent molecular
156 mass of 32-34 kDa and the second about 24-26 kDa. Results are similar to those reported for
157 mammals (Kagan *et al.*, 1995; Palamakumbura and Trackman, 2002) and in the over expressed

158 LOX from zebrafish. Reynaud *et al.* (2008) showed that LOX over expressed can be secreted and
159 processed in a similar way than mammals LOX with a 50 kDa proenzyme and a cleaved form of 32
160 kDa.

161 β -aminopropionitrile, the specific inhibitor of lysyl oxidase ((Tang *et al.*, 1983; Palamakumbura and
162 Trackman, 2002) was used to study the inhibition of LOX from jumbo squid tentacles. The
163 substrate used was 1,5-diaminopentane, considering specific substrate for LOX. The inhibition of
164 protein isolated activity in jumbo squid by BAPN confirms the presence of lysyl oxidase. That value
165 was lower than reported for the inhibition of over expressed LOX from zebrafish by BAPN, with
166 EC₅₀ value of around 100 μ M (van Boxtel *et al.*, 2010). Those results suggest more susceptibility of
167 LOX extracted from jumbo squid muscle to be inhibited by BAPN, comparing with freshwater fish
168 and mammals.

169 This paper reported the activity of the LOX purified from jumbo squid tentacles for the first time.
170 The LOX from jumbo squid tentacles showed similar molecular weight to lysyl oxidase of mammals
171 and LOX over expressed from fresh water fish and it was susceptibility to inhibition to LOX specific
172 inhibitor. The procedure purification established purified the enzyme 390-fold but with low yield,
173 therefore other purification procedures are noteworthy.

174

175 **Acknowledgements**

176 We thank to M.C. Ciria Guadalupe Figueroa-Soto for her technical assistance during the
177 experimental procedure of this work.

178

179 **References**

180 Anderson, C., Bartlett, S., Gansner, J., Wilson, D., He, L.; Gitlin, J.D., Kelsh, R. & Dowden, J. (2007).
181 Chemical genetics suggests a critical role for lysyl oxidase in zebrafish notochord
182 morphogenesis. *Molecular Biosystems*, **3**, 51–59.

183 Ando, M., Nakagishi, Y., Yoshida, K., Nakao, M., Nakawawa, T., Makinodan, Y., Tsukamasa, Y. &
184 Kawasaki, K. (2006). Pyridinoline concentration in muscular and skin collagen of fish and
185 relationship between collagen solubility and pyridinoline concentration in fish muscular
186 collagen. *Fisheries Science*, **72**, 1104-1108.

187 Ando, M., Ando, M., Makino, M., Tsukamasa, Y., Makinodan, Y. & Miyoshi, M. (2001).
188 Interdependence between heat stability and pyridinoline contents of squid mantle
189 collagen. *Journal of Food Science*, **66**, 265–269.

190 Badii, F. & Howell, N. (2003) Elucidation of the effect of formaldehyde and lipids on frozen stored
191 cod collagen by FT-Raman spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Journal of*
192 *Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 1440-1446.

193 Eyre, D. (1987) Collagen crosslinking amino acids. In: *Methods in Enzymology* (ed. By L.W.
194 Cunningham) pp 115–139. Academic Press. London.

195 Gansner, J., Mendelsohn, B., Hultman, K., Johnson, S. & Gitlin, J. (2007). Essential role of lysyl
196 oxidases in notochord development. *Developmental Biology*, **307**, 202–213.

197 Johnston, I., Li X., Bickerdike, R., Lindsay, E., Campbell, P., Nickell, D. & Dingwall, A. (2005)
198 Hydroxyllysyl Pyridinoline Cross-Link Concentration Affects the Textural Properties of Fresh
199 and Smoked Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Flesh. *Journal of Agricultural and Food*
200 *Chemistry*. **53**, 6844-6850

201 Kagan, H. & Cai, P. (1995) Isolation of active site peptides of lysyl oxidase. *Methods in Enzymology*
202 **258**, 122–132.

203 Morales, J., Montero, P. & Moral, A. (2000) Isolation and partial characterization of two types of
204 muscle collagen in some cephalopods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**,
205 2142-2148.

206 Palamakumbura A. & Trakman P. 2002. A fluorometric assay for detection of lysyl oxidase enzyme
207 activity in biological samples. *Analytical Biochemistry* **300**, 245-251.

208 Sikorski, Z & Borderias, J. Collagen in the muscles and skins of marine animals. In: *Sea Food*
209 *Protein*, Sikorski, ZE, Pan, BS, Shahidi, F (eds). Chapman and Hall, New York. **1994**, 58-70.

210 Reynaud, C., Baas, D.; Gleyzal, C., Le Guellec, D., & Sommer, P. (2008) Morpholino knockdown of
211 lysyl oxidase impairs zebrafish development, and reflects some aspects of copper
212 metabolism disorders. *Matrix Biology* **27**, 547–560.

213 Tang, S., Trackman, P. & Kagan, H. (1983) Reaction of aortic lysyl oxidase with beta-
214 aminopropionitrile. *Journa of Biological Chemistry* **258**:4331–4338.

215 Torres-Arreola, W., Pacheco-Aguilar R., Sotelo-Mundo, R., Rouzaud-Sandez, O. & Ezquerra-Brauer,
216 M. (2008) Caracterización parcial del colágeno extraído a partir del manto, aleta y
217 tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *Ciencia y Tecnología Alimentaria* **6**, 101-
218 108.

219 van Boxtel, A., Kamstra, J., Fluitsma, D., & Legler, J. (2010) Dithiocarbamates are teratogenic to
220 developing zebra!sh through inhibition of lysyl oxidase activity, *Toxicology and Applied*
221 *Pharmacology*. (Article in press).

222

223 **Figure Legends**

224 **Fig. 1** Ion exchange column chromatography purification of lysyl oxidase from jumbo squid
225 (*Dosidicus gigas*) tentacles. Elution was with 2 to 6 M urea concentration increments (fractions 60-
226 75). Protein content is expressed in Abs 280 nm and activity in terms of Fluorescence excitation
227 563 nm and emission 585 nm.

228 **Fig. 2** Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the LOX fractions
229 extracted from jumbo squid (*Dosidicus gigas*). Lane A: Protein standard. Lane B: Crude extract
230 (EC1). Lane C: Fraction eluted from gel filtration chromatography (EC2). Lane D: Fraction eluted
231 from anion exchange (EC3). Note: Gels were stained with silver nitrate solution.

232 **Fig. 3** Densitograms of jumbo squid LOX active fractions eluted from the anion exchange
233 chromatography column.

234 **Fig. 4** Concentration-response curve to the β -aminopropionitrile (BAPN) in the jumbo squid lysyl
235 oxidase (LOX) activity. Data are presented as percentage of the corresponding control. $EC_{50} = 67.99$
236 μ M

237

238

239

240

241

242

Table 1 Summary of the purification procedure to obtain the lysyl oxidase from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) tentacles.

Purification Steps	Total Protein (mg)	Total activity (Unit)*	Specific activity (U/mg protein)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	26300	4.23	0.0002	100	1
Gel filtration	102.6	0.26	0.003	6.14	15
Anion exchange	2.04	0.16	0.078	3.8	390

*Units= nanomoles of H₂O₂ produced in one minute.

Data are average of three determinations, the variation among replicates was <10%.

243 **Table 2** Effect of inhibitor concentration on the relative activity of jumbo squid (*Dosidicus gigas*)
244 tentacles lysyl oxidase.

BAPN* (μ M)	Residual activity (%)
0.5	90.4
5	80.6
50	53.3
500	4.2

245 *BAPN= β -aminopropionitrile fumarate

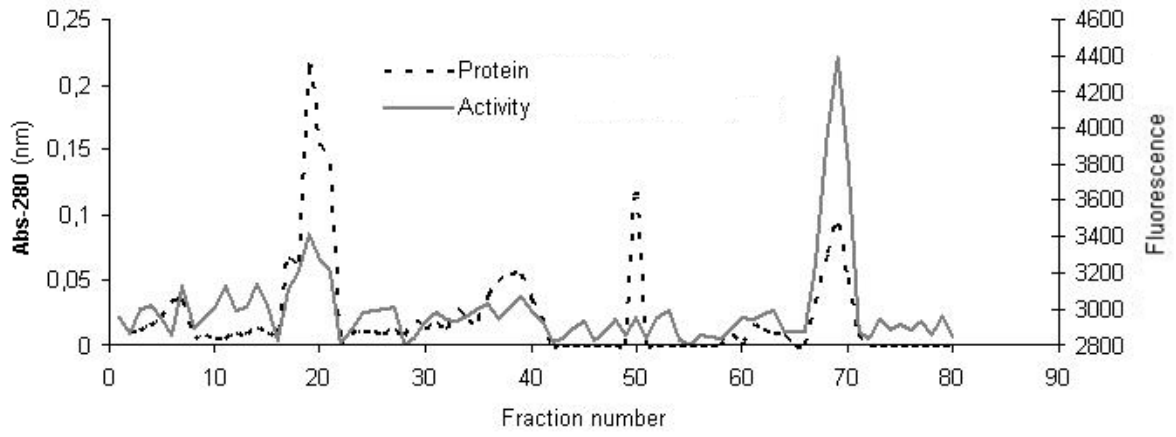
246 Jumbo squid tentacles lysyl oxidase was incubated with inhibitor at 25°C for 60 min

247 1,5-diaminopentane as substrate in 1.2 M urea, 0.05 M sodium borate, pH 8.2, 1 unit/mL
248 horseradish peroxidase, 10 mM Amplex red (N-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine), and 10
249 mM 1,5-diaminopentane 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) was added, and activity
250 of the enzyme was measured as described under Materials and Methods.

251 Data are average of 3 determinations, the variation among replicates was <10%.

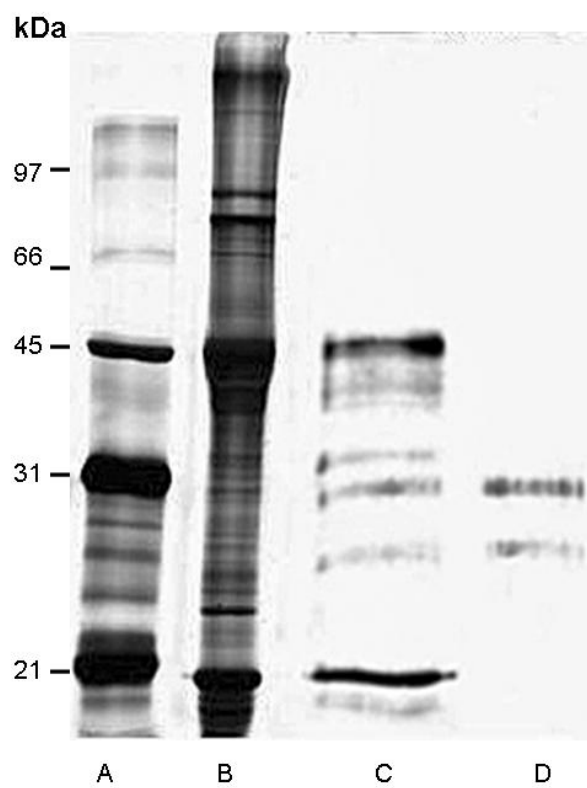
252

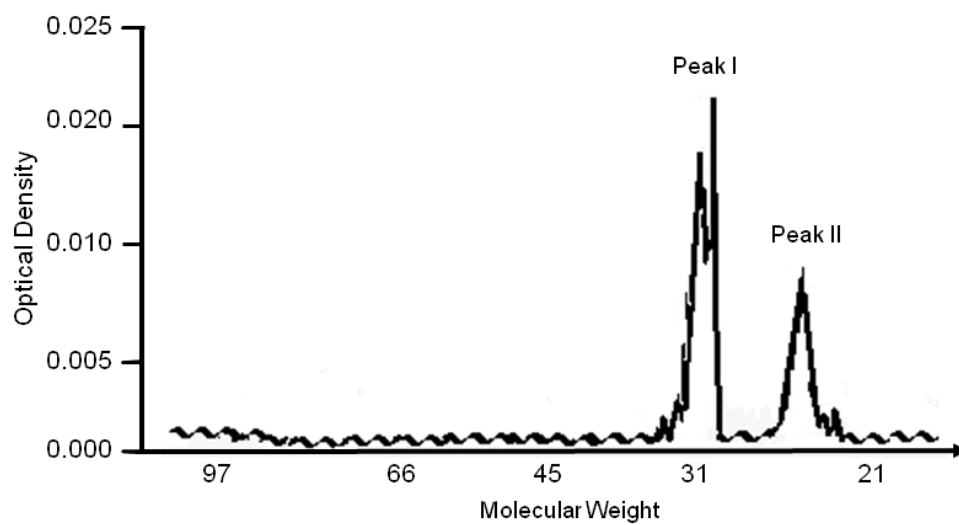
253



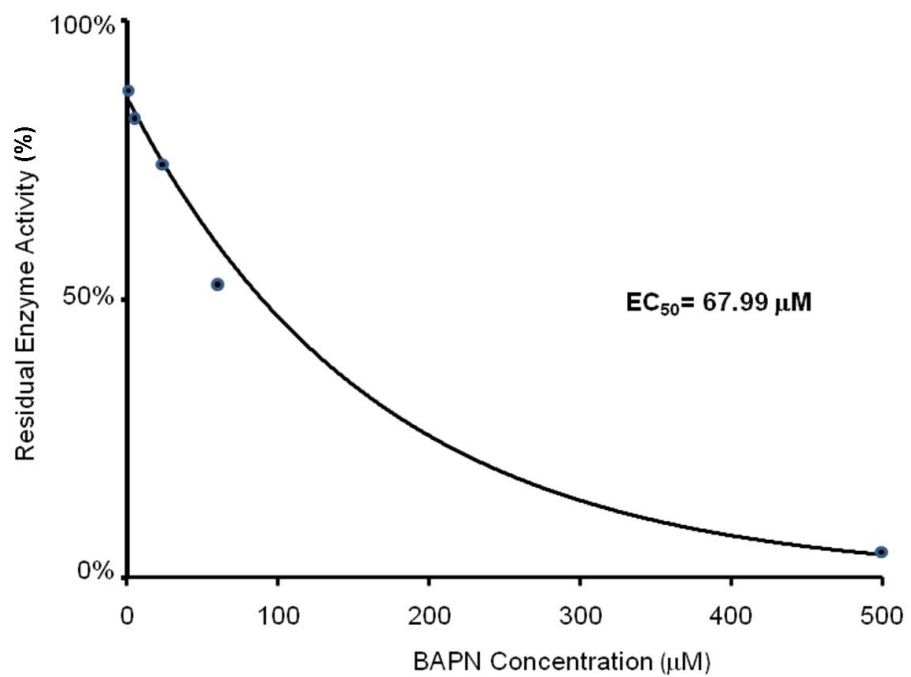
254

255





262



263

CAPITULO 3.

Purificación de lisil-oxidasa del músculo de calamar gigante: evaluación de sus constantes cinéticas y características bioquímica.

1 **Partial characterization of Lysyl oxidase purified from jumbo squid (*Dosidicus gigas*)**
2 **muscle.**

3 Torres-Arreola Wilfrido¹, Ezquerria-Brauer Josafat Marina ², Pacheco-Aguilar Ramón¹,
4 Rouzaud-Sandez Ofelia², Sotelo-Mundo Rogerio¹, Figueroa-Soto Ciria Guadalupe¹ &
5 Lugo-Sanchez Maria¹.

6 ¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C, P.O.Box 1735 Hermosillo,
7 83000 Mexico.

8 ²Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora

9 **Correspondence and Present adress:**

10

11 **Abstract**

12 A lysyl oxidase (LO; E.C.1.4.3.13) was purified and characterized for the first time
13 from jumbo squid muscle (*Dosidicus gigas*). The purification procedure consisted of urea
14 fraction and a combination of size-exclusion and anion-exchange chromatography and
15 Sephadex G-50. The enzyme was purified 1900 fold with a 1.9 % yield and has a molecular
16 weight of 32 kDa, as estimated by SDS-PAGE. Based on activity for the specific substrate
17 1,5-diaminopentane and its inhibition by β -aminopropionitrile (BAPN) it was concluded to
18 be a lysyl oxidase. The optimum activity of the enzyme was found at pH 8.0-8.2 at 37°C
19 and around 65 °C at pH 8.2. Activation energy (E_a) of the enzyme was 69.94 kJK⁻¹mol⁻¹.
20 The capacity of the LO to work at different temperatures (20 to 90°C) at pH 8.2 were
21 detected. This work contributes to the molecular understanding of the determinants of
22 collagen functional properties in cephalopods.

23 **Key Words:** jumbo squid; lysyl oxidase; purification; characterization.

24

25 **1. Introduction**

26 Lysyl oxidase (LO; E.C.1.4.3.13) is the first step of collagen and elastin covalent
27 cross-links by oxidizing peptidyl lysine and hydroxylysine (Kagan, 1986; Smith-Mungo &
28 Kagan, 1998). The peptidyl aldehyde can then condense with neighboring amino groups or
29 peptidyl aldehydes to form the covalent crosslinkages found in fibrillar collagen and elastin
30 (Kagan, 1986). Initial attempts to purify LO from connective tissue were thwarted by the
31 insolubility of the enzyme in neutral saline extracts of these tissues. The finding that the
32 enzyme was readily solubilised by buffers with 4 to 6 M urea (Narayanan, Siegel & Martin,
33 1974; Kagan & Li, 2003) led to its successful purification of LO from animal species.
34 LO was first discovered in mammals (Pinell & Martin, 1968) and research focussed on its
35 specificity towards collagen and elastin substrates, studies also approaches physical-
36 chemical properties and catalytic mechanism (Kagan, 1986; Kagan, Reddy, Narasimhan, &
37 Csizsar, 1995; Smith-Mungo & Kagan, 1998). On the other hand, in aquatic organisms
38 there are reports about LO in zebrafish (*Dario rerio*) and atlantic salmon (*Salmo salar*)
39 (Consuegra & Johnston, 2006; Reynaud, Baas, Gleyzal, Le Guellec & Sommer, 2008; Van
40 Boxtel, Kamstra, Fluitsma & Legler, 2010).

41 Recently, LO was extracted and identified from jumbo squid (*Dosidicus gigas*)
42 muscle (Torres-Arreola, Ezquerra-Brauer, Valenzuela-Soto, Garcia-Sanchez, & Pacheco-
43 Aguilar, submitted) with some characteristics similar to terrestrial animals. However, a
44 more thorough characterization is needed. Collagen is a main constituent of intramuscular
45 connective tissue in animal tissues and plays an important role in muscle structure. (Eyre,
46 1987; Badii & Howell, 2003; Ando, Nakagishi, Yoshida, Nakao, Nakawawa, Makinodan,
47 Tsukamasa & Kawasaki, 2006). For instance, a close relationship is expected between LO
48 activity and collagen strenght in jumbo squid muscle (Torres-Arreola *et al*; 2008).

49 Therefore, the objective of this work is the purification and partial characterization of LO in
50 jumbo squid muscle. This knowledge will aid to have a better understanding of collagen
51 cross-links in jumbo squid muscle.

52

53 **2. Material and methods**

54 *2.1. Sample*

55 Jumbo squid was caught from the Gulf of California (28.75° N / 112.25° W, 15-
56 18°C) during the fall season of 2008. Samples were frozen immediately with liquid N₂ (-
57 80°C) and transported to the laboratory. Squid specimens had a length of 45-50 cm and a
58 weight of 5-6 kg.

59 *2.2. LO extraction*

60 The ground tissue (350 g of squid tentacles) was extracted twice with 200 mL of 0.4
61 M NaCl, 16 mM potassium phosphate buffer (KH₂PO₄ and K₂HPO₄), pH 7.8. The extracted
62 pellets were mixed and the protein extracted with 4 M urea, 16 mM potassium phosphate
63 buffer, pH 7.8 (EC1) (Kagan & Kai, 1995).

64 *2.3. Purification procedure*

65 LOX was isolated and purified from squid muscle according to the method reported
66 by Torres-Arreola *et al* (submitted), with some modifications. The EC1 was concentrated
67 using an Amicon-10 ultrafiltration disc (Millipore Co.), and then isolated by gel filtration
68 using a Sephadex G-75 column (1.6 X 110 cm) (GE Healthcare Co.) equilibrated with 6
69 urea, 16 mM potassium phosphate buffer (KH₂PO₄ and K₂HPO₄), pH 7.8. The
70 enzymatically active fractions were pooled, and the urea concentration was adjusted from 6
71 to 2 M by dilution with 16 mM potassium phosphate buffer (KH₂PO₄ and K₂HPO₄), pH
72 7.8. The sample thus obtained was loaded on an anion-exchange column at a flow rate of

73 0.66 mL/min. The column was previously equilibrated with 2 M urea, 16 mM potassium
74 phosphate buffer, pH 7.8, then with 16 mM potassium phosphate buffer, pH 7.8, followed
75 by 0.4 M NaCl, 16 mM potassium phosphate buffer, pH 7.8. The enzyme was eluted using
76 6 M urea 0.4 M NaCl, 16 mM potassium phosphate buffer, pH 7.8. The enzymatically
77 active fractions were pooled, and then finally purified by gel filtration using a Shephadex
78 G-50 column (1.6 X 110 cm) (GE Healthcare Co.) equilibrated with 6 M urea, 16 mM
79 potassium phosphate buffer (KH₂PO₄ and K₂HPO₄), pH 7.8.

80

81 *2.5. LO Characterization*

82

83 *2.5.1. Electrophoresis*

84 The active fractions was analyzed by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel
85 electrophoresis (SDS-PAGE) to investigate LOX purity, 12% polyacrylamide gels with
86 0.1% SDS at pH 8.8 and 2-4 °C were used under reducing conditions (Laemmli, 1970). The
87 gel was stained with silver nitrate (Blum et al., 1987). Images of samples on electrophoresis
88 gels were captured by using imagen densitometer (Bio-Rad Model GS-700).

89

90 *2.5.2. Assay for LOX activity*

91 The activity was measured by fluorometric detection using the Amplex red-based
92 method (Palamakumbura A. & Trackman P., 2002). Using 1,5-diaminopentane as the
93 substrate, as follows: 959 µL of solution were prepared containing 1.2 M urea, 0.05 M
94 sodium borate, pH 8.2, 1 unit/mL horseradish peroxidase, 10 mM Amplex red (Fluka
95 Analytical), 10 mM 1,5-diaminopentane and mixed with 50 µL of enzyme extract. The
96 reaction mixture was incubated for 30 min at 37 °C and stopped by cooling on ice. The

97 amount of hydrogen peroxide produced by the action of LO was determined by comparing
98 fluorescence changes to a standard plot relating fluorescence change to nmol of hydrogen
99 peroxide added to assays lacking LO.

100

101 *2.5.3. Inhibition assays.*

102 The specific inhibitor β -aminopropionitrile (BAPN) (Tang, Trackman & Kagan, 1983) was
103 used for the purified LO inhibition study. To the enzyme was added BAPN for the inhibitor
104 concentrations to be 500 μ M, a reported concentration for total inhibition (Palamakumbura
105 & Trackman, 2002). The enzyme with and without inhibitor was incubating for 30 min at
106 37°C. The remaining activity was determined under standard assay conditions. Inhibition
107 of enzyme activity was expressed as a percentage of the activity without modifiers.

108

109 *2.5.4. Optimum pH*

110 Optimum pH and experimental pK was evaluated by measuring the activity of
111 enzyme pure using standard conditions as described above. pH was varied from 7 to 10
112 with sodium borate.

113

114 *2.5.5. Optimum temperature*

115 Optimum temperature of pure LO was measured at pH 8.2, using 1,5-
116 diaminopentane as the substrate (standard conditions), and varying temperature in the range
117 25 to 90 °C with intervals of 5 °C. Activation energy (E_a) for LO was determined plotting
118 activity vs $1/T$ (°K): $E_a = -m(2.3R)$ where m is the slope and R is gas constant (8.3144 J°K⁻¹
119 mol⁻¹).

120

121 2.5.6. *Thermostability*

122 Temperature stability of pure LO was evaluated by incubation at various
123 temperatures from 25 to 90 for 60 min, and measuring residual activity at 37 °C using 1,5-
124 diaminopentane as substrate.

125 2.6. *Statistical analysis*

126 Reported data of LO activity during purification and characterization assays are
127 based on the average from three determinations. The variation among replicates was
128 <10%. Descriptive statistics was used to analyze the data (Glover & Mitchell, 2008).

129

130 **3. Results and discussion**

131 3.1. *Purification of Lysyl oxidase*

132 As shown in Figure 1, size-exclusion chromatography with Sephadex G-50 gave the
133 two peaks. LO specific activity was detected in fractions 17-29 (first peak). Results on
134 final purification of LO extracted from jumbo squid are summarized in Table 1. About 0.21
135 mg of LO were obtained from 350 g of jumbo squid muscle; the overall recovery was 1.9
136 % with a 1900-fold increase in specific activity. This yield is lower compared with LO
137 extracted from bovine aorta (0.4 mg/350 g of tissue) (Palamakumbar & Trackman, 2002).
138 The low LO activity is due to low collagen concentration in marine organism, compared
139 with those detected in terrestrial animals, like bovine tissues. Tissues with high content of
140 collagen and elastine, showed activity of the LO ranging from 7 to 140 mg/350 g tissue
141 (Rucker, Romero-Chapman, Wong, Lee, Uriu-Hare & Keen, 1996). The detection of LO in
142 jumbo squid tissue, no matter the low activity, this enzyme may induce the crosslinking
143 between collagen fibers in jumbo squid tissues, and play an important role in their texture
144 (Eyre, 1987; Badii & Howell, 2003; Ando *et al.*, 2006).

145

146 3.2. Characterization

147

148 3.2.1. Molecular weight (MW)

149 Electrophoresis showed that LO appeared as one band (Figure 2). However,
150 according with densitometric analysis (Figure 3) the single band appears to be two isoforms
151 of LO with very similar molecular weight. The mature catalyst isolated from mammals
152 migrates as a 32 kDa, apparently single protein band by SDS-PAGE (Kagan & Li, 2003).
153 However, this apparently homogeneous enzyme resolved into four 32 kDa isoforms, each
154 of these isoforms displayed the same catalytic mechanism, specificity and inhibitor profile
155 (Sullivan & Kagan, 1982; Kim, Kim, Jung, Park, Yoo, Ko, Csiszar, Choi & Kim; 2003).
156 This fraction, based on its specific activity and inhibition, was considered to contain pure
157 lysyl oxidase.

158 The MW of isolated LO was 32 kDa (Figure 2), wich is in the range of lysyl oxidase
159 purified from different vertebrate species, 28 kDa for human and chick and 32 kDa for
160 bovine, rat and over expressed enzyme from freshwater fish (Kagan & Li, 2003; Reynaud
161 *et al.* 2008).

162

163 3.2.2. Specific activity

164 Amine oxidase (1,5-diaminopentane) specific activity in the pure LO was evaluated.
165 Jumbo squid LO showed specific activity of 0.38 U/mg protein, indicating times lower than
166 bovine LO (40 U/mg protein) (Palamakumbar & Trackman, 2002).

167

168

169 3.2.3. *Optimum pH*

170 The optimum pH for jumbo squid LO activity falls in the range 8.0-8.2, but high
171 relative activity was observed at alkaline pH (8.6-10) for the hydrolysis of 1,5-
172 diaminopentane at 37 °C with an experimental pK of 7.09 (Figure 4). The optimum pH for
173 this enzyme extracted from mammals is in the range 7.8-8.6 (Rucker, Alyson, Mitchell,
174 Tchapanian & Last, 2003). Moreover, purified LO readily oxidized a number of basic,
175 globular proteins with pI values >8, but did not oxidize neutral or acidic proteins with pI
176 values <8 (Kagan, Williams, Williamson & Anderson, 1984).

177

178 3.2.4. *Optimum temperature*

179 The optimum temperature for jumbo squid LO activity under experimental
180 conditions was 65 °C (Figure 5) and its E_a in order to start catalysis is $69.94 \text{ J}^\circ\text{K}^{-1}\text{mol}^{-1}$
181 (Figure 6). These results were slightly higher than the optimum temperature for LO from
182 terrestrial species (50-60 °C). It has been reported that this thermostability of LO is due to
183 its intramolecular crosslink at active site by the stable covalent bond within lysyl tyrosine
184 quinone (LTQ) (Trackman, Zoski & Kagan, 1981; Rucker *et al*, 2003; Kagan & Li, 2003).
185 The difference between optimum temperature of jumbo squid LO and vertebrates might be
186 attributable to the fact that jumbo squid is migratory specie and may evolved to have a
187 broad range of habitat temperature.

188

189 3.2.5. *Temperature stability*

190 Thermostability of this enzyme is very similar to that of vertebrate's lysyl oxidase.
191 It is thermolabile at $\geq 85 \text{ }^\circ\text{C}$, stable at $\leq 70 \text{ }^\circ\text{C}$, and sensitive at $75 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figure 7). Specifically,
192 jumbo squid LO is similar in its irreversible denaturation temperature to mammals LO,

193 which is very stable at temperatures of 55-60 °C and completely inactive at 92 °C
194 (Trackman *et al*, 1981; Kagan & Li, 2003).

195

196 **4. Conclusions**

197 Based on SDS-PAGE, the activity for the specific substrate 1,5-diaminopentane,
198 and its susceptibility to inhibitor (BAPN), the enzyme isolated from muscle of jumbo squid
199 tentacles was determined to be lysyl oxidase.

200 The enzyme was similar in many biochemical characteristics to lysyl oxidase of
201 terrestrial animals, but was substantially different in optimum activity temperature.

202 It is difficult to compare the specific activity and yield of enzyme purified from
203 jumbo squid with that of lysyl oxidase reported by other workers for vertebrates due to its
204 habitat and environmental differences. The physical-chemical properties of the enzyme
205 may also vary between these sources.

206 Due to its effect on collagen crosslinks and textural repercussions in muscle, is
207 important to detect and purify LO in other anatomical regions from jumbo squid with the
208 aim of relation its specific characteristics with collagen behaviour.

209

210 **Acknowledgements**

211 We thank to M.C. Gisela Carvallo Ruiz for her technical assistance during the experimental
212 procedure of this work and to CONACyT for doctoral scholarship awarded to Wilfrido
213 Torres-Arreola.

214

215

216

217 **5. References**

- 218 Ando, M., Nakagishi, Y., Yoshida, K., Nakao, M., Nakawawa, T., Makinodan, Y.,
219 Tsukamasa, Y. & Kawasaki, K. (2006). Pyridinoline concentration in muscular and
220 skin collagen of fish and relationship between collagen solubility and pyridinoline
221 concentration in fish muscular collagen. *Fisheries Science*, **72**, 1104-1108.
- 222 Badii, F. & Howell, N. (2003) Elucidation of the effect of formaldehyde and lipids on
223 frozen stored cod collagen by FT-Raman spectroscopy and differential scanning
224 calorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 1440-1446.
- 225 Consuegra, S. & Johnston I. (2006) Polymorphism of the lysyl oxidase gene in relation to
226 muscle collagen cross-link concentration in Atlantic salmon. Short communication.
227 *Agriculture Research*, **37**, 1699-1702.
- 228 Eyre, D. (1987) Collagen crosslinking amino acids. In: *Methods in Enzymology* (ed. By
229 L.W. Cunningham) pp 115–139. Academic Press. London.
- 230 Glover, T. & Mitchell, K. (2008). An introduction to Biostatistics, 2nd edn. Illinois:
231 Waveland Press, Inc.
- 232 Kagan, H.; Williams, M.; Williamson, P. & Anderson, J. (1984). Influence of sequence and
233 charge on the specificity of lysyl oxidase toward protein and synthetic peptide
234 substrates. *The Journal of Biological Chemistry* **259**, 11203–11207.
- 235 Kagan, H.; Vaccaro, C.; Bronson, R.; Tang, S. & Brody J. (1986). Ultrastructural
236 immunolocalization of lysyl oxidase in vascular connective tissue. *The Journal of*
237 *Cell Biology* **103**, 1121-1128.
- 238 Kagan, H. & Cai, P. (1995a) Isolation of active site peptides of lysyl oxidase. *Methods in*
239 *Enzymology* **258**, 122–132.

240 Kagan, H.; Reddy, V.; Narasimhan, N. & Csiszar, K. (1995b) Catalytic properties and
241 structural components of lysyl oxidase. *Ciba Foundation Symposium* **192**, 100-121.

242 Kagan, H. & Li, W. (2003) Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside
243 and outside of the cell. *Journal of Cellular Biochemistry* **88**, 660-672.

244 1. Narayanan, A.; Siegel, R. & Martin, G. (1974) Stability and purification of lysyl oxidase.
245 [*Archives of Biochemistry and Biophysics*](#) **162**, 231–237.

246 Kim, M.; Kim, S.; Jung, S.; Park, J.; Yoo, H.; Ko, J.; Csiszar, K.; Choi, S. & Kim, J. (2003)
247 Expression and purification of enzymatically active forms of the human lysyl
248 oxidase-like protein 4* *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 52071-52074.

249 Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
250 bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

251 Palamakumbura A. & Trakman P. 2002. A fluorometric assay for detection of lysyl oxidase
252 enzyme activity in biological samples. *Analytical Biochemistry* **300**, 245-251.

253 Pinell, S. & Martin, G. (1968) The cross-linking of collagen and elastin: enzymatic
254 conversion of lysine in peptide linkage to a α -amino adipic-d-semialdehyde
255 (allysine) by an extract from bone. *Proceedings of the National Academy of Science*
256 *USA* **61**, 708-714.

257 Reynaud, C., Baas, D.; Gleyzal, C., Le Guellec, D., & Sommer, P. (2008) Morpholino
258 knockdown of lysyl oxidase impairs zebrafish development, and reflects some
259 aspects of copper metabolism disorders. *Matrix Biology* **27**, 547–560.

260 Rucker, R.; Romero-Chapman, N.; Wong, T., Lee, J.; Urio-Hare, J. & Keen, C. (1996)
261 Modulation of lysyl oxidase by dietary copper in rats. *Journal Nutrition* **126**, 51-60

262 Rucker, R.; Mitchell, A.; Tchaporian E. & Last J. (2003) Lysyl oxidase. *Food Science and*
263 *Technology* **122**, 493-501.

264 Smith-Mungo, L. & Kagan, H. (1998) Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple
265 functions in biology. *Matrix biology* **16**, 387-398.

266 Sullivan, K. & Kagan, H. (1982) Evidence for structural similarities in the multiple forms
267 of aortic and cartilage lysyl oxidase and a catalitically quiescent aortic protein.
268 *Journa of Biological Chemistry* **257**, 13520-13526.

269 Tang, S.; Trackman, P. & Kagan, H. (1983) Reaction of aortic lysyl oxidase with beta-
270 aminopropionitrile. *Journa of Biological Chemistry* **258**:4331–4338.

271 Torres-Arreola, W.; Pacheco-Aguilar R.; Sotelo-Mundo, R.; Rouzaud-Sandez, O. &
272 Ezquerria-Brauer, M. (2008) Caracterización parcial del colágeno extraído a partir
273 del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *Ciencia y*
274 *Tecnologia Alimentaria* **6**, 101-108.

275 Torres-Arreola, W.; Ezquerria-Brauer, M.; Valenzuela-Soto, E.; Garcia-Sanchez, G. &
276 Pacheco-Aguilar R. (2010) Lysyl Oxidase from jumbo squid (*Dosidicus gigas*)
277 muscle: Detection and partial Purification. *Journal of Food Science and Technology*
278 (Submitted).

279 Trackman, P.; Zoski, C. & Kagan, H. (1981) Development of a peroxidase-coupled
280 fluorometric assay for lysyl oxidase. *Analytical Biochemistry* **113**, 336–342.

281 van Boxtel, A.; Kamstra, J.; Fluitsma, D., & Legler, J. (2010) Dithiocarbamates are
282 teratogenic to developing zebra!sh through inhibition of lysyl oxidase activity,
283 *Toxicology and Applied Pharmacology*. (Article in press).

284

Table 1 Summary of the final purification and residual activity of lysyl oxidase from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) tentacles.

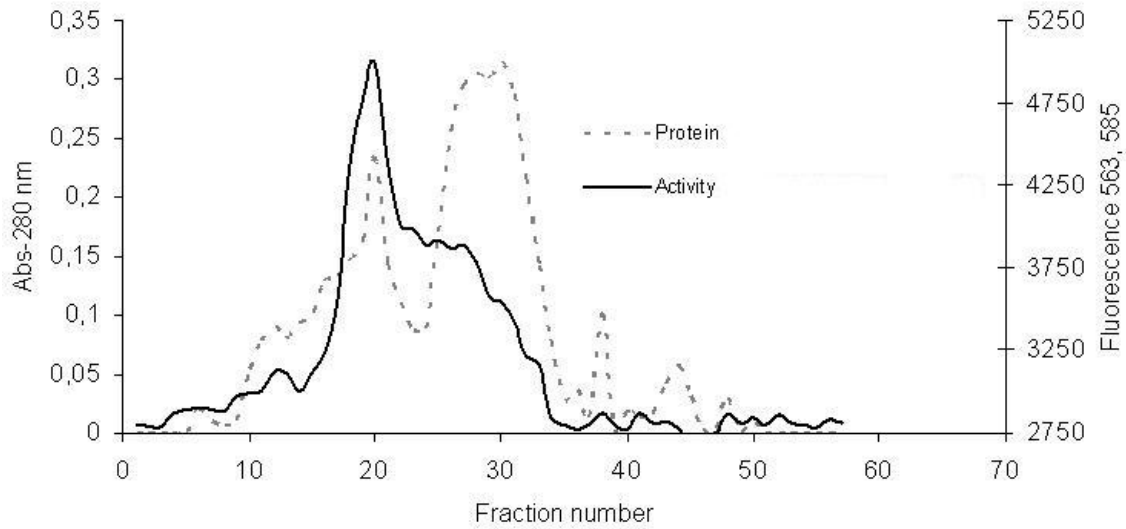
Purification Steps	Total Protein (mg)	Total activity (Units)	Specific activity (U/mg protein)*	Yield (%)	Purification (fold)	Residual activity with BAPN (%)**
Crude extract	26300	4.23	0.0002	100	1	100
Sephadex (G-50)	0.21	0.08	0.38	1.9	1900	2.5

Units= Activity was expressed as nm of hydrogen peroxide produced in 1 min

*Units= nanomoles of H₂O₂ produced in one minute.

**Jumbo squid tentacles lysyl oxidase was incubated with inhibitor (BAPN) at 25°C for 60 min, and activity of the enzyme was measured as described under Materials and Methods.

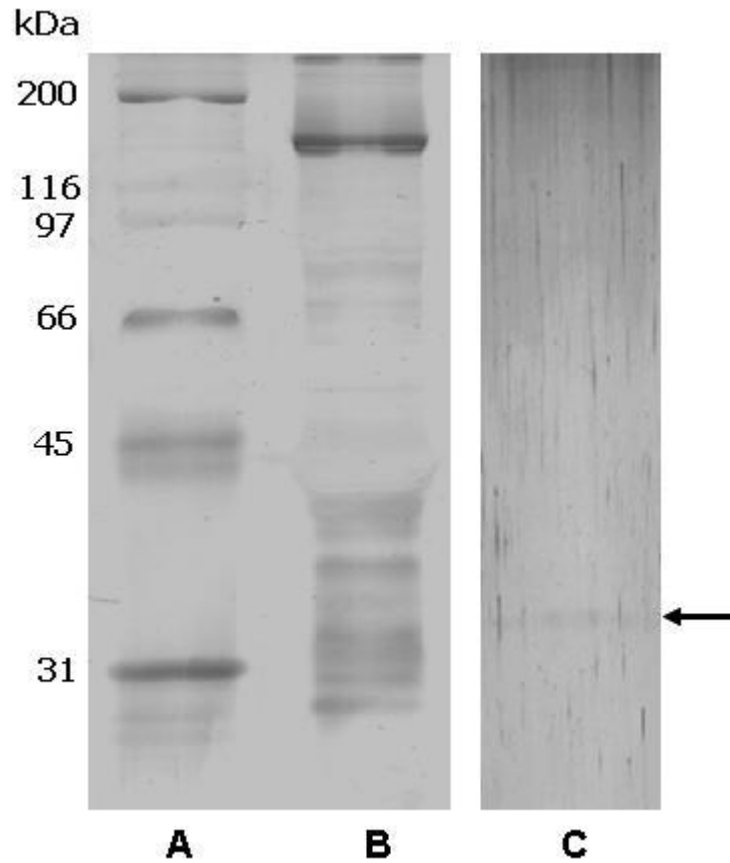
Data are average of three determinations, the variation among replicates was <10%.



287

288 **Fig. 1** Gel filtration chromatography (Sephadex G-50) purification of lysyl oxidase from
 289 jumbo squid (*Dosidicus gigas*) tentacles. Elution with 6 M urea, 16 mM potassium
 290 phosphate buffer (KH₂PO₄ and K₂HPO₄), pH 7.8. Protein content is expressed in Abs 280
 291 nm and activity in terms of Fluorescence excitation 563 nm and emission 585 nm.

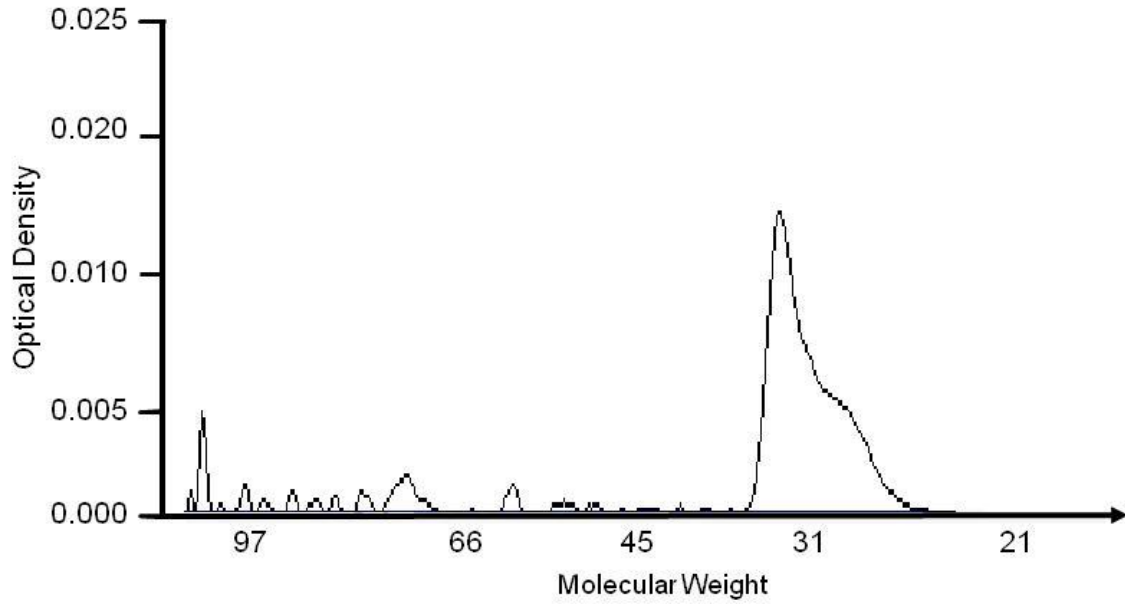
292



293

294 **Fig. 2** Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the LO
295 purified from jumbo squid (*Dosidicus gigas*). Lane A: Protein standard. Lane B: Crude
296 extract. Lane C: Fraction eluted from gel filtration (Sephadex G-50) chromatography. Note:
297 Gels were stained with silver nitrate solution.

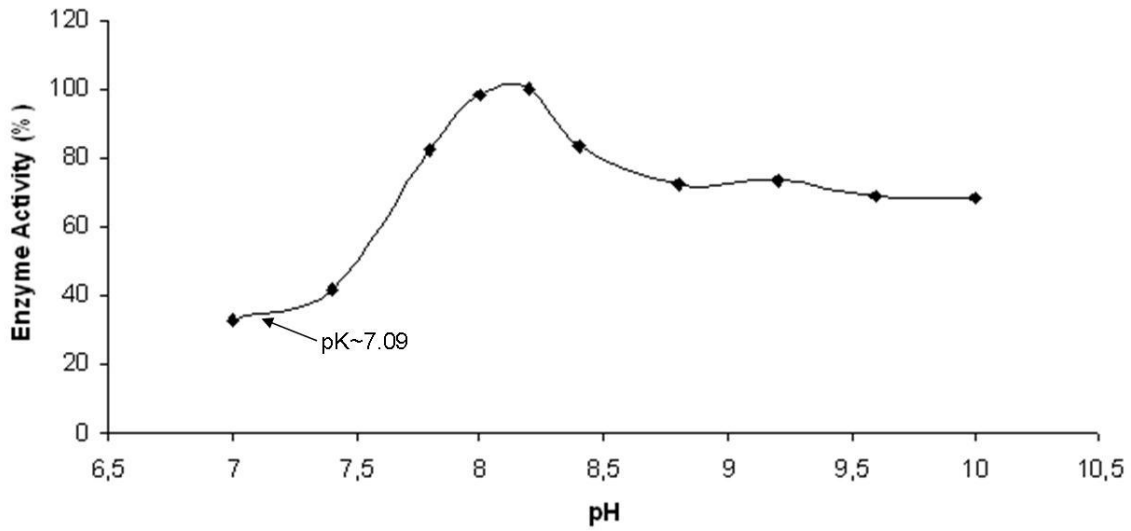
298



299

300 **Fig. 3** Densitograms of Lysyl oxidase purified from jumbo squid muscle active fractions
301 eluted from the gel filtration chromatography (Sephadex G-50) column.

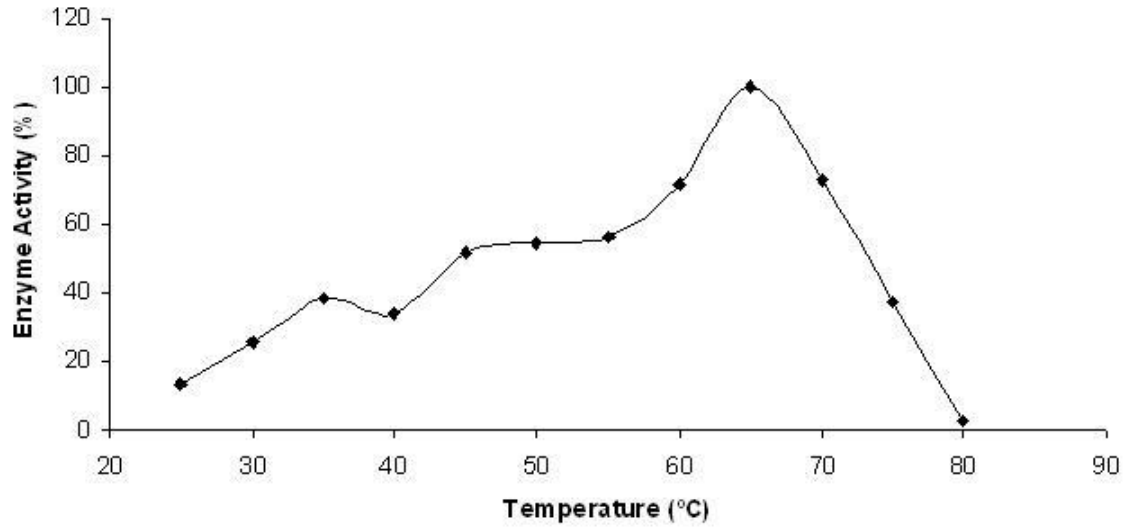
302



303

304 **Fig. 4** Optimum pH of Lysyl oxidase purified from jumbo squid muscle. Activity was
305 measured in buffer at pH range of 7-10 using 1,5-diaminopentane 10 mM as substrate at
306 25 °C. Percent of enzyme activity was estimated considering 100% the highest activity
307 detected in this assay.

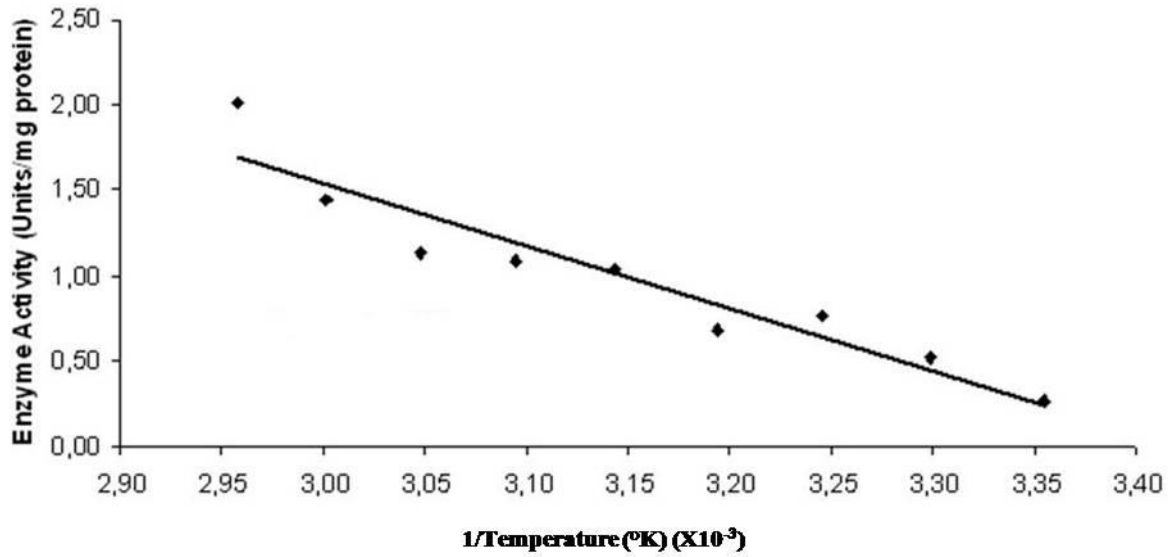
308



309

310 **Fig 5** Optimum Temperature of Lysyl oxidase purified from jumbo squid muscle. Activity
311 at pH 8.2 (16 mM potassium phosphate buffer) was evaluated using 10 mM 1,5-
312 diaminopentane as substrate and changing temperature from 25 to 90 °C. Percent of enzyme
313 activity was estimated considering 100% the highest activity detected in this assay.

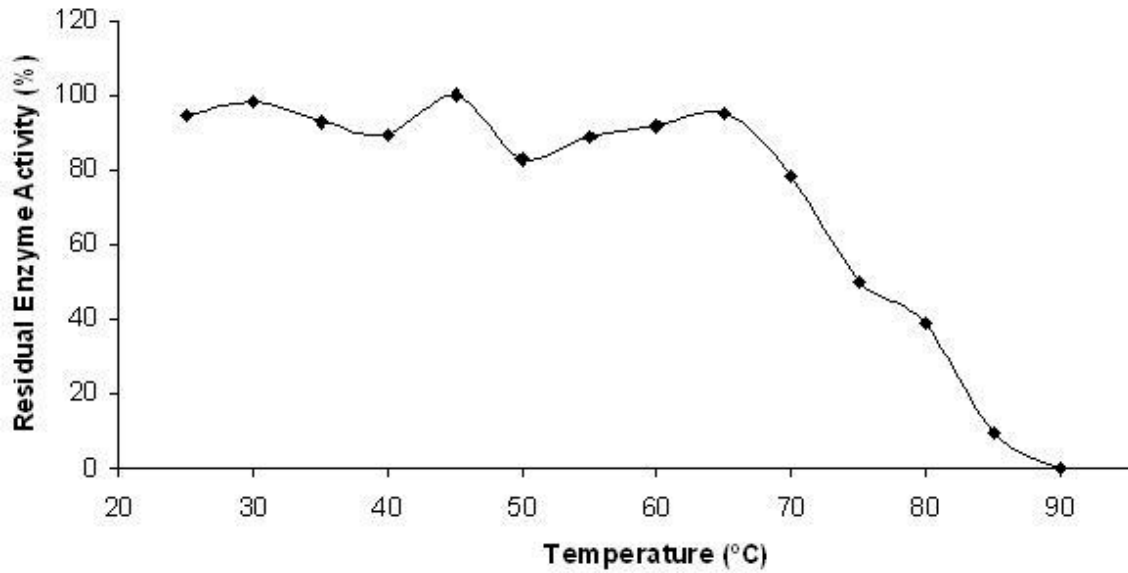
314



315

316 **Fig 6** Activation energy (E_a) of Lysyl oxidase purified from jumbo squid muscle. Activity
 317 at pH 8.2 (16 mM potassium phosphate buffer) was evaluated using 10 mM 1,5-
 318 diaminopentane as substrate and changing temperature from 20 to 65 °C, plotting activity
 319 vs $1/T$ (°K): $E_a = -m(2.3R)$ where m is the slope and R is gas constant (1.987 cal/K.mol).
 320 Units= Activity was expressed as nm of hydrogen peroxide produced in 1 min.

321



322

323 **Fig 7** Temperature stability of Lysyl oxidase purified from jumbo squid muscle. Residual
324 activity at pH 8 after incubation of enzyme extract with 10 mM 1,5-diaminopentane for 60
325 min at temperatures from 25 to 90 °C. 100% of anzyme activity is the activity without
326 incubation.

327

328

329

330

331

332

333

334

335