CENTRO DE JNVESTJGACION ENALIMENTACION Y DESARROLLO, A. C.

CARACTERIZACION PARCIAL DE LA ACTIVIDAD AUTOLITICA DEL MUSCULO DE SARDINA MONTERREY (Sardinops sagax caerulea).

por

MARIA ELENA LUGO SANCHEZ

Tesis aprnbada por la

DIRECCION DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Como Requi.siw PUl'd1il para
Obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS ESPECIALIDAD
EN NUTJUCION Y ALIMENTOS

llcnnosillo, Sonora. Mayo 1993

APROBACION

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de María Elena Lugo Sánchez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, con especialidad en Nutrición y Alimentos dentro del Programa de Maestría en Ciencias, de la Dirección de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Dra. Natalia González Méndez

Dra. Gloria M. Yepiz Plascencia

Hermsoillo, Sonora. Mayo 1993

DECLARACION DEL AUTOR

Se permiten citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para citas y consultas mas amplias o para la reproducción íntegra de este documento con fines académicos, se podrá solicitar permiso al Director del Centro o al Jefe del Departamento de Alimentos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Apartado Postal 1735. Hermosillo, Sonora. México. Bajo cualquier otra circunstancia, deberá solicitar permiso al autor.

Firma

María Elena Lugo Sánchez

CON AMOR Y RESPETO

A la mujer a quien debo la vida y
todo lo que hoy puedo ser, por guiarme
en el mejor camino, por su apoyo, confianza
y gran sabiduría GRACIAS.

MI MADRE

EVA ANGELINA SANCHEZ TORRES

Al hombre que ha sabido comprenderme,
amarme y apoyarme en los últimos años,
y hacerme tan feliz. Con todo mi amor.

MI ESPOSO

FELIX MEDINA VELAZQUEZ

A mis hermanos que doy gracias a dios por
tenerlos: Jesús Guadalupe, Jorge Eudes y Fermin.
Y a la memoria de Alejandrino.

CARIÑOSAMENTE

A las familias: Medina Velázquez, Bojorquez, Lugo Quintero, Muy Rangel, López Sanchez, Sánchez Sánchez, Meza Sánchez.

A mis cuñados (as) y familia: Malía, Conchita, Alfredo, Malena, Jorge Abel y Adrian.

A Luis Alberto, Raymundo y Sofía Elizabeth, Maleni, Jaimito, Fredy, Andres, Tony, Abelito, Luis Fernando y Juan José .

A María Dolores Muy y Juan Pedro Campos, por los momentos que convivimos juntos.

A mis Maestros de Maestría: Mauro Valencia, Luz Vázquez, Ernesto Camou, Ana Ma. Calderón, Marisa Silveira, Juan Pablo Wong, Rosario Román, Inocencio Higuera, Jane Wyat, Ma. Isabel Grijalva.

A mis Maestros de Licenciatura: Manuel Campos, Rojas Villegas, Roberto Avena, Jesús Soto, Lupita Bojórquez, Julio Valdéz, Dolores Cano, Elías,

AGRADECIMIENTO

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por su apoyo para efectuar mis estudios de Posgrado.

Mi reconocimiento muy especial al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), por permitirme llevar a cabo los estudios de Maestría.

Al Dr. Ramón Pacheco Aguilar por haberme ofrecido el tema del trabajo que hoy termino satisfactoriamente, además de haber sido un excelente director de tesis.

A las Dras. Natalia González Méndez y Gloria Yépiz Plascencia, por su valiosa ayuda y orientación en el desarrollo de mi trabajo de tesis por su aopoyo y amistad.

Al Dr. Alfonso Gardea poir su valiosa colaboración.

A mis compañeros de Marinos: Cuquis, Rosa Elena, Diana, Teresa Medrano, Tere Domínguez, Verónica, Laura Terán, Laura Castro, Silvia, Karla, Ana María Guzmán, Juan Carlos, Mazorra, Betty, Jose, Alejandro y Cristina.

A Fali por su gran ayuda y amistad.

A todos mis compañeros de la Maestría.

Y a todas las personas que de una u otro forma colaboraron para la realización de este trabajo.

CONTENIDO

	Página
INDICE DE FIGURAS	xi
INDICE DE CUADROS	xii
RESUMEN	xiv
INTRODUCCION	1
REVISION BIBLIOGRAFICA	3
Composición Química del Músculo de Pescado	3
Clasificación de Proteínas	4
Proteínas Sarcoplásmicas	4
Proteínas Miofibrilares	5
Estroma	6
Propiedades Funcionales Características de las Proteínas	6
Aspectos que Definen la Funcionalidad de las Proteínas	7
Actividad Proteolítica en el Músculo de Pescado	9
Condiciones que Determinan la Actividad Enzimática	11
Estabilidad de una Enzima	11
Efecto del pH	11
Sobre la Actividad Enzimática	11
Sobre la Estabilidad Enzimática	12
Efecto de Temperatura	15
Sobre la Actividad Enzimática	15
Sobre la Estabilidad Enzimática	17
Efecto de Fuerza iónica sobre Actividad y Estabilidad Enzimática	18
Inhibidores y Activadores	19
EDTA	20
Compuestos con Cobre (II)	20
Cisteína	22
Iodoacetamida	23
TLCK (N-α-tosil-L-lisil-clorometil cetona)	24
PMSF (Fenil metil sulfonil fluoruro)	24
Sustratos Sintéticos	25

CONTENIDO (Continuación)

Página

Proteinasas del Musculo 25
Exopeptidasas 27
Aminopeptidasas 28
Carboxipeptidasas 29
Dipeptidasas 30
Dipeptidilpeptidasas 30
Endopeptidasas 32
Proteinasas Serina 32
Proteinasas Tiol 34
Proteinasas Aspartato 35
Metaloproteinasas 36
Carboxipeptidasas 36
Proteinasas en Pescado 37
Catepsinas 38
Catepsina D 38
Catepsina A 39
Catepsina B 40
Proteinasas Alcalinas 41
Proteinasa Neutra 42
Tripsina, Quimotripsina y Carboxipeptidasas 43

MATERIALES Y METODOS 45
Reactivos 45
Obtención del Músculo 46
Extracción de Proteínas Miofibrilares 46
Preparación de Suspensiones para su Uso como Sustrato Enzimático 48
Fluído sarcoplásmico 48
Extracción 48
Determinación de la concentración de Proteínas 49
Estabilidad 49
Actividad Autolítica del Fluído Sarcoplásmico 51
Efecto del pH 51
Efecto de la Temperatura 53
Efecto de la Fuerza Iónica 54
Estabilidad al pH 56
Estabilidad a la Temperatura 57
Estabilidad a la Fuerza Ionica 58

CONTENIDO (Continuación)

Página

Determinación de Actividades Específicas del Fluído Sarcoplásmico..... 59
Colagenasa..... 59
Medición de actividad..... 59
Semejante a Tripsina..... 62
Preparación del Sustrato..... 62
Medición de Actividad..... 62
Semejante a Quimotripsina..... 64
Medición de Actividad..... 64
Carboxipeptidasas A y B..... 65
Coeficiente de Extinción del Acido Hipúrico..... 65
Preparación de Sustratos..... 66
Medición de Actividad..... 67
Catepsina A..... 68
Preparación del Sustrato..... 68
Medición de Actividad..... 69
Catepsina C..... 70
Preparación del Sustrato..... 71
Medición de Actividad..... 71
Catepsina D..... 72
Preparación del Sustrato..... 72
Medición de Actividad..... 72
Catepsina B..... 73
Preparación del Reactivo Mersalil-Brij..... 74
Preparación del Reactivo de Color..... 74
Preparación del Sustrato..... 74
Medición de Actividad..... 74
Estudios de Inhibición y Activación..... 75
Colagenasa..... 76
Semejante a Tripsina..... 77
Semejante a Quimotripsina..... 78
Catepsina A..... 79
Carboxipeptidasas A y B..... 80

CONTENIDO (Continuación)

Página

Catepsina D..... 80
Catepsina C..... 81
Catepsina B..... 82

RESULTADOS Y DISCUSION..... 83

CONCLUSIONES 105

BIBLIOGRAFIA 108

CONTENIDO (Continuación)

Página

Catepsina D..... 80
Catepsina C..... 81
Catepsina B..... 82

RESULTADOS Y DISCUSION..... 83

CONCLUSIONES 105

BIBLIOGRAFIA 108

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de una enzima	14
2	Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de una enzima	16
3	Determinación de nitrógeno no proteico en el fluído sarcoplásmico del músculo de sardina. Datos obtenidos en el extracto de ácido tricloroacético	84
4	Estabilidad de la actividad enzimática en el fluído sarcoplásmico almacenado a 0°C y 4°C por 4 días. Datos obtenidos de la hidrólisis de proteínas miofibrilares a pH 7.5 y 38°C	85
5	Estabilidad de la actividad enzimática en el fluído sarcoplásmico almacenado a 0°C por 4 horas. Datos obtenidos de la hidrólisis de proteínas miofibrilares a pH 7.5 y 65°C	87
6	Efecto de la temperatura sobre la actividad de proteínasas del fluído sarcoplásmico del músculo de sardina. Datos obtenidos de la hidrólisis de proteínas miofibrilares a pH 7.5	89
7	Estabilidad de la actividad enzimática a la temperatura en el fluído sarcoplásmico del músculo de sardina. Datos obtenidos de la hidrólisis de proteínas miofibrilares a pH 7.5 y 65°C	90
8	Efecto del pH sobre la actividad de proteínasas en el fluído sarcoplásmico del músculo de sardina. Datos obtenidos de la hidrólisis de proteínas miofibrilares a 65°C	92
9	Estabilidad de la actividad enzimática al pH en el fluído sarcoplásmico del músculo de sardina. Datos obtenidos de la hidrólisis de proteínas miofibrilares a pH 7.5 y 65°C	93

INDICE DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
10	Efecto de fuerza iónica sobre la actividad de proteinasas en el fluído sarcoplásmico del músculo de sardina. Datos obtenidos de la hidrólisis de proteínas miofibrilares a pH 7.5 y 50°C.....	96
11	Estabilidad de la actividad enzimática a la fuerza iónica en el fluído sarcoplásmico de músculo de sardina. Datos obtenidos de la hidrólisis de proteínas miofibrilares a pH 7.5 y 65°C.....	97

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Porción comestible y composición química del músculo de pescado	4
2	Relación entre propiedades física y funcionales de la proteínas	8
3	Distribución de la actividad proteolítica en Capelin	10
4	Grupos prototrópicos que intervienen en el actividad catalítica de una enzima	13
5	Relación de sustratos sintéticos usados para la caracterización de proteinasas presentes en especies marinas	26
6	Buffers utilizados para determinación del efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de proteinasas presentes en el músculo de sardina Monterrey	52
7	Ejemplo de fuerza iónica de diferentes compuestos	54
8	Molaridades de la soluciones buffers utilizadas para la determinación del efecto de fuerza iónica sobre la actividad y estabilidad de proteinasas presentes en el músculo de sardina	55
9	Adición de los gramos necesarios de KCl para ajustar la fuerza iónica a 0.3 en las pruebas de estabilidad de la actividad autolítica a la fuerza iónica	58
10	Efecto de EDTA, $CuSO_4$, iodoacetamida y cisteína sobre la actividad de diferentes fracciones enzimáticas, detectadas en el fluído sarcoplásmico del músculo de sardina Monterrey	99
11	Efecto de TLCK y PMSF sobre la actividad de diferentes fracciones enzimáticas, detectadas en el fluído sarcoplásmico del músculo de sardina Monterrey	100

RESUMEN

La Sardina es una pesquería abundante en México. Sin embargo, su uso es inadecuado, dedicándose el 75% de su captura a elaborar harina para consumo animal. Las prácticas de captura y su manejo poscaptura, promueven la actividad enzimática endógena reduciendo la funcionalidad del músculo, justificando así su uso comercial actual. Establecer la trascendencia tecnológica de estas enzimas es importante para producir alternativas de uso para el consumo humano directo.

El objetivo del presente estudio fué caracterizar parcialmente la actividad proteolítica del fluído sarcoplásmico del músculo de sardina. Se determinó el efecto y estabilidad de la actividad enzimática al pH (2.5-9.5), temperatura (10-77ºC) y fuerza iónica (I=0.2-0.6), utilizando como sustrato proteínas miofibrilares extraídas del músculo de la misma especie. Se evaluó el efecto de EDTA, $CuSO_4$, cisteína, iodoacetamida, TLCK y PMSF en la activación y/o inhibición enzimática, para determinar la naturaleza de las diferentes funciones enzimáticas en el extracto crudo. La actividad enzimática fué estable en el rango de pH de 5.5 a 7.5; temperatura de 10°C a 60ºC y fuerza iónica de 0.2 a 0.4.

Los resultados sugirieron la presencia de proteinasas ligeramente alcalinas y alcalinas, estables al calor además de una enzima activa a pH ácido. Se detectó actividad: a) semejante a carboxipeptidasa A y B (pH 7.6), activada por $CuSO_4$, TLCK y PMSF; b) semejante a quimotripsina (pH 8.5), inhibida por todos los compuestos excepto PMSF; c) catepsina C (pH 7.0), fuertemente inhibida por TLCK y d) catepsina D (pH 4.0), inhibida por EDTA y activada por $CuSO_4$. No se detectó actividad de catepsinas A y B, colagenasas, ni semejante a tripsina.

b) semejante a quimotripsilrn (pH 8.5), inhibida por 1odos los compuestos excepto PMSF; e) catcpsinil C (pl-1 7,0). fucrte1nente inhibida por TLCK y d) ,:r1tcpsina D (pll 4.0), inhibida por EDTA y act.ivada por Cuso,. No se detectó actividad de catcpsinas A y B, colagenasas, ni semejante a tripsina.

Se requiere de la separnci(m y purificación de las diferentes fracciones e.nz.imát.ic.iis detcct.adas y cst.ablt:ccr su importancia refotiv11 en la degradaciún protéica muscular, bajo las diferentes condiciones de manejo y manufuctura de productos de sardina.

INTRODUCCION

La Sardina conforma el mayor porcentaje de la pesquería en Sonora, aún así, el 75% de su captura se destina a la elaboración de harina de pescado para consumo animal. La rápida degradación de proteínas musculares en especies similares, se atribuye principalmente a la alta actividad de proteinasas propias del músculo (Bonete *et al.*, 1984; Makinodan *et al.*, 1984).

La magnitud de esta actividad enzimática es consecuencia de las malas prácticas de manejo de captura y poscaptura, durante las cuales se pueden presentar condiciones adecuadas de actividad como pH, temperatura y fuerza iónica reduciendo su potencial de uso para productos de consumo humano, justificando así su utilización en la producción de harina.

La información disponible sobre el orígen de esta actividad es controversial. La literatura menciona varias fuentes de proteinasas: del estómago e intestino (Gilberg y Raa, 1985); bacteriales (Liston, 1965) y del músculo (Makinodan *et al.*, 1985). Todas podrían contribuir a la actividad proteolítica total presente en el músculo.

La actividad de proteinasas endógenas del músculo es baja comparada con la de otros tejidos (Aknes, 1988). Se ha reportado que las catepsinas del músculo de carpa no contribuyen significativamente en la autólisis del mismo; por el contrario, la actividad catéptica en el músculo de corvina blanca es alta (Bonete *et al.*, 1984).

Se ha detectado actividad de proteinasas alcalinas sobre proteínas miofibrilares en músculo de especies marinas como, Corvina blanca (Folko *et al.*, 1984; Makinodan *et al.*, 1985), Macarela (Bonnie *et al.*, 1986) y Corvina del atlántico, las cuales son de orígen citoplasmático y estables al calor (Tzong-Lin *et al.*, 1984). Se ha reportado la capacidad de estas enzimas de degradar al complejo actinomiosina "in vitro" , por lo que se establece su participación en la degradación de la miosina al aplicar algún proceso térmico (Iwata *et al.*, 1974; Makinodan-Ikeda, 1977).

La presencia de estos dos tipos de proteinasas, catepsinas y alcalinas, contribuyen en la degradación de proteínas miofibrilares del músculo, reduciendo así la funcionalidad del mismo para ser utilizado como materia prima para la elaboración de productos manufacturados.

Por todo ésto el objetivo de este trabajo fué caracterizar parcialmente la actividad enzimática del fluído sarcoplásmico del músculo de Sardina mediante: a) la determinación del efecto del pH, temperatura y fuerza iónica sobre la actividad y estabilidad de las proteinasas presentes y b) el uso de sustratos e inhibidores sintéticos.

REVISION BIBLIOGRAFICA

Composición química del músculo de pescado

La composición química del músculo de los peces es más variable que la de los animales terrestres. En general, los principales constituyentes son: agua que conforma del 66 a 84%; proteínas del 15 al 25%; lípidos del 0.1 a 22% y sustancias minerales del 0.2 al 2%, (Kilborne y McLeod, 1920; Susuki, 1981). El cuadro 1 muestra la composición química del músculo de varios peces, donde se puede observar la variabilidad mencionada anteriormente que a la vez sirve como factor de distinción entre las diferentes categorías de especies.

Tanto la porción comestible de las especies como la composición química del músculo de las mismas se ven afectados por numerosos factores, que pueden ser de naturaleza intrínseca tales como diferencia entre especies, variación individual, región anatómica, fisiología y sexo o extrínsecas, como cambios estacionales. La porción comestible abarca del 45 al 50% del peso total del pescado (Susuki, 1981).

De la composición del músculo de pescado, nuestro primordial interés se centra en su contenido de proteínas, principalmente miofibrilares, dada la implicación en el uso del músculo como materia prima en la elaboración de alimentos manufacturados.

Cuadro 1. Porción comestible y composición química del músculo de pescado.

Especie	Porción comestible	Humedad (%)	Grasa (%)	Proteínas (%)
Anchoveta (*Engraulis japonica*)	60%	74.4	6.0	17.5
Arenque (*Etrumeus micropus*)	65%	71.9	4.6	21.3
Macarela (*Auxis thazard*)	55%	62.5	16.5	19.8
Carpa (*Cyprinus carpio*)	40%	75.4	6.0	18.0

Fuente: Susuki, 1981.

Clasificación de Proteínas

Las proteínas del músculo están constituidas por tres fracciones: 1) Proteínas sarcoplásmicas, localizadas en el plasma; 2) Proteínas miofibrilares, las cuales forman las miofibrillas y 3) Proteínas del tejido conectivo o estroma (Raymond, 1961; Susuki, 1981; Hashimoto *et al.*, 1979).

Proteínas Sarcoplásmicas

Estas contienen muchas clases de proteínas solubles en agua denominadas miógeno. Generalmente se encuentran en el citoplasma de las células del músculo y

consisten en enzimas y pigmentos principalmente (Susuki, 1981). Estas proteínas son obtenidas por una simple presión a la carne del pescado o por extracción con soluciones salinas de baja fuerza iónica. El contenido de proteínas sarcoplásmicas en el pescado varía con la especie, siendo más alta en especies pelágicas como sardina y macarela, las cuales contienen una mayor proporción de músculo oscuro (Shimizu *et al.*, 1976; Susuki, 1976; Hashimoto *et al.*, 1979).

Proteínas Miofibrilares

Son las proteínas que forman las miofibrillas y estan constituídas principalmente por las proteínas contráctiles, miosina y actina; y por las proteínas reguladoras, tropomiosina, troponina y actinina. Las proteínas miofibrilares abarcan del 66 al 77% de la proteína total del músculo de pescado (Susuki, 1981). La miosina comprende el 40%de las proteínas totales del músculo, mientras que la actina del 15 al 20% (Le Coeur y Lescoat, 1986).

Estas proteínas pueden ser extraídas con soluciones salinas de alta fuerza iónica (Hashimoto *et al.*, 1979) y juegan un papel importante en los procesos de coagulación y formación de geles cuando el pescado es procesado térmicamente.

Estroma

Son las proteínas que conforman el tejido conectivo. No pueden ser extraídas con agua, soluciones ácidas o alcalinas (Hashimoto et al., 1979), ni por soluciones de sales neutras en concentraciones de 0.01-0.1 M (Sisuki, 1981). Los principales componentes del estroma son colágeno y elastina, siendo proteínas que se encuentran fuera de las células del músculo. Las especies de pescado de músculo oscuro contienen una mayor proporción de estroma que las de músculo blanco (Susuki, 1981).

Propiedades Funcionales Características de las Proteínas

Las proteínas en el músculo de pescado tienen funciones similares a las de los tejidos de los mamíferos, sin embargo, las del pescado son menos estables. La extrema labilidad de la miosina del músculo de pescado es una característica inherente de la misma (Anglemier y Montgomery, 1976).

Las principales propiedades funcionales de las proteínas desde el punto de vista tecnológico en los alimentos son tres (Le Coeur y Lescoat, 1986): 1) Capacidad emulsificante, que en términos generales es la habilidad de las proteínas para ligar a su estructura las grasas; 2) Capacidad gelificante, que es la habilidad de las proteínas para formar un gel tridimensional por la acción del calor y 3) Capacidad de retención de agua, que es la disposión protéica para retener el agua libre en los tejidos.

Estas propiedades de las proteínas contribuyen en definitiva a las características organolépticas de los productos alimentarios donde se puedan apreciar los atributos de

sabor y textura (Bourgeois, 1986). La consideración de las propiedades funcionales originales de las proteínas, es un requerimiento para la utilización de las mismas en la elaboración de productos manufacturados, donde la textura sea el parámetro específico principal dentro de los atributos organolépticos. Las proteínas son valoradas en base a sus propiedades funcionales.

Aspectos que Definen la Funcionalidad de las Proteínas. La estructura espacial de la proteínas depende de su estructura primaria y su ambiente. Todo cambio en estos dos factores ocasiona un efecto en sus propiedades funcionales (Lorient, 1986). Uno de los principales objetivos de los tratamientos tecnológicos es modificar la estructura tridimensional de las proteínas, resaltando así sus propiedades funcionales (gelificación, emulsificación, texturización, etc.), para que proporcionen al alimento la textura y aspecto deseados.

Las propiedades funcionales de las proteínas se clasifican según la naturaleza de las interacciones intermoleculares (Cuadro 2), pero con frecuencia varios tipos de interacciones ocurren simultáneamente.

Se han utilizado varios productos proteínicos para alimentación (Hynd, 1970; Delaney, 1976; Kinsella, 1979; Smith y Brekke, 1984). La evaluación de sus propiedades funcionales es necesaria para ayudar a los procesadores de alimentos a seleccionar la proteína con mejores características para su aplicación o para definir cómo la proteína o derivados de ésta pueden remplazar a otras proteínas en la formulación de nuevos

Cuadro 2. Relación entre propiedades físicas y funcionales.

Propiedades estructurales	Factores que influyen en el tipo de reacción	Propiedades funcionales
Grupos hidrófilos Hidratación Fijación de iones	Atracción de agua y solutos hacia las proteínas	Emulsificación, dispersibilidad, disociación, capacidad de retención de agua, humectabilidad, ensanchamiento Precipitación, coagulación, etc.
Grupos hidrófilos e hidrófobos Conformidad helicoidal	Repulsión de agua por grupos hidrófobos o no ionizados (Carácter anfótero) Fenómeno inverso por los grupos hidrófilos	Emulsificación, fijación de sustancias hidrofóbicas no polares (grasas) floculación por solventes no polares (desnaturalización), retención de aromas no polares de pigmentos, fijación de aire (espumado)
Interacciones intermoleculares no covalentes *Conformación helicoidal, tridimensional*	Reacción entre grupos polares y no polares. Acción del frío → insolubilización (interacciones hidrógeno) Reacciones aceleradas por el calor (interacciones entre grupos hidrofóbicos)	Formación de películas, incremento en la viscosidad, formación de turbidez, gelificación Formación de fibras, geles, elasticidad, textura, desnaturalización
Interacciones covalentes *Conformación tridimensional y polimérica*	Formación de puentes S-S Interacciones isopeptídicas, lisinoalanina Hidrólisis de enlaces peptídicos Fijación de péptidos y aminoácidos	Floculacíon, coagulación Disminución en la solubilidad, incremento en la viscosidad, elasticidad Disminución en la solubilidad y en la viscosidad Formación de plasteínas con disminución en la solubilidad.

Fuente: Lorient, (1986).

alimentos. Lo anterior conlleva a mantener la funcionalidad proteica y las características del alimento. Es importante tomar en consideración la intervención de enzimas endógenas del músculo de pescado en la hidrólisis de proteínas. Estas enzimas provocan una disminución drástica de las propiedades funcionales de las proteínas del músculo, reduciendo su aplicación como materia prima en la elaboración de productos manufacturados.

Actividad Proteolítica en el Músculo de Pescado

Usualmente un pescado es almacenado antes de ser procesado, mientras tanto, pueden ocurrir cambios bioquímicos importantes como la autólisis del músculo, causando principalmente la solubilización de las proteínas del mismo.

La actividad enzimática presente puede tener varios orígenes como se muestra en el cuadro 3; proveniente de enzimas proteolíticas del tracto digestivo como tripsina, que representan el 70% del total de la actividad proteolítica del tracto digestivo; de orígen microbiano que contribuyen cerca del 30% en la solubilización protéica total y enzimas endógenas del músculo. Estas últimas son en menor cantidad, pero significativamente importantes en la autólisis total (Aknes, 1988).

El músculo contiene alta actividad de enzimas ácidas, que utilizan a las proteínas del mismo como sustrato, formando productos de bajo peso molecular y repercutiendo en la disminución de sus propiedades funcionales (Siebert, 1962).

Cuadro 3. Distribución de la actividad proteolítica en Capelin.

Tejido	Peso (% del total del cuerpo)	Proteína (% de proteína total	Actividad proteolítica (% absoluto del total de actividad)
Músculo	70.0±1.1	81.7	18.8±6.6
Cabeza	9.3±0.5	9.3	2.8±0.7
Estómago	2.9±0.8	2.8	12.0±4.5
Intestinos	2.1±0.2	1.8	60.3±19.0
Hígado	1.6±0.2	1.7	2.0±1.1
Riñón	0.9±0.1	0.8	1.5±0.3
Gónadas	1.41±0.2	1.8	3.4±1.4
Grasa abdominal	11.8±1.2	-	-

Fuente: Aknes, 1988.

La actividad autolítica presente en el músculo de pescado no es el resultado de la actividad de una sola enzima, sino la manifestación conjunta de un grupo de proteinasas, que pueden comportarse tanto en el rango ácido como en el alcalino (Lanier *et al.*, 1981; Makinodan *et al.*, 1985).

Existe la controversia de que la actividad de proteinasas presentes en el músculo de ciertas especies como carpa, no contribuyen significativamente en los procesos autolíticos del músculo (Toyohara *et al.*, 1982).

Condiciones que Determinan la Actividad Enzimática

Estabilidad de una enzima

Las enzimas son moléculas de proteínas complejas (Whitaker, 1972). Su actividad catalítica resulta de una precisa y altamente ordenada estructura terciaria, que contiene yuxtapuestos cadenas laterales de aminoácidos que conforman el sitio activo de la misma, el cual posee una estereoespecificidad para enlazar al sustrato.

La estructura terciaria de una enzima es mantenida primordialmente por un gran número de enlaces no covalentes (Whitaker, 1972; Segel, 1976). En términos generales y prácticos, una enzima es una molécula muy delicada y frágil. Cualquier factor que influye en la integridad de su estructura puede afectar la actividad de la enzima (Whitaker, 1972).

La estabilidad de una enzima es función de la temperatura, el pH, la fuerza iónica, la naturaleza del buffer, la presencia o ausencia de sustrato, inhibidores y activadores en el medio (Whitaker, 1972).

Efecto del pH

Sobre la Actividad Enzimática. El control del pH relacionado con la actividad enzimática y es de gran importancia para el científico y tecnólogo en alimentos. En un proceso industrial donde se desea tener una actividad enzimática, se puede controlar el

pH para mantener al máximo dicha actividad. Sin embargo, el interés en la mayoría de los casos es para prevenir o inhibir una reacción enzimática. El efecto del pH sobre la actividad catalítica de una enzima significa que éste afecta la ionización de grupos prototrópicos (grupos ionizables) del sitio activo de la misma (Whitaker, 1972).

Los sustratos pueden contener también grupos ionizables y solamente una de las formas iónicas del sustrato puede enlazarse a la enzima en la reacción (Segel, 1976). Los grupos prototrópicos en el sito activo de la enzima pueden tener diferentes funciones: a) mantener la conformación del sitio activo, b) enlazar el sustrato a la enzima o c) transformar el sustrato a producto. Estos grupos se localizan en las cadenas de residuos de aminoácidos ácidos o básicos (Whitaker, 1972; Segel, 1976). La naturaleza de los grupos prototrópicos pueden ser los que se indican en la Cuadro 4.

Dependiendo de la enzima, el efecto del pH sobre la actividad puede manifestarse como se indica en la Figura 1 (Curva A). A pHs extremos, la actividad usualmente decrece irreversiblemente, debido a que se produce una desnaturalización proteica. Sin embargo, se puede tener un rango de pH donde se manifieste una actividad reversible, en el cual aparentemente se presenta una ionización de los grupos funcionales del sitio activo o de áreas de control en la conformación de la misma enzima (Richardson, 1976).

Sobre la Estabilidad enzimática. Los efectos del pH sobre la estabilidad de una enzima, como se muestra en la Figura 1 (Curva B), es un aspecto esencial para la

Cuadro 4. Grupos prototrópicos que intervienen en la actividad catalítica de una enzima.

Grupo	Ionización	pK
Carboxilo	$-COOH \leftrightarrow -COO^- + H^+$	α, 3.0-3.2β, τ, 3.0-4.7
Imidazol		5.6-7.0
Sulfihidrilo	$-SH \leftrightarrow -S^- + H^+$	8.0-8.5
Amonio	$-NH_3^+ \leftrightarrow -NH_2 + H^+$	α, 7.6-8.4 ϵ, 9.4-10.6
Hidroxil fenol		9.8-10.4
Guanídico		11.6-12.6

Los α están localizados al final de la cadena
Fuente: Whitaker, 1972.

caracterización de una enzima. Desafortunadamente con frecuencia se omite este tipo de información y solo se determinan curvas de efecto de pH sobre la actividad enzimática.

Una curva de estabilidad al pH, puede ser obtenida por la preincubación de la enzima a diferentes pHs, por un tiempo de reacción determinado (Segel, 1976). Posteriormente, la actividad de la enzima es medida a un pH óptimo.

La estabilidad de una enzima al pH depende de varios factores, en los que se incluyen: temperatura, fuerza iónica, naturaleza química del buffer, concentración de inhibidores o activadores, etc. El pH óptimo de una enzima puede ser el resultado de: 1) una reacción reversible del efecto de pH sobre la velocidad máxima de reacción, 2) el efecto del pH sobre la afinidad de la enzima por el sustrato y 3) el efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima (Richardson, 1976).

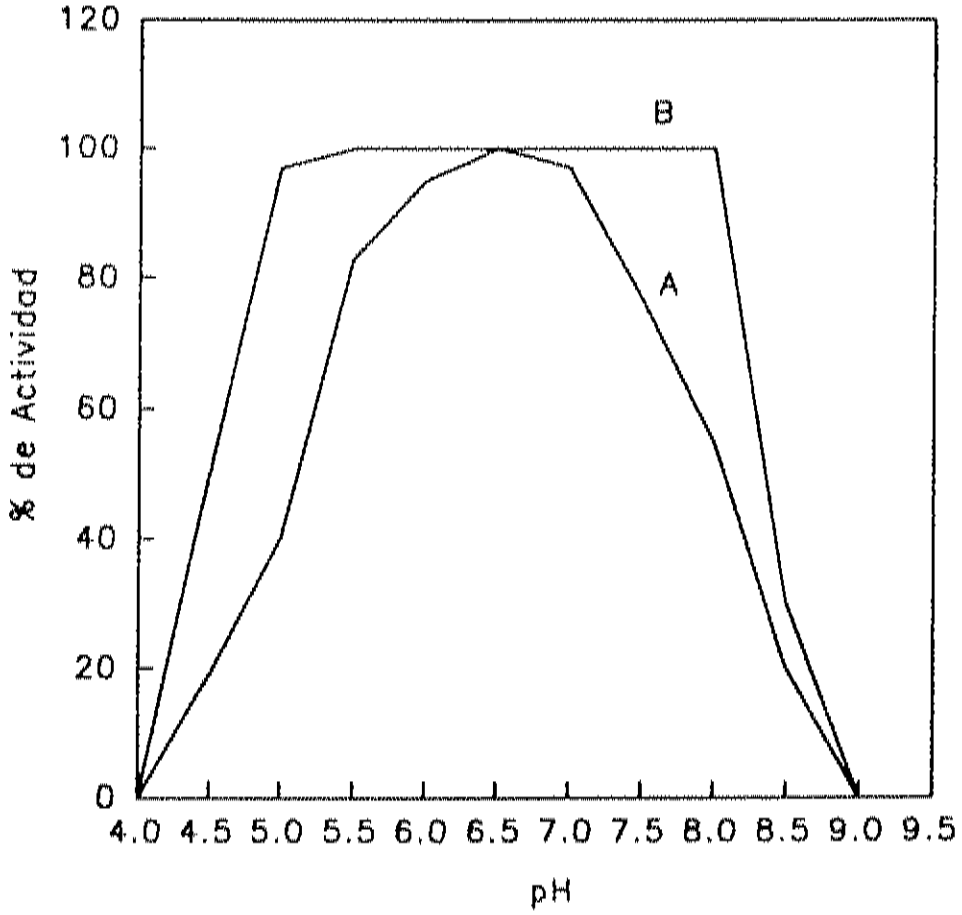

Fig. 1. Efecto de pH sobre la actividad y estabilidad de una enzima. Curva A: Actividad a diferentes valores de pH. Curva B: Actividad a pH 6.8 después de preincubada la enzima a los diferentes pHs indicados. (Fuente: Segel, 1976).

Efecto de la Temperatura

Sobre la Actividad enzimática. La temperatura es un factor importante en el control de la actividad enzimática. Las bajas temperaturas generalmente inhiben a las enzimas mientras que las altas, provocan su desnaturalización y por lo tanto su destrucción.

Los efectos de la temperatura son muy complejos y pueden resultar de la suma de varias causas (Richarson, 1976). Las altas temperaturas pueden afectar la velocidad de rompimiento del complejo enzima sustrato; los pK de ionización de los grupos funcionales que intervienen en la reacción; la afinidad de la enzima por activadores o inhibidores, etc. La inactivación enzimática por calor debe tomarse en cuenta en el procesamiento térmico de los alimentos.

Se deben considerar dos factores principales cuando la temperatura del ambiente o del proceso incrementa: 1) el incremento en la velocidad de las reacciones enzimáticas y 2) el incremento en la velocidad de destrucción de la enzima (Richardson, 1976).

Cuando se incrementa la temperatura, la velocidad de destrucción enzimática puede ser tan rápida como la velocidad a la que ésta pueda actuar. El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se muestra en la Figura 2 (Curva A).

En general, las funciones de una enzima disminuyen a temperaturas de congelación y su actividad aumenta cuando la temperatura incrementa hasta los 45°C (Whitaker, 1972; Richarson, 1976). La mayoría de las enzimas muestran su actividad óptima en el rango de 30-40°C y se desnaturalizan cerca de los 45°C. Sin embargo, hay enzimas termoestables capaces de resistir la inactivación a temperaturas mucho más altas

Efecto de la Temperatura

Sobre la Actividad enzimática. La temperatura es un factor importante en el control de la actividad enzimática. Las bajas temperaturas generalmente inhiben a las enzimas mientras que las altas, provocan su desnaturalización y por lo tanto su destrucción.

Los efectos de la temperatura son muy complejos y pueden resultar de la suma de varias causas (Richarson, 1976). Las altas temperaturas pueden afectar la velocidad de rompimiento del complejo enzima sustrato; los pK de ionización de los grupos funcionales que intervienen en la reacción; la afinidad de la enzima por activadores o inhibidores, etc. La inactivación enzimática por calor debe tomarse en cuenta en el procesamiento térmico de los alimentos.

Se deben considerar dos factores principales cuando la temperatura del ambiente o del proceso incrementa: 1) el incremento en la velocidad de las reacciones enzimáticas y 2) el incremento en la velocidad de destrucción de la enzima (Richardson, 1976).

Cuando se incrementa la temperatura, la velocidad de destrucción enzimática puede ser tan rápida como la velocidad a la que ésta pueda actuar. El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se muestra en la Figura 2 (Curva A).

En general, las funciones de una enzima disminuyen a temperaturas de congelación y su actividad aumenta cuando la temperatura incrementa hasta los 45°C (Whitaker, 1972; Richarson, 1976). La mayoría de las enzimas muestran su actividad óptima en el rango de 30-40°C y se desnaturalizan cerca de los 45°C. Sin embargo, hay enzimas termoestables capaces de resistir la inactivación a temperaturas mucho más altas

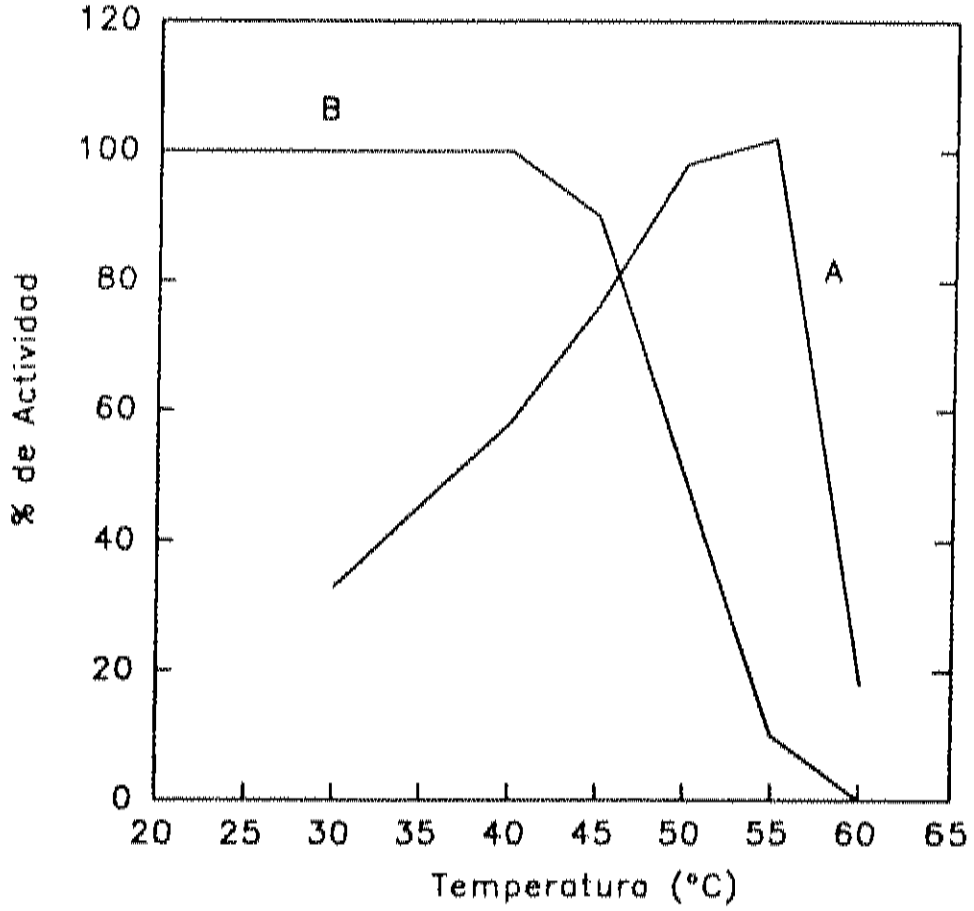

Fig. 2. Efecto de temperatura sobre la actividad y estabilidad de una enzima. Curva A: 10 minutos de reacción a cada temperatura. Curva B: Exposición de la enzima por 10 minutos a las temperaturas indicadas, seguido de su determinación de actividad residual. (Fuente: Richardson, 1976).

de 45°C. Algunas enzimas son desnaturalizadas a temperaturas cercanas a la congelación, no obstante, la mayoría permanece activa después de la descongelación (Whitaker, 1972).

Sobre la Estabilidad Enzimática. La integridad estructural nativa de una enzima se modifica por cambios en la temperatura del medio de reacción. Algunos de los cambios inducidos son reversibles, mientras que otros pueden serlo parcialmente (Whitaker, 1972; Richarson, 1976). La estabilidad de la acción enzimática dependerá de dichos cambios y de la capacidad enzimática para recobrar su conformación original al colocarse en condiciones óptimas de acción.

En general, las enzimas son más estables a bajas temperaturas. Hay pocas enzimas que son más inestables entre 0-10°C que en el rango de 20-30°C. Además, son más estables en un tejido intacto u homogenado donde su estructura esta protegida por la presencia de un material coloidal, que en su forma purificada (Whitaker, 1972).

El efecto de la temperatura sobre la estabilidad (Figura 2, Curva B) de una enzima puede ser determinado rápidamente (Whitaker, 1972; Fennema, 1976) y es de gran utilidad en

un producto alimentario, ya que facilita el establecimiento de las condiciones óptimas de manejo, prolongando su vida útil. Para determinarse, soluciones de enzima son incubadas a varias temperaturas en la ausencia de un sustrato, mientras se mantienen otras condiciones constantes como pH, furza iónica, etc. Se toman alícuotas de la

preincubación a intervalos de tiempo establecidos y se determina la actividad con la aplicación de un sustrato, a la temperatura óptima previamente determinada (Whitaker, 1972).

La temperatura óptima en un análisis es aquella en que la enzima exhibe una actividad constante por un tiempo de análisis determinado (Whitaker, 1972; Segel, 1976).

Efecto de Fuerza Iónica sobre la Actividad y Estabilidad Enzimática

Algunas enzimas requieren cierta fuerza iónica para su actividad. Los requerimentos en cuanto a la concentración y tipos de iones presentes en solución varían entre las enzimas (Richardson, 1976). Las condiciones específicas de fuerza iónica pueden promover la actividad de ciertas enzimas y resultar en la inhibición parcial o total de otras (Fennema, 1976).

Los iones pueden activar enzimas por medio de varios mecanismos: 1) siendo parte integral del sitio activo; 2) formando un enlace entre la enzima y el sustrato; 3) cambiando la constante de equilibrio de la reacción enzimática; 4) cambiando la carga de la superficie de la proteína; 5) removiendo un inhibidor de la reacción y 6) desplazando un metal no efectivo del sitio activo o del sustrato (Richarson, 1976). Sin embargo, las sales también pueden inactivar a la enzima bajo los mismos procedimientos.

En algunos procesos de elaboración de productos marinos se utilizan salmueras, mismas que pueden provocar la inhibición parcial o total de las enzimas presentes en

dichos alimentos. El conocer la estabilidad de las enzimas a cambios de fuerza iónica es importante para establecer condiciones óptimas de formulación de alimentos.

Inhibidores y Activadores

El estudio con inhibidores y activadores enzimáticos es una poderosa herramienta para determinar la naturaleza de sitio activo de una enzima, principalmente su componente de unión (Whitaker, 1972). El uso de inhibidores puede proveer información acerca de los grupos funcionales que constituyen el sitio activo de la enzima.

Cualquier sustancia que reduzca la velocidad de una reacción catalizada por una enzima, sea cual sea su mecanismo, es un inhibidor. El inhibidor puede reaccionar directamente con los grupos esenciales del sitio activo de la enzima o con grupos de la enzima que aunque no se encuentren en el sitio activo son importantes para mantener la conformación del mismo o toda la integridad molecular de la enzima (Whitaker, 1972).

En la mayoría de los estudios de inhibición o activación realizados en el pescado, sean en vísceras o músculo, los compuestos mas utilizados son EDTA (etilenediaminotetracetato de sodio), compuestos con cobre (Cu^{+2}), cisteína, iodoacetamida, TLCK (N-α-tosil-L-lisil-clorometil cetona), PMSF (Fenil-metil-sufonil fluoruro), DTT (Ditiotreitol), leupeptina, pepstatina, etc. (Makinodan *et al.*, 1979; Hara *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1989; Jiang *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 1992).

EDTA. Este compuesto forma complejos fuertes con cationes divalentes y de estados mayores de oxidación como el Fe^{++}, Zn^{++}, Co^{++}, Cu^{++}, Fe^{+3}, Mg^{++}, Mn^{++} y Mo^{+6}. Para que el EDTA actúe como inhibidor dependerá de la estabilidad del complejo formado entre el ion metal y el EDTA, éste complejo deberá ser mas fuerte que el formado por del ión metal y la enzima.

Para evaluar el efecto de EDTA se debe tomar en consideración el pH del medio de reacción, ya que es más fácil romper los complejos de Ca^{++} en una enzima a pH de 4 y 11 que de Fe^{+++} y Mg^{++} a pH 4 (Fischer y Stein, 1960).

Se han reportado diferentes proteinasas del músculo de pescado que son afectadas por EDTA; por ejemplo, la activación de Catepsina B en el músculo de carpa (*Cyprinus carpio*), (Hara *et al.*, 1988); la inhibición parcial de Catepsina D en músculo de Tilapia (Jiang *et al.*, 1991); una fuerte inhibición de una proteinasa neutra en músculo de carpa (Makinodan *et al.*, 1979) y catepsina D en camarón (Jiang *et al.*, 1992).

Compuestos con Cobre (Cu^{+2}). En las reacciones con grupos tiol los compuestos de cobre participan en la formación de mercáptidos entre el metal y los grupos sulfihidrilos (Whitaker, 1972). Dependiendo del estado de oxidación del complejo mercáptido y de la concentración de los grupos sulfihidrilos pueden darse las siguientes reacciones:

$$R\text{-}SH + X^{+} \dashrightarrow R\text{-}S\text{-}X + H^{+}$$

$$2R\text{-}SH + X^{+2} \dashrightarrow R\text{-}S\text{-}X\text{-}S\text{-}R + 2H^{+}$$

$$R\text{-}(SH)_2 + X^{+2} \dashrightarrow R \begin{matrix} S \\ \\ S \end{matrix} X + 2H^{+}$$

Donde X representa al ion cobre.

Las reacciones de grupos sulfihidrilos con compuestos que forman mercáptidos son fácilmente reversibles. El cobre como metal pesado participa también en la inhibición de enzimas. En este mecanismo, el cobre aún a bajas concentraciones, puede reaccionar rápidamente con los grupos sulfihidrilos; su capacidad de reaccionar con otros grupos como imidazol, carboxilo y grupos peptídicos, requiere de concentraciones mayores (Whitaker, 1972). La formación de mercáptidos puede ser fácilmente reversible adicionando cisteína al medio de reacción.

En pescado, particularmente en vísceras de chano (*Chanos chanos*), se ha detectado una inhibición ligera por cobre de la proteinasa semejante a quimotripsina (Chen *et al.*, 1989). La concentración de la solución de $CuSO_4$ aplicada al medio de reacción, afecta la proporción de inhibición o activación.

Por ejemplo, una solución a una concentración de 0.1 mM de $CuSO_4$, afectó ligeramente la actividad de esta enzima, mientras una concentración de 0.5 mM inhibió

fuertemente a la proteinasa semejante a tripsina en músculo de la misma especie (Jiang *et al.*, 1990) y a catepsina B en músculo de carpa (*Cyprinus carpio*) (Hara, *et al.*, 1988); mientras la misma concentración activó la de Catepsina D en camarón (Jiang *et al.*, 1992). El cobre no presentó efecto sobre la captesina D en músculo de tilapia (Jiang *et al.*, 1991).

Cisteína. Forma parte de las reacciones donde participan los grupos sulfihidrilos. Se usa comúnmente para hacer reversibles las reacciones de los grupos sulfihidrilos con compuestos que forman mercáptidos. Este compuesto es más utilizado en la determinación de la actividad de una enzima que tiene un grupo sulfihidrilo en su sitio activo, pero no en la determinación de la localización del sitio activo por métodos de hidrólisis de proteínas (Whitaker, 1972).

Se ha reportado que la cisteína inhibe fuertemente a las proteinasas semejantes a carboxipeptidasa A y semajante a tripsina en vísceras de chano (Chen *et al.*, 1989) y la actividad semejante a Catepsina A en músculo de la misma especie (Jiang *et al.*, 1990). La cisteína activó a catepsina B en músculo de carpa (Hara *et al.*, 1988) y músculo de Macarela (Matsumiya *et al.*, 1989) y no afectó a la catepsina D en músculo de tilapia (Doke, 1980).

Iodoacetamida. Este compuesto actúa en la oxidación de grupos sulfidrilos. La parte activa de la molécula es su átomo de iodo y la reacción general puede escribirse:

$$2\ R\text{-}SH + X \text{-------}> \quad R\text{-}S\text{-}S\text{-}R + XH_2$$

$$HS\text{-}R\text{-}SH + X \text{-------}> R \begin{matrix} S \\ S \end{matrix} + XH_2$$

Donde X representa al ion iodo.

Mientras el iodo reacciona con los grupos sulfidrilos, también puede reaccionar con otros grupos como tirosina. Sin embargo, existen compuestos más reactivos que tienen en su estructura enlaces disulfuro como el glutanion oxidado (Whitaker, 1972).

Se ha reportado inhibición por iodoacetamida de carboxipeptidasa A en ostión (Tsao y Nagayama, 1991) y de las proteinasas semejantes a carboxipeptidasa A y tripsina, en vísceras de chanos (Chen *et al.*, 1989). Esta última enzima también se inhibió en músculo de chano (Jiang *et al.*, 1990). En camarón se observó un ligero efecto sobre catepsina D (Jiang *et al.*, 1992).

TLCK (N-α-tosil-L-lisil-clorometil cetona). Este compuesto es considerado un inhibidor específico de proteinasas serinas; contiene características estructurales en su sitio de hidrólisis que son similares al sustrato, haciendo que la enzima lo confunda como su sustrato y se enlace al sitio activo de la misma.

El enlace del TLCK al sitio activo de la enzima puede ser al reaccionar con grupos específicos como los hidroxilos del residuo Ser-195 o el imidazol del residuo His-57, formando un derivado irreversible (Schoellman-Shaw, 1962; Singer, 1967). Es considerado inhibidor específico para proteinasas "serinas" como tripsina y quimotripsina (Erickson *et al.*, 1983). La reacción formada por el compuesto es irreversible e inactiva completamente a la enzima. El enlace C-N formado es estable a la hidrólisis, pudiendo aislarse el derivado. El inhibidor tiene características similares al sustrato, por lo que se considera un inhibidor competitivo.

En productos marinos se han reportado diferentes efectos de este compuesto sobre las proteinasas presentes. Una fuerte inhibición de proteinasas semejantes a carboxipeptidasa A y tripsina en ostión (Tsao y Nagayama, 1991), de esta última enzima también en vísceras y músculo de chano (Chen *et al.*, 1989; Jiang *et al.*, 1990), de catepsina B en músculo de carpa (Hara *et al.*, 1988) y macarela (Matsumiya *et al.*, 1989).

PMSF (Fenil-metil-sufonil fluoruro). En general, este compuesto es usado para identificar proteinasas "serinas" y proteinasas que actúan en un rango de pH alcalino pero

ha sido utilizado también para otras proteinasas. Se ha reportado una inhibición ligera de catepsina D en camarón (Jiang *et al.*, 1992), y una fuerte inhibición de la actividad semejante a Quimotripsina en fluído sarcoplásmico de bacalao (Erickson *et al.*, 1983).

Sustratos Sintéticos

Las determinaciones de las actividades específicas de las proteinasas sirven para su caracterización parcial debido a que se fundamentan en el estudio de su actividad sobre un sustrato específico bajo condiciones óptimas de pH, temperatura, fuerza iónica y concentración de sustrato. El uso de los sustratos sintéticos es necesario para estudios designados a elucidar el mecanismo de acción de las enzimas.

La mayoría de los sustratos sintéticos para enzimas proteolíticas contienen enlaces tipo ester, amida o peptídicos que pueden medirse por espectrofotometría (Whitaker, 1972). Actualmente el uso de los sustratos sintéticos facilita la identificación de proteinasas presentes en pescado, ya sea en vísceras o músculo como se muestra en el cuadro 5.

Proteinasas del Músculo

Las enzimas con capacidad para hidrolizar enlaces peptídicos son llamadas proteinasas. Aunque la acción de su actividad en el músculo es baja, juegan un papel

Cuadro 5. Relación de sustratos sintéticos usados para la caracterización de proteinasas presentes en especies marinas.

Sustrato	Enzima	Referencia
Carbobenzoxi-L-glutamil-L-fenilalanina	Catepsina A	Makinodan *et al.*, 1979
Gligil-L-tirosinamida	Catepsina C	Makinodan *et al.*, 1979
α-N-benzoil-DL-arginina ß-naftilamida	Catepsina B	Makinodan *et al.*, 1979; Erickson *et al.*, 1983
N-benzoil-L-tirosina etil ester (BTEE)	Quimotripsina	Fang-Chiou, 1989 Tsao-Nagayama, 1991
Benzoil-L-arginina metil ester (BAME)	Tripsina	Fang-Chiou, 1989
p-Toluensulfonil-L-arginina metil ester (TAME)	Tripsina	Rick, 1965; Walsh, 1970; Tsao-Nagayama, 1991
Hipuril-L-arginina (HA)	Carboxipeptidasa B	Tsao-Nagayama, 1991 Erickson *et al.*, 1983
Hipuril-L-fenilalanina (HPLA)	Carboxipeptidasa A	Erickson *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 1988.
Benzoil-L-arginina etil ester (BAEE)	Tripsina	Chen *et al.*, 1988
N-acetil-L-tirosina etil ester (ATTE)	Quimotripsina	Chen *et al.*, 1988
Carbobenzoxiglicil-L-fenilalanina (CGP)	Carboxipeptidasa A	Chen *et al.*, 1988
α-N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPA)	Semejante a Tripsina	Erickson *et al.*, 1983
Glutaril-L-fenilalanina-p-nitroanilida (GNPA)	Semejante a Quimotrisina	Erickson *et al.*, 1983
L-leucil-ß-naftilamida HCl	Catepsina C	Goldbarg y Rutenberg, 1958; Erickson *et al.*, 1983

importante en la degradación proteica durante los procesos bioquímicos postmortem, contribuyendo a la pérdida de textura del mismo.

La acción de las proteinasas sobre la hidrólisis protéica puede llevarse a cabo de diferentes formas: 1) rompiendo enlaces peptídicos; 2) rompiendo enlaces amida y 3) transpeptidación y reacciones que envuelven el rompimiento de un un enlace C-N, (Mihalyi, 1972; Kullmann, 1985).

Las proteinasas del músculo se clasifican en dos tipos: a) dependiendo de sus requerimientos de pH y b) por sus requerimientos de sustrato. Las primeras, muestran su máxima actividad en diferentes rangos de pH, pudiendo ser clasificadas en proteinasas ácidas, las cuales actúan en rangos de pHs de 2 a 6; proteinasas neutras, con rangos de actividad a pHs de 6 a 7.5 y proteinasas alcalinas, que actúan a pHs de 7 hasta 8.5 (Asghar y Bhatti, 1987).

Las segundas inicialmente se clasificaron en proteasas y peptidasas, sin embargo, con el tiempo y el uso de nuevos sustratos sintéticos para el estudio de enzimas proteolíticas, se estableció la clasificación de las proteinasas en dos principales grupos: 1) exopeptidasas y 2) endopeptidasas (Bergmann y Fruton, 1941). A continuación se detallan algunas características de las proteinasas contenidas en el inciso b.

Exopeptidasas

Son proteinasas que necesitan la presencia de cualquiera de los grupos $-NH_2$ o -COOH adyacentes al enlace a romper; hidrolizan enlaces peptídicos a partir del N o C

terminal. El uso de sustratos sintéticos ha ayudado a elucidar la relación estructura-sustrato y así poder clasificarlas de forma específica en aminopeptidasas, carboxipeptidasas, dipeptidasas y dipeptidilaminopeptidasas (Barret y McDonald, 1980; Bird y Carter, 1980).

Aminopeptidasas. Requieren de la presencia de grupos amino (NH_2) o imino (-NH), para iniciar el rompimiento del enlace del N terminal. Se tienen dos formas de aminoapeptidasas en el músculo esquelético: 1) leucina aminopeptidasa y 2) arilamidasa.

La leucina aminopeptidasa rompe el N-terminal del enlace peptídico de amidas y peptidos no sustituidos que contengan un residuo de leucina y el amino terminal esté en la configuración L. El compuesto leucina amida es un sustrato usual para el análisis de actividad de leucina aminopeptidasas (Bird y Carter, 1980), la cual muestra una máxima actividad a pH 7.8-8.0 y es activada por iones divalentes (DeLange y Smith, 1971).

Las arilamidasas son proteinasas tipo tiol e hidrolizan sustratos cromogénicos como aminoacil p-nitroanilidas y 2-naftilamidas (Patterson *et al.*, 1963; Bird y Carter, 1980); tienen actividad a pH 6.0, 7.0 y 7.8 cuando usan como sustrato lisil-, arginil- y leucil-2-naftilamida (Bury y Pennington, 1973; Kar y Pearson, 1976). Se ha observado que cerca del 60-90% de la actividad de estas aminopeptidasas se encuentran en la fracción soluble del sarcoplasma (Hardy *et al.*, 1975; Parson y Pennington, 1976; Bury

et al., 1977), sugiriendo que las arilamidasas están presentes en forma libre y que son estimuladas por iones divalentes (Bury y Pennington, 1973).

Carboxipeptidasas. Requieren de la presencia de un aminoácido no sustituído, es decir un grupo -COOH, para iniciar la hidrólisis del enlace peptídico del C terminal y producir aminoácidos libres (McDonald y Schwabe, 1977). Se han detectado dos peptidilaminopeptidasas en el músculo esquelético: 1) carboxipeptidasa lisosomal A y 2) carboxipeptidasa lisosomal B.

La carboxipeptidasa A o catepsina A hidroliza a partir del C-terminal en los enlaces peptídicos que contienen un aminoácido hidrofóbico en el penúltimo resíduo adyacente al enlace a romper (Tallan *et al.*, 1952). Se le conoce también como carboxipeptidasa lisosomal A, porque se ha encontrado asociada con partículas semejantes a lisosomas (Iodice *et al.*, 1972). Esta enzima hidroliza sustratos característicos de proteinasas serinas y de pepsina, por lo que la catepsina A se considera una enzima no muy específica (Bird y Carter, 1980). Muestra su actividad máxima a pH 5.5 en músculo de mamíferos (Caldwell y Grosjean, 1971).

La carboxipeptidasa B o Catepsina B, está considerada como una proteinasa tiol (Otto y Bhaki, 1969; Barret, 1972). Hidroliza sustratos con la secuencia Carboxil-benzoil-Gly-Arg a partir del C terminal a pH 5.5-6.0. Se ha detectado actividad de esta enzima en músculo de mamíferos (Hirao *et al.*, 1984) y en músculo de diferentes especies marinas (Bonete *et al.*, 1984; Hara *et al.*, 1988).

et al., 1977), sugiriendo que las arilamidasas están presentes en forma libre y que son estimuladas por iones divalentes (Bury y Pennington, 1973).

Carboxipeptidasas. Requieren de la presencia de un aminoácido no sustituído, es decir un grupo -COOH, para iniciar la hidrólisis del enlace peptídico del C terminal y producir aminoácidos libres (McDonald y Schwabe, 1977). Se han detectado dos peptidilaminopeptidasas en el músculo esquelético: 1) carboxipeptidasa lisosomal A y 2) carboxipeptidasa lisosomal B.

La carboxipeptidasa A o catepsina A hidroliza a partir del C-terminal en los enlaces peptídicos que contienen un aminoácido hidrofóbico en el penúltimo resíduo adyacente al enlace a romper (Tallan *et al.*, 1952). Se le conoce también como carboxipeptidasa lisosomal A, porque se ha encontrado asociada con partículas semejantes a lisosomas (Iodice *et al.*, 1972). Esta enzima hidroliza sustratos característicos de proteinasas serinas y de pepsina, por lo que la catepsina A se considera una enzima no muy específica (Bird y Carter, 1980). Muestra su actividad máxima a pH 5.5 en músculo de mamíferos (Caldwell y Grosjean, 1971).

La carboxipeptidasa B o Catepsina B, está considerada como una proteinasa tiol (Otto y Bhaki, 1969; Barret, 1972). Hidroliza sustratos con la secuencia Carboxil-benzoil-Gly-Arg a partir del C terminal a pH 5.5-6.0. Se ha detectado actividad de esta enzima en músculo de mamíferos (Hirao *et al.*, 1984) y en músculo de diferentes especies marinas (Bonete *et al.*, 1984; Hara *et al.*, 1988).

Dipeptidasas. Estas enzimas hidrolizan el enlace peptídico de los dipéptidos y requiere tanto de grupos aminos como de carboxilos en forma libre y que estén en el C o N terminal (Bird y Carter, 1980). Se han dividido en 4 tipos: 1) prolinasa; 2) glicil-leucina dipeptidasa y 3) glicil-glicina dipeptidasa.

Las Prolinasas hidrolizan dipéptidos que contienen en el amino terminal el aminoácido prolina o hidroxiprolina (como Pro-Gly) (Bird y Carter, 1980). Se ha detectado su actividad en músculo de mamíferos, mostrando actividad máxima a pH 8.0 (Smith, 1984c). Es activada por manganeso e inhibida por fosfatos, citratos y pirofosfato.

Las Glicil-leucina dipeptidasas, su actividad depende de la presencia de zinc y fosfatos, con un pH óptimo de 8.0 (Smith, 1984b) y el manganeso no tiene ningun efecto sobre la actividad de esta enzima (Krzysik y Adibi, 1977); se detectó actividad de estas enzimas en músculo esquelético de conejo y ratón.

Se ha detectado la actividad de Glicil-glicina Dipetidasa en músculo de ratas, la cual es activada por cobalto a pH 7.0-7.6 (Smith, 1984b). La enzima hidrolizó los dipéptidos Gly-Tyr y Leu-Tyr.

Dipeptidilpeptidasas. Son enzimas proteolíticas que catalizan la liberación consecutiva de dipéptidos intactos a partir del N terminal libre de los polipéptidos (McDonald y Schwabe, 1977). Basándose en la actividad de estas enzimas sobre el sustrato 2-naftilamida, se han detectado cuatro enzimas diferentes en músculo esquelético (McDonald et al., 1971; Bury y Pennington, 1975).

1) Dipeptidil aminopeptidasa o catepsina C. Los sustratos para identificar la actividad de catepsina C son Gly-Arg- y Gly-Phe-2-naftilamida a pH 5.6 (McDonald y Schwabe, 1977). Generalmente, la catepsina C rompe enlaces amida, éster, arilamida y sustratos peptídicos con la secuencia X-Y-Z, donde X no es arginina o lisina y Y o Z no es prolina.

El sitio activo de la catepsina C está constituído por un grupo tiol (Fruton y Mycek, 1956), el cual puede ser disociado por agentes desnaturalizantes como la urea a pH menores de 3.0 (Metrione *et al.*, 1970). La enzima requiere de iones cloro para su activación a pH 5-6 (McDonald *et al.*, 1966; 1974). Se ha reportado que la catepsina C es activada por agentes tiol e inhibida por los agentes bloqueantes de estos (Barret, 1972). El PMSF no tiene efecto sobre esta enzima (Fruton y Mycek, 1956), pero es inhibida por iodoacetamida y $CuSo_4$ (Misaka y Tappel, 1971).

Se ha detectado la actividad de esta enzima en músculos de diferentes especies, no obstante dicha actividad ha sido muy baja (Bury y Pennington, 1975; Hardy *et al.*, 1977). En pollo ha sido localizada en partículas semejantes a los lisosomas (Iodice *et al.*, 1972).

2) Dipeptidil aminopeptidasa II. Su actividad ha sido evaluada sobre el sustrato Lys-Ala-2-naftilamida a pH 4.5-5.5 (McDonald *et al.*, 1968). Rompe enlaces liberando dipéptidos a partir del N terminal del péptido con la secuencia X-Y-Z, especialmente cuando X es lisina o arginina y Y puede ser prolina. En contraste con la catepsina C, no tiene en su sitio activo un grupo tiol, ni requiere de cloro para activarse (Kar y Pearson, 1978; Parsons *et al.*, 1978).

3) Dipeptidil aminopeptidasa III. Libera dipéptidos secuencialmente a partir del N terminal libre de los polipéptidos a pH 7-8 (McDonald et al., 1971). Generalmente para identificarla, se usa el sustrato Arg-Arg-2-naftilamida a pH 8.5 (Kar y Pearson, 1978). La enzima ha mostrando ser de origen citosólico, siendo inhibida por concentraciones 1 mM de EDTA y activada por grupos tiol.

4) Dipeptidil aminopeptidasa IV. Hidroliza enlaces peptídicos produciendo dipéptidos a partir del N terminal de polipéptidos con secuencia X-Y-Z, donde Y es un residuo prolina. Su pH óptimo es pH 7.5. El sustrato usualmente utilizado para detectar su presencia es Gly-Pro-2-naftilamida (McDonald y Schwabe, 1977).

Endopeptidasas

Por definición, estas enzimas rompen enlaces peptídicos de la cadena polipeptídica distantes a los extremos, en los cuales no se presenten grupos cargados en el carbono α qu rodee al enlace a romper, (Mihalyi, 1972). La especificidad de este grupo de enzimas sobre sustratos no es conocida, por lo que se han clasificado en cuatro grupos, basado en el mecanismo catalítico determinado por su sensibilidad a inhibidores específicos (Bird y Carter, 1980).

Proteinasas Serina. Estas enzimas poseen un único resíduo serina reactivo en su sitio activo (Blow y Steitz, 1970). Muestran su máxima actividad a valores de pH altos

(8.0) y son llamadas proteinasas alcalinas (Bird *et al.*, 1980). Son inhibidas por acilación del grupo OH de la serina con diisopropil fluorofosfato (DFP) (Jansen *et al.*, 1949) o sulfonil fluoruro (Fahrney y Gol, 1963) y por alquilación del grupo imidazol de la histidina por compuestos halogenilcarbonicos (Shaw *et al.*, 1965). A esta enzima se le ha identificado como enzima "semejante a Quimotripsina" (Makinodan et al., 1982).

Dos proteinasas serinas han sido identificadas: 1) Proteinasa serina miofibrilar.- Noguchi y Kandatsu (1971) identificaron la actividad de una proteinasa alcalina (pH 9.0) en el sobrenadante y precipitado de músculo homogenado de rata; como la actividad en el precipitado fue 9 veces mayor que en el sobrenadante, ésta fue asociada con la miofibrillas. En forma similar, Holmes *et al.* (1971), reportaron una enzima en miofibrillas de raton, que mostró su actividad máxima a pH 8.3. Los resultados de estas investigaciones sugirieron que un grupo hidroxilo es el responsable de la actividad enzimática de la misma. La enzima tiene especificidad por los péptidos conteniendo los resíduos de Try-Leu y Phe-Phe (Noguchi y Kandastsu, 1970). Murakami y Uchida (1978, 1980), identificaron una enzima con propiedades similares a la proteinasa serina la cual no requiere de calcio para su actividad.

2) Proteinasa miofibrilar y proteinasa citosólica.- Dahlmann *et al.*, (1979), observaron actividad de dos proteinasas en un homogenado de músculo de ratón, con una actividad máxima a pH alcalino. Una de las enzimas fue aislada de la fracción citoplasmática (proteinasa citosólica) y mostró propiedades similares a la enzima semejante a quimotripsina. La otra proteinasa fue aislada de la fracción miofibrilar

(proteinasa miofibrilar), mostrando actividad semejante a Tripsina, con máxima actividad en el rango de pH de 5 a 7.

Proteinasas Tiol. Son aquellas proteinasas cuyo centro activo está constituído por uno o mas grupos SH, los cuales catalizan la reacción; son inhibidas por agentes oxidantes y alquilatantes y por iones metálicos que enlazan a los grupos SH (Mihalyi, 1972).

Se han reportado varias proteinasas tiol en músculos de diferentes especies de mamíferos (Aghar y Batti, 1987) y de pescado (Matsumiya *et al.*, 1989; Yamashita y Konagaya, 1991), donde la mas importante es considerada la catepsina B. Esta enzima presenta idéntica actividad sobre los sustratos de tripsina (Bz-Arg-NH_2) bajo condiciones reductoras. El pH óptimo para su actividad varía de 3.5 a 6.0, dependiendo de la naturaleza del sustrato, pero el más común es el pH 6.0 (Barret, 1972, 1973).

La actividad de la catepsina B depende de los grupos SH (Husain y Baqai, 1976) y es inestable a pH cercanos a 7.0. Se ha reportado baja actividad de catepsina B en músculo de diferentes especies (Pluskal y Pennington, 1973a), siendo localizada en la fracción lisosomal del mismo (Bird *et al.*, 1978; Hardy y Pennington, 1979). En 1971, Otto indicó que la catepsina B puede romper un número variado de enlaces peptídicos siempre y cuando esté junto con otras enzimas; por otro lado, se ha reportado que en forma pura es más específica (Kirschke *et al.*, 1980).

Los sustratos más específicos para identificar la actividad de catepsina B son Bz-DL-Arg-4-nitroamida, Bz-DL-Arg-2-naftilamida (Otto, 1971) y Bz-Arg-Arg-2-naftilamida (McDonald y Ellis, 1975).

Proteinasas Aspartato. Un grupo -COOH del resíduo aspártico constituye su sitio activo. Este grupo de enzimas son inhibidas por reactivos esterificantes como diazoacetiloleucina-metilester en presencia de cobre (Takahashi *et al.*, 1974), fluoroborato (Paterson y Knowles, 1972) y pepstatina (Umezawa y Aoyagi, 1977). Se han reportado sólo dos endopeptidasas con un grupo -COOH en el sitio activo, a las cuales se le ha denominado catepsina D y E, siendo la primera la de mayor importancia. Esta enzima requiere de cuando menos cinco resíduos en su sustrato para expresar su actividad a pH 3-5 (Press *et al.*, 1960; Barret, 1970; Erickson *et al.*, 1981).

La catepsina D es una proteinasa ácida (Huag *et al.*, 1980), donde su sitio activo está constituído por los resíduos Asp^{32} y Asp^{215} (Keilová *et al.*, 1968). Hidroliza más eficiente los enlaces peptídicos entre Phe-Phe, Phe-Tyr y Leu-Tyr, que los enlaces Glu-Ala y Tyr-Leu, sugiriendo que la enzima prefiere hidrolizar enlaces peptídicos que contengan resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Lin y William, 1979). La catepsina D se localiza en la fracción lisosomal de las células (Bird *et al.*, 1978).

Metaloproteinasas. La actividad de estas enzimas depende de la presencia de un catión (Ca^{++}, Zn^{++}), el cual puede estar fuertemente enlazado a la proteína. Este catión siempre mantiene una relación estequiométrica con la molécula de proteína (Valle, 1955). Las metaloenzimas son inhibidas por cianídas. Ejemplos de algunas metaloproteinasas son: Colagenasa, Carboxipeptidasa A y algunas aminopeptidasas (Matsubara y Feder, 1971).

Las colagenasas hidrolizan enlaces peptídicos específicos localizados en la triple hélice de la conformación nativa del colágeno a pH 7.5; es estimulada por calcio y compuestos tiol. No se ha aislado colagenasa del músculo esquelético, sin embargo, existen estudios donde se indica la presencia de actividad de colagenasa en músculo de bovino (Laakkonen *et al.*, 1970).

De estudios realizados mediante el uso de sustratos sintéticos, se llegó a la conclusión de que no se considera una enzima específica de músculo en mamíferos (Seifter y Harper, 1971).

Carboxipeptidasas

Existen dos tipos de carboxipeptidasas, A y B. Son liberadas por el páncreas y requieren que el grupo carboxilo del C-terminal en el resíduo aminoácido esté libre. Ambas requieren de Zn^{++} en su sitio activo. Su especificidad sobre el sustrato es diferente ya que la carboxipeptidasa B requiere que el C-terminal del residuo sea arginina

o lisina, mientras que la carboxipeptidasa A puede actuar sobre cualquier resíduo que no sea arginina, lisina o prolina (Whitaker, 1972).

El ion Zn^{++} puede removerse del sitio activo de las carboxipeptidasas por la acción de agentes quelantes como EDTA o 1,10-fenantrolina; este último forma derivados estables con el ion Zn^{++} y los átomos de nitrógeno. Diferentes estudios han indicado que el sitio activo de las carboxipeptidasas contienen residuos tirosil e imidazol los cuales están enlazados por el ión Zn^{++} (Whitaker, 1972).

El pH óptimo de actividad de las carboxipeptidasas es entre de 6.5 y 7.5 (Whitaker, 1972). No existe evidencia acerca de la actividad de estas enzimas en músculo de ninguna especie.

Proteinasas en Pescado

Se ha reportado ampliamente acerca de la actividad de proteinasas sobre la degradación de las proteínas en mamíferos. Sin embargo, poco se ha dicho acerca de la actividad de proteinasas en pescado y otras especies marinas. Existe una gran variedad de proteinasas en los tejidos de mamíferos (Asghar y Batti, 1987), que muestran ser diferentes a las que se han encontrado en los tejidos de pescado (Siebert y Schmitt, 1965).

Catepsinas

La proteólisis de hemoglobina y otras proteínas ha sido atribuída a la acción de un grupo de enzimas hidrolíticas denominadas catepsinas, las cuales tienen su orígen en la fracción lisosomal (Bird *et al.*, 1969). A pesar de que los niveles de actividad encontrados en el músculo fueron bajos comparados con otros tejidos, la contribución al total de la actividad enzimática en el músculo de pescado es mayor del 80%, lo que significa que dicho órgano es una fuente cuantitativamente importante de catepsinas (Bonete *et al.*, 1984). Siebert, (1958), reportó actividad de catepsinas utilizando hemoglobina como sustrato en el músculo de bacalao, arenque, trucha y carpa.

Catepsina D. La catepsina D está considerada fisiológicamente como la principal proteinasa lisosomal ácida en la degradación de proteínas intracelulares (Barret, 1977c). Se ha detectado su actividad en músculo de diferentes especies, entre ellas en lisa (Mugil auratus), donde mostró su máxima actividad a temperatura de 60°C y pH 4.0. Su actividad disminuyó al cambiar el pH, atribuyéndose ésto a la presencia de dos resíduos aspartilos (uno ionizado y otro no ionizado) en el sitio activo.

La enzima es considerada una proteinasa aspártica ya que fué inhibida por pepstatina (Bonete et al., 1984). En músculo de carpa mostró su máxima actividad utilizando hemoglobina como sustrato a pH de 2.6-2.8 y 50°C; fue fuertemente inhibida por pepstatina y cobre. En la hidrólisis de miofibrillas mostró actividad óptima a pH 3-4, pero no a 6.0 (Makinodan *et al.*, 1982).

En lo que respecta al músculo de mojarra (*Tilapia mossambica*), la catepsina D mostró una actividad hidrolítica óptima a pH 5.0 al utilizar como sustrato un extracto sarcoplásmico, mientras que con hemoglobina desnaturalizada mostró máxima actividad a pH 2.8 y 3.8. Su temperatura óptima fue de 50°C, mostrando estabilidad en presencia del sustrato a 60°C. No fue inhibida por compuestos sulfidrilos ni iones como cobre y plomo a pH 3.5 y 37°C (Doke *et al.*, 1980), pero sí por iones como mercurio y hierro^{+++}. Por otro lado, se reportó una fuerte activación por iones calcio, níquel y magnesio, una ligera activación por iones zinc y cadmio, parcial y completa inhibición por EDTA y pepstatina respectivamente, (Jiang *et al.*, 1991).

Catepsina A. Existen pocos estudios de la actividad de esta proteinasa en músculo de pescado (Erickson *et al.*, 1983; Jiang *et al.*, 1990). No se ha detectado su actividad en fluído sarcoplásmico del músculo de bacalao y merluza (Erickson *et al.*, 1983) y sí en músculo de chano (Jiang *et al.*, 1990).

Durante estudios con inhibidores específicos se detectó la actividad de dos fracciones (A y B) de proteinasas semejantes a catepsina A, la actividad óptima para hidrolizar caseína fue de 50°C para A y 40°C para B. El pH óptimo de ambas fracciones para hidrolizar Carbobenzoxi-Gly-Phe fue de 7.0; la temperatura para inactivar el 50% de su actividad fue de 46°C para A y 48°C para B (Jiang *et al.*, 1990)

La fracción B fue parcialmente inhibida por pepstatina, mientras la A fue totalmente inhibida por el mismo compuesto. Pepstatina es un inhibidor específico de

catepsina A y D (Makinodan e Ikeda, 1976), pero la catepsina D hidroliza péptidos que contienen al menos cinco residuos de aminoácidos (Turk *et al.*, 1984), por lo que de acuerdo a la especificidad del sustrato sintético, la enzima se consideró semejante a catepsina A. Los iones divalentes no tienen efecto sobre la catepsina A; excepto el mercurio, el cual la inhibió ligeramente (Jiang *et al.*, 1990).

Catepsina B. Está clasificada como una tiol proteinasa pues un grupo tiol conforma su sitio activo el cual es esencial en su actividad catalítica (Barret, 1977a). Puede hidrolizar fácilmente aldolasa por lo que es usada para diferenciar a esta enzima de Carboxipeptidasa B lisosomal (Barret y Kirschke, 1981).

La catepsina B en músculo de lisa (*Mujil auratus*) mostró su máxima actividad a 45°C y pH 6.0, con un decremento al cambiar el pH, mostrando con ésto la existencia de un par cisteína-histidina en su sitio activo. Es activada por ditiotreitol e inhibida por iodoacetato e iodoacetamida (Bonete *et al.*, 1984).

En carpa, la actividad máxima mostrada fué a pH 6.0 y 37°C con benzoil-DL-arg-ß-naftilamida como sustrato sintético; fue activada por compuestos como cisteína y ditiotreitol; pero inhibida por 2-mercaptoetanol y también fue activada por agentes quelantes tales como EDTA, (Hara *et al.*, 1988). En músculo de macarela, el pH óptimo para hidrolizar el sustrato sintético fue de 5.5 y 40°C. Esta enzima fue activada por compuestos tiol y fuertemente inhibida por TLCK (Matsumiya *et al.*, 1989).

Porteinasas alcalinas

La calidad de los geles de pescado en productos manufacturados, depende grandemente de su elasticidad, ya que productos tipo gel de pobre elasticidad ven disminuido su valor comercial. Uno de los factores principales relacionados con la disminución de la calidad de gel ha sido relacionado con la actividad de proteinasas alcalinas estables al calor, presentes en el músculo del pescado (Makinodan y Ikeda, 1971; Lanier *et al.*, 1981).

Lo anterior sugiere que estas proteinasas del músculo afectan la calidad del pescado durante su almacenamiento y procesado (Makinodan *et al.*, 1984). En curvina blanca (*Argyrosomus argentatus*) mostró su máxima actividad a 60°C y pH 7.0. Esta proteinasa alcalina no solo actúa sobre sustrato sintético, sino también sobre proteínas miofibrilares aisladas (Makinodan y Ikeda, 1971; Lin y Lanier, 1980).

En músculo de esta última especie se detectó una proteinasa alcalina, la cual fue considerada como una enzima citoplasmática, que mostró ser estable al calor y capaz de degradar a actinomiosina in vitro, además de que no requiere de calcio para su actividad; no fue afectada por inhibidores como PMSF, TLCK o EDTA, sugiriendo que la proteinasa no fue del tipo tríptica o quimotríptica (Lin y Lanier, 1980).

Su curva de actividad se basó principalmente en el análisis de pH y el efecto de temperatura, donde la proteinasa alcalina mostró hidrolizar efectivamente proteínas del músculo a 60°C y pH neutro, corroborando con esto su acción en la degradación de la textura de geles de pescado procesados térmicamente en rangos de temperatura cercanos a los 60°C. (Takagi, 1973; Iwata *et al.*, 1974; Cheng *et al.*, 1979; Makinodan *et al.*,

1985). La enzima resultó ser estable aún aplicando cloruro de sodio al producto en concentraciones del 2.5%.

Ha sido reportado que los niveles de actividad de proteinasas alcalinas en músculo varía según la especie (Makinodan *et al.*, 1984), en el orden siguiente: trucha = sardina > curvina blanca = carpa = macarela > lisa. Por otro lado, la actividad enzimática durante la preparación de geles resultó ser: sardina = Curvina blanca > macarela > lisa > carpa (Shimizu *et al.*, 1981).

En músculo de barracuda (*Sphyraena sp.*) se purificó parcialmente una proteinasa alcalina, la cual actuó sobre las proteínas miofibrilares a pH de 7.5-8.0 y 55-60°C (Makinodan e Ikeda, 1971).

Proteinasa Neutra

Se ha considerado que las proteinasas neutras del tejido muscular estan estrechamente relacionadas con la autodigestión de las proteínas del músculo. Existe poca información acerca de estas enzimas (Susuki y Goll, 1974; Makinodan e Ikeda, 1976b); la mayor parte de ésta, comprende estudios en tejidos de mamíferos. En músculo de pescado en particular, hay pocos reportes relacionados con la actividad de proteinasas neutras.

Makinodan *et al.* (1979), extrajeron una proteinasa del músculo de carpa, que resultó ser una típica proteinasa neutra, activa a pH 7.2 y 40°C. La enzima hidrolizó hemoglobina pero no caseína ni albúmina. Su actividad fue inhibida por EDTA y

compuestos sulfidrilos como ditiotreitol; no requirió calcio para su actividad, ni fue afectada por iodoacetato. Esta proteinasa actuó bien sobre hidrolizados de hemoglobina producidos por la catepsina D del músculo de carpa. La enzima es considerada una nueva proteinasa neutra la cual no ha sido reportada previamente en músculo de pescado.

Tripsina, Quimotripsina y Carboxipeptidasas

Estas enzimas no están contempladas como parte de las proteinasas en músculo; sin embargo, muchos estudios han tratado de relacionar algunas características de enzimas alcalinas musculares con éstas, por lo que se les ha denominado como enzimas semejante a tripsina, semejante a quimotripsina y semejantes a carboxipeptidasas. En pescado, la mayoría de los estudios de la actividad semejante a estas proteinasas se enfoca principalmente en vísceras (Kuwano *et al.*, 1976; Chen *et al.*, 1978; Bonnie *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1989) y sólo pocas a músculo (Erickson *et al.*, 1983; Jiang *et al.*, 1990).

En vísceras de chano (Chen *et al.*, 1989) y dependiendo de la especificidad del sustrato, se ha reportado la presencia de cuatro fracciones enzimáticas (proteinasas) con actividad caseinolítica, designadas como A, B, C y D, donde la fracción A, se consideró como semejante a carboxipeptidasa A; la fracción B, como semejante a quimotripsina y las fracciones C y D como semejantes a tripsina.

Las temperaturas de actividad óptima sobre la hidrólisis de caseína de las tres fracciones anteriormente señaladas fue de 60°C para la fracción A, 60°C para la B,

55°C para la C y 65°C para la D. El pH óptimo de la fracción A para hidrolizar hipuril-L-fenilalanina fue 9.0, mientras que la fracción B para hidrolizar acetil-L-tirosina etil ester y las fracciones C y D para hidrolizar Tosil-L-arginina metil ester requieren de un pH de 8.0 (Chen *et al.*, 1988)

En la misma especie de pescado se ha detectado una enzima semejante a tripsina con actividad sobre caseína (Jiang *et al.*, 1990); la temperatura para hidrolizar caseína fue de 60°C y el pH óptimo para hidrolizar p-tosil-L-arginina metil éster (TAME) fue 8.0. La temperatura requerida para disminuir su actividad a un al 50%, fue de 51°C.

Erickson *et al.*, (1983) reportaron la presencia de una proteinasa semejante a quimotripsina en fluído sarcoplásmico de músculo de bacalao y merluza, la cual mostró pH óptimo de 7.3 para hidrolizar glutaril-L-fenilalanina. Dicha enzima fue inhibida por cobre, TLCK y PMSF.

MATERIALES Y METODOS

Para la realización de este trabajo se utilizó Sardina Monterrey (*Sardinops sagax caerulea*), la cual fue capturada en el mar de Cortez a bordo de la embarcación sardinera "El Echaníz", propiedad de la empresa "Sardinas y Derivados de Guaymas, S.A. de C.V.", del Puerto de Guaymas, Sonora, México. La muestra se tomó a la salida del chupón de la succionadora y se acomodó en las hieleras en forma encontrada (cabeza-cola) colocando capas alternadas de hielo y sardina. Se eliminaron todos aquellos especímenes que presentaron magulladuras o estuviesen rotos.

La muestra se transportó a las instalaciones del CIAD lo más rápidamente posible. Al llegar se hizo otra selección y reacomodó en hielo nuevo antes de ser sometida a fileteo, el cual se llevó a cabo dentro de las primeras 24 h poscaptura.

Reactivos

El citrato de sodio, HCl, etanol al 99.8%, ácido acético glacial y citrato de sodio bi-hidratado, fueron de Merck-México, S.A.; el cianuro de sodio, de Productos Químicos Monterrey, S.A. (Monterrey, NL); la cisteína obtenida de Spectrum (Chemical MFG Corporation, San Pedro, CA.) y todos los demás reactivos utilizados fueron proporcionados por Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

Obtención del Músculo

La sardina fue fileteada evitando contaminación visceral. El fileteado se llevó a cabo de la cabeza hacia la cola, eliminando la sardina en caso de rompimiento estomacal; se lavaron todos los utensilios cuando se presentó este caso. El músculo fue empaquetado en porciones de aproximadamente 500 g, para luego ser congelado a -16°C hasta su uso. Durante todo el fileteo, la sardina y músculos obtenidos se mantuvieron en hielo.

Extracción de Proteínas Miofibrilares

Se utilizó músculo de sardina descongelado a 4°C. Las proteínas se extrajeron siguiendo las recomendaciones de Hashimoto *et al.*, (1979).

Todas las operaciones fueron llevadas a cabo a 4°C. Se pesaron 20 g de músculo congelado y finamente picado en tubos para centrífuga de 500 mL, se descongeló y se agregó 200 mL de buffer frío de fosfatos (pH 7.5, fuerza iónica (I) = 0.05). Se homogenizó con un homogenizador de tejido Tizzumizer Tekmar Modelo SDT 1810 (Tekmar Co. W. Germany) a velocidad de 40 por 2 minutos, con intervalos de 1 min y 30 segundos de reposo.

Posteriormente, se centrifugó en una centrífuga refrigerada Beckman Modelo J2-21 (Beckman Instruments INC. Palo Alto, CA); a 5000 X g por 20 minutos. El sobrenadante conteniendo la fracción protéica sarcoplásmica fue desechado. Se repitió la operación una segunda vez. El resíduo de la segunda operación fué homogenizado con 200 mL de buffer de fosfatos-KCl pH 7.5, I=0.5 (KCl 0.45 M, Na_2 HPO_4 15.6 mM,

KH_2PO_4 3.5 mM); se centrifugó con las condiciones anteriormente señaladas. El sobrenadante se guardó en refrigeración hasta su uso posterior. Se repitió la operación y los dos sobrenadantes se mezclaron, constituyendo la fracción proteica miofibrilar.

La fracción miofibrilar se filtró a través de lana de vidrio para eliminar la grasa y se dializó en contra de agua destilada por 24 h a 4°C, en tubos de celulosa de 20 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro.

Se colocó aproximadamente 80 mL de la suspensión proteica en solución salina por tubo de celulosa (6-8 tubos) y se colocaron en un frasco de vidrio de 3.8 L de capacidad lleno con agua destilada fría. Se dejó reposar por 24 h a 4°C. Transcurrido el tiempo se separó la mayor parte de la solución que no contenía proteínas miofibrilares precipitadas. La parte que sí contenía se colocó en tubos de centrífuga de 500 mL y se centrifugó a 6000 Xg por 30 min y 4°C.

Transcurrido el tiempo se desechó el sobrenadante y el precipitado se colocó en viales de plástico de 25 mL sellándose con papel parafilm. Se congelaron a -40°C y se almacenaron por 5 días aproximadamente para luego ser liofilizadas por 48 h, en un liofilizador Labconco Modelo 4451F, (Labconco Corporation. Kansas City, MO) con vacío de 200 micrones de Hg y - 50°C.

Las proteínas liofilizadas se molieron hasta obtener un polvo muy fino, en un mortero evitando calentamiento y posteriormente, fueron almacenados a - 40°C hasta su uso como sustrato para determinar la actividad de proteinasas presentes en el músculo de Sardina Monterrey.

Preparación de Suspensiones para su uso como Sustrato Enzimático. Se prepararon suspensiones de proteínas miofibrilares a una concentración del 1%; las preparaciones se llevaron a cabo en los diferentes buffers de acuerdo a las condiciones necesarias (para pH en diferentes buffers presentados en el cuadro 6 y para temperatura, fuerza iónica y estabilidad del extracto crudo, en buffer Tris-HCl 0.2 M, pH 7.5).

Las suspensiones se prepararon homogenizando las proteínas liofilizadas con el buffer requerido por 5 minutos o hasta formar una suspensión homogénea con una velocidad mínima para evitar formación de espuma, manteniendo la muestra durante todo el tiempo en baño de hielo. Las suspensiones fueron preparadas antes de ser utilizadas para evitar al máximo la oxidación ya que no estaban totalmente libre de grasa.

Fluido sarcoplásmico

Extracción. El fluido sarcoplásmico (extracto crudo para actividad de proteinasas), se obtuvo de la siguiente forma. El músculo congelado se picó finamente colocándose en tubos de centrífuga de policarbonato de 500 mL de capacidad, se dejó descongelar a temperatura de 4°C (aproximadamente 10 min) y se centrifugó a 3000 X g por 30 min a 4°C, en centrífuga refrigerada Beckman Modelo J2-21 (Beckman Instruments INC. Palo Alto, CA); condición con la que se obtuvo el mayor rendimiento de extracción (4 mL por cada 60 g de músculo).

Transcurrido el tiempo, se separó el líquido del residuo el cual fue utilizado como fluído sarcoplásmico. El fluído se manejó en fresco para todo el trabajo cada vez que se realizaron análisis, manteniéndose en baño de hielo durante todo el tiempo utilizado.

Determinación de la Concentración de Proteínas. La determinación del contenido de proteínas del fluído sarcoplásmico se llevó a cabo mediante el método de Biuret (1964); utilizando una curva estándar de seroalbúmina bovina (SBA), con una solución madre de 10 mg/mL. Se hicieron diluciones de 0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10 mg/mL. Se leyó absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Modelo Lamda 3A (Perkin Elmer de México S.A. de C.V; México, D.F).

Estabilidad. Se determinó la estabilidad de la actividad enzimática del fluído sarcoplásmico bajo las siguientes condiciones:

a) Actividad de enzimas proteolíticas del extracto crudo sobre las proteínas presentes en éste. Lo anterior se interpretó como el contenido de Nitrógeno no proteico (NNP) en la muestra, siguendo las recomendaciones de Erickson *et al.* (1983).

Se almacenó el extracto crudo por 4 días a 0°C, tomando muestras a los tiempos 0, 24, 48, 64 y 72 h. Se precipitaron las proteínas presentes en el extracto con acido tricloroacético al 5%.

Para un volumen total de 2 mL, se mezclaron 1.5 mL de extracto crudo y 0.5 mL de TCA al 20%. Se reposó la muestra por 30 min a temperatura ambiente y se filtró a

través de papel Whatman No. #1. Se almacenaron todos los extractos de TCA de los muestreos en refrigeración a 4°C. Se determinó el contenido de NNP por el método de micro-kjeldhal (AOAC, 1984), utilizándose muestras de 0.6-1 g. Todas las determinaciones fueron hechas por duplicado.

b) Almacenamiento a 0°C y 4°C por un período de 4 días, monitoreando el cambio de absorbancia cada 24 h, tomando como día cero cuando recién se obtuvo el extracto.

Se tomaron 0.5 mL de extracto, se le agregó 2.0 mL de suspensión de proteínas miofibrilares al 1% en buffer Tris-HCl 0.2M, pH 7.5 y 1 mL del mismo buffer Tris-HCl. El blanco contenía los mismos compuestos excepto fluído sarcoplásmico.

Tanto la mezcla como el blanco se incubaron a 38°C por 30 minutos en baño María. Transcurrido el tiempo de incubación se paró la reacción adicionando 6 mL de acido tricloroacético al 5% a las mezclas reacción y para el blanco se adicionaron 6 mL de acido tricloroacético al 5% + 0.5 mL de fluído sarcoplásmico.

Se dejaron reposar por 30 min a temperatura ambiente (22°C) y se filtraron a través de papel Whatman No. 1 y a los sobrenadantes se les leyó el cambio de absorbancia a 280 nm, en un Espectrofotómetro Perkin Elmer de doble haz, modelo Lambda 3A UV/VIS (Perkin Elmer de México, S.A. de C.V. México, D.F.). La actividad se expresó como ΔA_{280nm}/min/mg proteína.

A lo largo de todo el período de almacenamiento se determinó el contenido de proteínas de 50 μL de extracto crudo por el método de Biuret (1964) a 540 nm, utilizando albúmina bovina como proteína estándar. La curva utilizada comprendió el

rango de concentración de 0-10 mg/mL.

c) Almacenamiento por 4 h a 0°C, tomando muestras a los 0, 30, 60, 120, 180, 240 min, después de obtener el extracto. Se tomaron 0.5 mL de extracto, se le agregó 2.0 mL de suspensión de proteínas miofibrilares al 1% en buffer Tris-HCl 0.2 M, pH 7.5 y 1 mL del mismo buffer Tris-HCl. El blanco contenía los mismos compuestos excepto fluído sarcoplásmico. Tanto la mezcla como el blanco se incubaron a 65°C por 30 minutos en baño María.

Transcurrido el tiempo de incubación se paró la reacción adicionando 6 mL de TCA al 5% a las mezclas reacción y para el blanco se adicionaron 6 mL de TCA al 5% + 0.5 mL de fluído sarcoplásmico. Se dejaron reposar por 30 min a temperatura ambiente (22°C), se filtraron a través de papel Whatman No. 1 y a los sobrenadantes se les leyó el cambio de absorbancia a 280 nm. La actividad se expresó como $\triangle A_{280nm}$/min/mg proteína. El contenido de proteínas se determinó por el método de Biuret (1964).

Actividad Autolítica del Fluído Sarcoplásmico

Efecto del pH

Se llevó a cabo siguiendo la metodología de Erickson *et al.* (1983), pero en lugar de utilizar hemoglobina como sustrato se usó una suspensión de proteínas miofibrilares al 1%. Los buffers para resuspensión de proteínas miofibrilares y las reacciones

utilizados para esta técnica fueron 0.2 M determinados en el presente trabajo y se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Buffers utilizados para determinación del efecto de pH sobre la actividad y estabilidad de proteínasas presentes en el músculo de Sardina Monterrey.

Para pH	Buffer para resuspensión de proteinas miofibrilares	Buffer reacción
2.5	Ac. Cítrico-NaOH pH 2.42	Ac. Cítrico-NaOH pH 2.42
3.5	Ac. Cítrico-NaOH pH 2.42	Ac. Cítrico-NaOH pH 4.87
4.5	Ac. Cítrico-NaOH pH 4.87	Ac. Cítrico-NaOH pH 3.80
5.5	Ac. Málico-NaOH pH 5.19	Ac. Málico-NaOH pH 5.3
6.5	Ac. Cítrico-NaOH pH 4.87	Fosfatos pH 7.5
7.5	Tris-HCl pH 8.5	Tris-HCl pH 8.0
8.5	Tris-HCl pH 8.5	Tris-HCl pH 10.9
9.5	Glicina-HCl pH 9.63	Glicina-HCl pH 10.7
10.5	EDTA-NaOH pH 11.52	EDTA-NaOH pH 10.49

Las mezclas reacción se elaboraron de la siguiente manera:

En tubos de vidrio de 18 x 150 mm se colocaron 2 mL de suspensión de proteínas miofibrilares al 1% en los diferentes buffers según el cuadro 6, 1.0 mL de buffer reacción para cada pH y 0.5 mL de fluido sarcoplásmico. El blanco contenía todo excepto fluído sarcoplásmico.

Mezclas y blanco se incubaron a 50 °C por 30 min en baño María. Al final del período de incubación se agregó 6 mL de TCA al 5% (peso/volumen) a las mezclas y

para el blanco, 6 mL de TCA al 5% y 0.5 mL de fluído sarcoplásmico. Ambos se reposaron 30 min a temperatura ambiente, se filtraron a través de papel Whatman No. 1 y al sobrenadante se midió la absorbancia a 280 nm.

La actividad fue expresada como $\triangle A_{280nm}$ /min/mg proteína. El contenido de proteínas se determinó por el método de Biuret (1964).

Efecto de la Temperatura

Se midió de acuerdo a las indicaciones de Erickson *et al.* (1983) con una ligera modificación. En lugar de usar caseína como sustrato, se utilizaron proteínas miofibrilares liofilizadas extraídas del músculo de sardina en concentración del 1%.

Las mezclas reacción se elaboraron de la siguiente manera:

En un matraz erlenmeyer de 25 mL se colocaron 10 mL de suspensión de proteinas miofibrilares al 1% en buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5; 5 mL de buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5 a 4°C y 5 mL de fluído sarcoplásmico.

El blanco contenía 10 mL de suspensión de proteínas miofibrilares al 1% y 5 mL de buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5. Mezclas y blanco se incubaron a 25, 35, 45, 50, 55 y 65°C en baño María por 2 hrs. A intervalos de 30 min, se tomaron alícuotas de 2 mL de la mezcla reacción y se agregaron 3.5 mL de TCA al 5% (peso/volumen). A la vez, del blanco se tomaron 3 mL y se agregó 1 mL de fluído sarcoplásmico e inmediatamente 7 mL de TCA al 5%. Mezclas y blancos reposaron a temperatura ambiente por 30 min.

Se filtraron a través de papel Whatman No. 1 para separar el precipitado. Al sobrenadante se le midió la absorbancia a 280 nm. La actividad fue expresada como ΔA_{280nm} /mg proteína. El contenido de proteínas se determinó por el método de Biuret (1964).

Efecto de la Fuerza Iónica

Para determinar el efecto de fuerza iónica sobre la actividad de proteínasas presentes en el músculo de sardina se modificó la técnica de Deng et al. (1979).

Se prepararon varias soluciones de diferente fuerza iónica formadas de buffer Tris-HCl 0.2 M, pH 7.5 y KCl. El buffer aportó una fuerza iónica (I) de 0.16; la diferencia para lograr I de 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6, fue aportada por KCl.

Según Segel (1976), la relación entre la fuerza iónica y la molaridad de una solución de sales ionizables depende del número de iones producidos y su carga neta (Cuadro 7).

Cuadro 7. Ejemplo de fuerza iónica de diferentes compuestos.

Tipo	Sal Ejemplo	Fuerza iónica
1:1	KCl, NaBr	M
2:1	$CaCl_2$, Na_2HPO_4	3XM
2:2	$MgSO_4$	4XM
3:1	$FeCl_3$, Na_3PO_4	6XM
2:3	$Fe_2(SO_4)_3$	15XM

Fuente: Segel, 1976.

Por lo tanto las fuerzas iónicas de las soluciones de KCl serán iguales al valor de su molaridad. Se prepararon las siguientes soluciones de KCl en el buffer Tris-HCl 0.2M, pH 7.5 (Cuadro 8), las que se determinaron en el siguiente trabajo.

Cuadro 8. Molaridades de las soluciones buffer utilizadas para deteminación del efecto de fuerza iónica sobre la actividad y estabilidad de proteinasas presentes en el músculo de Sardina.

Solución de KCl, en buffer Tris-HCl 0.2 M, pH 7.5	Para Fuerzas iónicas de
0.04 M	0.2
0.14 M	0.3
0.24 M	0.4
0.34 M	0.5
0.44 M	0.6

Se prepararon suspensiones de proteínas miofibrilares al 1% a diferentes fuerzas iónicas en los buffers del cuadro 6.

En el estudio de efecto de fuerza iónica, las mezclas reacción se prepararon de la siguiente manera:

Para las diferentes fuerzas iónicas (I) de 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 se colocaron en tubos de 18x150 mm 2 mL de suspensión de proteínas miofibrilares al 1% en soluciones buffer (Cuadro 6). Se adicionó 1 mL del mismo buffer de diferentes fuerzas iónicas (Cuadro 6) y 0.5 mL de fluído sarcoplásmico. Para los blancos se mezcló todo excepto el fluído sarcoplásmico. Mezclas y blancos se incubaron a 60°C por 30 min en baño María.

Para finalizar la reacción se adicionaron 6 mL de TCA al 5% a las mezclas y al blanco se le adicionaron 6 mL de TCA al 5% + 0.5 mL de fluído sarcoplásmico. Ambos se dejaron reposar 30 min a temperatura ambiente para posteriormente ser filtrados a través de papel Whatman No. 1. Al filtrado se le leyó absorbancia a 280 nm. La actividad fue expresada por $\triangle A_{280nm}$ /min/mg proteína.

El contenido de proteínas del extracto se determinó por el método de Biuret (1964).

Estabilidad al pH

Se procedió a incubar el extracto a los pH de 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5 y 9.5 en baño de hielo.

Se colocó 0.5 mL de fluído sarcoplásmico en un tubo de ensayo y tomando de referencia el cuadro 6; se agregó 2 mL de buffer para resuspensión y 1 mL de buffer reacción para el ajuste de los diferentes pHs. Las mezclas de fluído a diferentes pHs se incubaron en baño de hielo por 1 h.

Transcurrido este tiempo, se midió la actividad residual del fluído sarcoplásmico a pH 7.5 y 65°C. Para cada pH, las mezclas reacción se formaron de 2 mL de suspensión de proteínas miofibrilares al 1% en buffer Tris-HCl, 0.2 M, pH 7.5; 1 mL de buffer Tris-HCl, 0.2M, pH 7.5 y 0.5 mL de la mezcla preincubada. Para el blanco fue igual excepto que no llevaba mezcla preincubada.

Ambos, mezclas reacción y blanco se incubaron en baño María a 65°C por 30 min. Para terminar la reacción se adicionaron 6 mL de TCA al 5% a las mezclas reacción y para el blanco se adcionó 6 mL de TCA al 5% + 0.5 mL de mezcla preincubada; ambos se reposaron a temperatura ambiente por 30 min. Se filtraron a través de papel Whatman No 1; al filtrado se le determinó la absorbancia a 280 nm. A la mezcla preincubada se le determinó el contenido de proteínas por el método de Biuret (1964). La actividad se expresó como $\triangle A_{280nm}$/min x mg proteína.

Estabilidad a la Temperatura

El período de incubación en el estudio del efecto de temperatura en la actividad autolítica fue de 2 h (Erickson *et al.*, 1983), tomando alícuotas cada 30 min. Para la evaluación de la estabilidad se determinó utilizar el doble de tiempo de la reacción total (preincubación) siguiendo la recomendación de Segel (1972).

El extracto se preincubó a 10, 20, 25, 35, 45, 55, 65, 70 y 77°C, por 0, 30, 60, 90, 120 y 150 min. Se colocaron por duplicado alícuotas de 0.5 mL de fluído sarcoplásmico en tubos de 18x150 mm y para el blanco, 1 mL del mismo fluido en tubos de 13x100 mm. Ambos se preincubaron en baño María a las diferentes temperaturas, etiquetando los tubos para cada tiempo evitando así confusión al momento de retirarlo.

Para cada intervalo se midió la actividad enzimática residual de la siguiente manera: para mezclas reacción, a los 0.5 mL de fluído sarcoplásmico previamente incubado + 2 mL de suspensión de proteínas miofibrilares al 1% en buffer Tris-HCl 0.2 M, pH 7.5 + 1 mL del mismo buffer.

Para el blanco se adicionaron 2 mL de suspensión de proteínas miofibrilares al 1% en buffer Tris-HCl 0.2 M, pH 7.5 + 1 mL de buffer Tri-HCl 0.2 M, pH 7.5. El mL de fluído sarcoplásmico preincubado para este blanco se colocó en baño de hielo mientras duró la incubación de la reacción. Tanto mezclas reacción como blanco se incubaron a 65°C por 120 min en baño María.

Para terminar la reacción a las mezclas reacción se agregaron 6 mL de TCA al 5%; para el blanco, se adicionaron 6 mL de TCA al 5% y 0.5 mL de fluído sarcoplásmico preincubado y que fué mantenido en el hielo. Las mezclas de TCA se reposaron por 30 min a temperatura ambiente y se filtraron a través de papel Whatman No. 1, a los sobrenadantes se leyó su absorbancia a 280 nm.

Se determinó el contenido de proteínas de las mezclas preincubadas por el método de Biuret (1964). La actividad se calculó como ΔA_{280nm}/min/mg proteína).

Estabilidad a la Fuerza Iónica

De los análisis realizados en este trabajo, para la determinación del efecto de fuerza iónica sobre la actividad de proteinasas en fluído sarcoplásmico del músculo de la sardina, se determinó que el valor de fuerza iónica para la máxima actividad enzimática fue de 0.3.

En la determinación de la estabilidad se hizo lo siguiente:

Se preincubó en baño de hielo por 1 h, 0.5 mL de fluído sarcoplásmico con 3.0 mL de buffer de fuerza iónica 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, los cuales fueron ajustados utilizando las soluciones buffer reportados en el Cuadro 8.

Al término de la preincubación, para las mezclas reacción se tomaron alícuotas de 0.5 mL de cada tubo, se agregó 2 mL de suspensión de proteínas miofibrilares al 1%, en buffer Tris-HCl, 0.2 M, pH 7.5 + 1 mL de buffer del mismo buffer, reajustando la fuerza iónica de la mezcla a 0.3, mediante la adición de los gramos de KCl necesarios para un volumen total de 3.5 mL (Cuadro 9).

Para los blancos se hicieron las mismas mezclas pero sin fluído preincubado: éstos permanecieron en hielo hasta terminar la reacción.

Cuadro 9. Adición de los gramos necesarios de KCl para ajustar la fuerza iónica a 0.3 en las pruebas de estabilidad de la actividad autolítica a la fuerza iónica.

Fuerza iónica necesaria	g de KCl para ajuste a I=0.3 en 100 ml de buffer
0.2	1.167
0.3	1.043
0.4	0.916
0.5	0.793
0.6	0.669

Tanto mezclas reacción como blancos se incubaron a 65°C por 30 min. Las reacciones se terminaron agregando 6 mL de TCA al 5% a las mezclas reacción y para

los blancos se adicionaron 6 mL de TCA al 5% + 0.5 mL de los fluídos preincubados, que fueron mantenidos en hielo.

Se reposaron 30 min a temperatura ambiente y filtraron a través de papel Whatman No. 1. A los sobrenadantes se les leyó absorbancia a 280 nm. Se determinó el contenido de proteínas de las mezclas preincubadas por el método de Biuret (1964). La actividad se reportó como $\triangle A_{280nm}$ / min x mg proteína.

Determinación de Actividades Específicas del Fluído Sarcoplásmico

Colagenasa

Medición de Actividad. La actividad específica para colagenasa presente en el fluído sarcoplásmico del músculo de sardina se determinó de acuerdo al método establecido por Erickson *et al.*, (1983).

El volumen total del medio reacción fue de 5.1 mL y se formó con 25 mg de colágeno utilizado como sustrato + 1 mL de $CaCl_2$ 1.785 mM en buffer Tris-HCl 49.98 mM, pH 7.5 + 4 mL del mismo buffer + 0.1 mL de fluído sarcoplásmico.

Se manejaron dos blancos:

Blanco 1: No contenía colágeno

Blanco 2: Contenía agua destilada en lugar del fluído sarcoplásmico.

Tanto la mezcla reacción como los blancos se incubaron por 3 h a 40°C en baño

María. Transcurrido este tiempo de incubación se filtró a través de papel Whatman N°1 para remover el colágeno residual. Al filtrado se le determinó el contenido de hidroxiprolina presente por medio del método de rápido de Bergman y Loxley (1963).

A la vez, se llevó a cabo la determinación de un tiempo cero de reacción, en el cual se formaron las mezclas y blancos e inmediatamente fueron filtradas y se determinó el contenido de hidroxiprolina.

La determinación de hidroxiprolina se llevó a cabo por el método de Bergman-Loxley, (1963), con ligeras modificaciones en el tipo de reactivo utilizado. Soluciones reactivos:

I. Solución oxidante: a) Solución acuosa de Cloramina T al 7% (peso/volumen), la cual se preparó en fresco diariamente, no obstante puede estar activa por varias semanas; b) Buffer acetato-citrato, pH 6.0, para el cual se disolvieron 34.37 g de acetato de sodio anhidro, 37.5 g de citrato de sodio ($2H_2O$), 5.0287 g de acido cítrico anhidro y 385 mL de isopropanol y se completó a un litro de solución con agua (la solución es estable indefinidamente).

Antes de llevar a cabo las determinaciones se mezclan las soluciones descritas en a) y b) en una relación de 1 volumen de la primera por 4 volúmenes de la segunda.

II. Solución reactivo de Ehrlich's: a) Se disolvió el reactivo p-dimetilamina-benzaldehído en ácido perclórico al 60%, en proporción de 2 g de aldheído por 3 mL de ácido (se preparó en fresco aunque puede ser estable por varias semanas si se mantiene en frasco obscuro); b) Isopropanol grado reactivo.

Antes de las determinaciones se mezclaron las soluciones descritas en a) y b) en proporción de 3 volúmenes de la primera por 13 volúmenes de la segunda.

III. Solución estándar de hidroxiprolina: Se preparó una solución de hidroxiprolina a 400 ppm en ácido clorhídrico 0.001 M, para evitar crecimiento de bacterias. Es estable por varios meses almacenada a 4°C y sólo las porciones utilizadas se manejan a temperatura ambiente.

Para la elaboración de la curva estandar de hidroxiprolina se hizo lo siguiente: de la solución de 400 ppm de hidroxiprolina se tomaron alícuotas de 0, 10, 25, 50, 75, 100 y 150 μL y se ajustó a 0.5 mL con agua destilada.

Se usaron tubos de vidrio pyrex con tapón de rosca de 25x250 mm, limpios y secos en los cuales se colocó 0.5 mL de solución a analizar el contenido de hidroxiprolina. Enseguida, se les agregó 1 mL de isopropanol y se mezclaron, se agregó 0.5 mL de solución oxidante, se mezcló y reposó por 4 min a temperatura ambiente.

Posteriormente se agregó 6.5 mL de solución de reactivo de Ehrlich's mezclando perfectamente y los tubos se calentaron a 60°C por 25 min en baño María.

Se enfriaron al chorro de agua por 2-3 min y se diluyó inmediatamente a 25 mL con isopropanol en matraz aforado. A las diluciones se les leyó la absorbancia a 558 nm inmediatamente que se enfriaron, usando como blanco agua destilada, en celdas de cuarzo de 1 cm. La actividad de colagenasa se reportó como μg de hidroxiprolina / min x mg proteína.

Semejante a Tripsina

La determinación de la actividad específica de la enzima semejante a tripsina en el fluído sarcoplásmico del músculo de sardina se realizó mediante una modificación de la técnica establecida por Erickson *et al.* (1983).

Preparación del sustrato. El compuesto de BAPNA (a- N-benzoil-D-L-arginina-p-nitroanilida) presenta problemas de disolución. Por esto se probaron diferentes opciones. El mejor resultado fue disolverlo en dimetilsulfóxido (DMSO) puro diluyéndolo posteriormente a un 2.5 % con buffer Tris-HCl 50.04 mM, pH 8.2. Para que éste reactivo no reprecipite se debe tomar la precaución de no dejar ningún cristal, es decir disolverlo perfectamente en el dimetilsulfóxido antes de la dilución.

Medición de la Actividad. Para la determinación de la actividad enzimática, el medio total de reacción fué de 6 mL, el cual contenía 4 mL de BAPNA 1.050 mM, en DMSO - buffer Tris-HCl, 50.04 mM, pH 8.2; 1 mL de $CaCl_2$ 100.2 mM disuelto en el mismo buffer; 0.5 mL de fluído sarcoplásmico + 0.5 mL de agua destilada. El blanco contenía agua destilada en lugar de fluído sarcoplásmico.

Mezcla reacción y blanco fueron incubadas a 40°C, por 1 h en baño María inmediatamente después de adicionar el sustrato. Transcurrido el tiempo se paró la

reacción adicionando 1 mL de TCA al 10%. Se reposó por 30 min a temperatura ambiente y se filtró a través de papel Whatman N°1.

Al filtrado se le determinó la absorbancia a 410 nm. Esta longitud de onda es a la que absorbe el compuesto de p-nitroanilida, liberado por la acción de la enzima sobre el sustrato. El blanco utilizando como referencia de agua destilada para ver el comportamiento de los sustratos bajo las condiciones de incubación.

También se corrió un tiempo cero, donde las mezclas reacción y el blanco fueron hechas y se les adicionó el TCA inmediatamente ser incubadas; se reposaron por 30 min y se filtraron. A los sobrenadantes se les leyó la absorbancia a 410 nm.

Se determinó la concentración de proteínas presentes en al fluído sarcoplásmico mediante el método de Biuret (1964). La actividad específica se reportó como μg de p-nitroanilida / min x mg proteína.

Se utilizó el coeficiente de extinción 8800 para la p-nitroanilida (Erlanger *et al.*, 1961; Houseman *et al.*, 1984; Simpson *et al.*, 1989); para ello se usó la ecuación: $c = A / b E$.

donde:

c = concentración del producto (p-nitroanilida) en g/L.

A = absorbancia determinada

E = coeficiente de extinción molar

b = longitud de la celda (1 cm)

Semejante a Quimotripsina

Medición de Actividad. La actividad específica se determinó de acuerdo al método de Erickson *et al.*, (1983).

La mezcla reacción tuvo un volumen total de 6 mL y quedaron compuestas de 1 mL de GNPA (Glutaril-L-fenilalanina-p-nitroanilida) 4.98 mM como sustrato y 1 mL de $CaCl_2$ 100.2 mM, ambos disueltos en buffer Tris-HCl, 50.04 mM, pH 8.2 + 3 mL del mismo buffer + 0.5 mL de extracto + 0.5 mL de agua destilada.

El blanco contenía agua destilada en lugar de extracto. Tanto mezclas reacción como blanco se incubaron por 1 h a 40°C en baño María.

Para detener la reacción se adicionaron 1 mL de TCA al 10%. Se reposó por 30 min a temperatura ambiente y se filtró a través de papael Whatman N°1. Al filtrado se le determinó la absorbancia a 410 nm: longitud de onda a la que absorbe el compuesto de p-nitroanilida, liberado por la acción de la enzima sobre el sustrato GNPA, en contra de agua destilada.

También se determinó un tiempo cero para la mezcla reacción y el blanco, se hicieron las mezclas e inmediatamente se les adicionó el TCA. Se reposaron 30 min, se filtró y se leyó la absorbancia del filtrado a 410 nm.

Se determinó la concentración de proteínas presentes en al fluído sarcoplásmico mediante el método de Biuret (1964).

La actividad de la enzima semejante a Quimotripsina se reportó como μg de p-nitroanilida / min x mg proteína. Se utilizó el coeficiente de extinción 8800 para la p-

nitroanilida (Erlanger *et al.*, 1961; Houseman *et al.*, 1984; Simpson *et al.*, 1989); para ello se usó la ecuación c = A / b E.

donde:

c = concentración del producto (p-nitroanilida) en g/L.

A = absorbancia determinada

E = coeficiente de extinción molar

b = longitud de la celda (1 cm)

Carboxipetidasas A y B

La actividad de estas enzimas en el fluído sarcoplásmico se determinó mediante los métodos establecidos por Folk *et al.*, (1960) para Carboxipepetidasa B y Folk y Schirmer (1963) para Carboxipeptidasa A, ambas fueron medidas por espectrofotometría, basándose en la diferencia del espectro del ácido hipúrico en relación a los dos sustratos: hipuril-L-arginina para carboxipeptidasa B e hipuril-L-fenilalanina para carboxipeptidasa A, con la aparición de un pico máximo bien definido a 254 nm.

Coeficiente de extinción de ácido hipúrico. Se determinó el coeficiente de extinción del ácido hipúrico mediante la elaboración de un barrido espectrofotométrico, siguiendo las recomendaciones de Folk *et al.*, (1960).

Se midió la absorbancia de una solución de ácido hipúrico en buffer Tris-HCl 0.025 M, pH 7.65 con 0.1 M de NaCl, en celdas de cuarzo de 1 cm, usando como referencia un blanco que contenía una solución de hipuril-L-arginina 0.001 M en la misma solución buffer. Se observó la aparición de un pico máximo en la región ultravioleta a 254 nm con una diferencia en unidades de absorbancia de 0.36.

El coeficiente de extinción molar se calculó a partir de la ecuación $A = E*b*c$ donde:

E = coeficiente de extinción molar

b = diámetro ó longitud de la celda (1 cm)

c = Concentración de la solución (0.001M)

A = Absorbancia

Calculando la concentración del ácido hipúrico en g/L,

c = 0.2012 g/L.

Con este dato se calculó el coeficiente de extinción:

E = 0.36 / (1cm) (0.2012 g/litro)

E = 1.789 litros g^{-1} cm^{-1}

Preparación de Sustratos. La preparación de los sustratos se llevó a cabo de acuerdo a los métodos de Folk et al., (1960; 1963), para carboxipeptidasa B: Solución de hipuril-L-arginina 0.001 M, en Tris-HCl 0.025 M, pH 7.65 que contenía 0.1 M de NaCl.

Para carboxipeptidasa A: Solución de hipuril-L-fenilalanina 0.0001 M, en Tris-HCl 0.025 M, pH 7.65 que contenía 0.5 M de NaCl. Esta solución tarda para disolverse, por lo que se recomienda cubrirla de la luz y mantenerla refrigerada agitándose lograr la disolución.

Medición de Actividad Enzimática. Se trabajó directamente en el espectrofotómetro siguiendo las recomendaciones de Folk *et al.*, (1960; 1963); con longitud de onda seleccionada a 254 nm, teniendo en los portaceldas una temperatura aproximada de 30-32°C, la cual fué monitoreada durante diferentes intervalos con un termómetro de mercurio.

En celdas de cuarzo de un cm se colocaron 3 mL de solución sustrato en buffer salino y se ajustó la absorbancia a cero. Se introdujo en la celda para muestra de 5 a 20 uL de fluído sarcoplásmico y se ajustó la absorbancia inmediatamente a cero. Se activaron el espectrofotómetro y el graficador a la vez, iniciándose la medición del incremento de la absorbancia a 254 nm por tiempos transcurrido de 30 minutos para cada corrida.

Los datos obtenidos consistieron en barridos de cambio en absorbancia contra tiempo de corrida. La actividad específica se calculó usando el coeficiente de extinción del ácido hipúrico, mediante la fórmula $c = A / b*E*t$.

donde:

c = concentración de ácido hipúrico como producto de hidrólisis.

b = longitud de la celda de cuarzo (1 cm)

E = Coeficiente de extinción del ácido hipúrico.

t = Tiempo de duración del experimento: se utilizó un promedio de 10 min, tomando en cuenta que el comportamiento del gráfico obtenido en el espectro fue lineal dentro de este intervalo.

La actividad específica se calculó como Actividad / min x mg proteína. Se determinó la concentración de proteínas del fluído sarcoplásmico por el método de Biuret (1964).

Catepsina A

La actividad de esta enzima en el fluído sarcoplásmico se determinó siguiendo el método de Iodice *et al.*, (1966) utilizando N-carbobenzoxy-a-L-glutamil-L-fenilalanina como sustrato. Los productos de hidrólisis se determinaron por el método colorimétrico de Rosen (1957).

Preparación del Sustrato. El sustrato utilizado fué N-carbobenzoxy-a-L-glutamil-L-fenilalanina y se preparó a una concentración 76 mM, utilizando como solvente alcohol etílico.

Medición de Actividad. Se siguió la metodología establecida por Iodice *et al.* (1966) con ligeras modificaciones. En tubos de centrífuga de polialómero de 50 mL de capacidad se colocó la mezcla reacción que contenía un volumen total de 1 mL compuesto de 0.1 mL de fluído sarcoplásmico + 0.2 mL de sustrato 76 mM + 0.7 mL de buffer acetatos 57.14 mM, pH 5.0.

Se manejaron dos blancos:

Blanco 1: Contenía fluído sarcoplásmico + buffer acetatos + etanol

Blanco 2: Agua en lugar de sustrato.

Tanto mezcla reacción como blancos se pusieron a incubar en baño María a 37°C por 2 h. Se paró la reacción adicionando 1 mL de TCA al 10%. La mezcla con TCA se calentó en baño María a 55°C por 10 min, se enfrió y centrifugó a 3000 X g por 15 min en una centrífuga refrigerada a 4°C. El sobrenadante se diluyó 1:5 con agua destilada y de aquí se tomaron alícuotas de 0.1 a 0.2 mL para la determinación de ninhidrina. Se utilizó una curva de tirosina como estándar.

Para el tiempo cero se formaron las mezclas reacción y los controles e inmediatamente se adicionó el TCA. Se calentaron y centrifugaron. Los sobrenadantes se guardaron hasta tener las muestras que fueron incubadas y así determinarles ninhidrina a todas juntas (Rosen, 1957).

Para la curva estándar, la tirosina fue preparada en TCA al 10 %. La curva de tirosina empleada para este trabajo se preparó a partir de una solución stock de tirosina 5 mM (0.906 g tirosina/L), la cual se definió como solución **x**. Los aforos de las alícuotas para la curva se llevaron a cabo con TCA al 10%.

- Tomar 100 μL de **x** y aforar a 1 mL = 0.5 μmol/mL (**y**)
- Tomar 500 μL de **y** y aforar a 1 mL = 0.25 μmol/mL (**z**)
- Tomar 500 μL de **z** y aforar a 1 mL = 0.125 μmol/mL
- Tomar 100 μL de **y** y aforar a 1 mL = 0.05 μmol/ mL
- Tomar 50 μL de **y** y aforar a 1 mL = 0.025 μmol/ mL

La determinación de ninhidrina se llevó a cabo siguiendo el método de Rosen (1957). Este se basa en la reacción de los aminoácidos con el compuesto ninhidrina, el

Medición de Actividad. Se siguió la metodología establecida por Iodice *et al.* (1966) con ligeras modificaciones. En tubos de centrífuga de polialómero de 50 mL de capacidad se colocó la mezcla reacción que contenía un volumen total de 1 mL compuesto de 0.1 mL de fluído sarcoplásmico + 0.2 mL de sustrato 76 mM + 0.7 mL de buffer acetatos 57.14 mM, pH 5.0.

Se manejaron dos blancos:

Blanco 1: Contenía fluído sarcoplásmico + buffer acetatos + etanol

Blanco 2: Agua en lugar de sustrato.

Tanto mezcla reacción como blancos se pusieron a incubar en baño María a 37°C por 2 h. Se paró la reacción adicionando 1 mL de TCA al 10%. La mezcla con TCA se calentó en baño María a 55°C por 10 min, se enfrió y centrifugó a 3000 X g por 15 min en una centrífuga refrigerada a 4°C. El sobrenadante se diluyó 1:5 con agua destilada y de aquí se tomaron alícuotas de 0.1 a 0.2 mL para la determinación de ninhidrina. Se utilizó una curva de tirosina como estándar.

Para el tiempo cero se formaron las mezclas reacción y los controles e inmediatamente se adicionó el TCA. Se calentaron y centrifugaron. Los sobrenadantes se guardaron hasta tener las muestras que fueron incubadas y así determinarles ninhidrina a todas juntas (Rosen, 1957).

Para la curva estándar, la tirosina fue preparada en TCA al 10 %. La curva de tirosina empleada para este trabajo se preparó a partir de una solución stock de tirosina 5 mM (0.906 g tirosina/L), la cual se definió como solución **x**. Los aforos de las alícuotas para la curva se llevaron a cabo con TCA al 10%.

- Tomar 100 μL de **x** y aforar a 1 mL = 0.5 μmol/mL (**y**)
- Tomar 500 μL de **y** y aforar a 1 mL = 0.25 μmol/mL (**z**)
- Tomar 500 μL de **z** y aforar a 1 mL = 0.125 μmol/mL
- Tomar 100 μL de **y** y aforar a 1 mL = 0.05 μmol/ mL
- Tomar 50 μL de **y** y aforar a 1 mL = 0.025 μmol/ mL

La determinación de ninhidrina se llevó a cabo siguiendo el método de Rosen (1957). Este se basa en la reacción de los aminoácidos con el compuesto ninhidrina, el

Medición de Actividad. Se siguió la metodología establecida por Iodice *et al.* (1966) con ligeras modificaciones. En tubos de centrífuga de polialómero de 50 mL de capacidad se colocó la mezcla reacción que contenía un volumen total de 1 mL compuesto de 0.1 mL de fluído sarcoplásmico + 0.2 mL de sustrato 76 mM + 0.7 mL de buffer acetatos 57.14 mM, pH 5.0.

Se manejaron dos blancos:

Blanco 1: Contenía fluído sarcoplásmico + buffer acetatos + etanol

Blanco 2: Agua en lugar de sustrato.

Tanto mezcla reacción como blancos se pusieron a incubar en baño María a 37°C por 2 h. Se paró la reacción adicionando 1 mL de TCA al 10%. La mezcla con TCA se calentó en baño María a 55°C por 10 min, se enfrió y centrifugó a 3000 X g por 15 min en una centrífuga refrigerada a 4°C. El sobrenadante se diluyó 1:5 con agua destilada y de aquí se tomaron alícuotas de 0.1 a 0.2 mL para la determinación de ninhidrina. Se utilizó una curva de tirosina como estándar.

Para el tiempo cero se formaron las mezclas reacción y los controles e inmediatamente se adicionó el TCA. Se calentaron y centrifugaron. Los sobrenadantes se guardaron hasta tener las muestras que fueron incubadas y así determinarles ninhidrina a todas juntas (Rosen, 1957).

Para la curva estándar, la tirosina fue preparada en TCA al 10 %. La curva de tirosina empleada para este trabajo se preparó a partir de una solución stock de tirosina 5 mM (0.906 g tirosina/L), la cual se definió como solución **x**. Los aforos de las alícuotas para la curva se llevaron a cabo con TCA al 10%.

- Tomar 100 μL de **x** y aforar a 1 mL = 0.5 μmol/mL (**y**)
- Tomar 500 μL de **y** y aforar a 1 mL = 0.25 μmol/mL (**z**)
- Tomar 500 μL de **z** y aforar a 1 mL = 0.125 μmol/mL
- Tomar 100 μL de **y** y aforar a 1 mL = 0.05 μmol/ mL
- Tomar 50 μL de **y** y aforar a 1 mL = 0.025 μmol/ mL

La determinación de ninhidrina se llevó a cabo siguiendo el método de Rosen (1957). Este se basa en la reacción de los aminoácidos con el compuesto ninhidrina, el

cual es reducido a pH 5.0. Se recomienda que la solución ó soluciones de ninhidrina se almacenen bajo nitrógeno, o sean manejadas en fresco, ya que es inestable al aire. En este trabajo fué manejada en fresco diariamente.

Reactivos:

1) Solución stock de NaCN 0.01M (490 mg/L)

2) Buffer acetatos: 2700 g de Acetato de sodio (3 H_2O) + 2 litros de agua + 500 mL de Ac. acético glacial y llevar a 7.5 litros con agua destilada. El pH dede quedar entre 5.0 y 5.2.

3) Solución cianida-acetatos: NaCN 0.0002 M en buffer de acetatos: 20 mL de la solución stock de NaCN y se afora a 1 litro con la solución descrita en 2).

4) Solución de Ninhidrina al 3%, en etilenglicol monometil eter (metil Cellosolve).

5) Solución diluyente: Alcohol isopropílico-agua, 1:1.

Procedimiento para determinación de ninhidrina: en tubos de vidrio pyrex de 25x250 mm con tapón de rosca, se colocaron un 0.1 mL de muestra a analizar conteniendo los productos de hidrólisis que reaccionan con la ninhidrina (mezclas con TCA y soluciones de la curva estándar de tirosina) + 0.9 mL de TCA al 10 %. Se agregó 0.5 mL de solución cianida-acetato y 0.5 mL de solución de ninhidrina. Se calentó en baño de agua a 98-100°C por 15 min hasta el desarrollo máximo de color (rojo obscuro), el cual se forma a los 10-12 minutos. Se sacaron las muestras y se agregó inmediatamente 5 mL del diluyente. Se agitaron fuertemente, se enfriaron a temperatura ambiente y se les leyó su absorbancia a 570 nm. Los resultados son obtenidos de la cuantificación el la curva.

Catepsina C

La actividad de esta enzima en el fluído sarcoplásmico fué determinada mediante el método de Golbarg y Rutenberg (1958).

Preparación del sustrato. Estuvo compuesta de una solución de L-leucil-ß-naftilamida- HCl, 1.37 M, la cual se mezcló con un volumen igual de buffer de fosfatos 0.2 M, pH 7.0 para quedar una solución de pH 7.1. El volumen a preparar dependió de la cantidad necesaria para el análisis. Esta solución es estable a temperatura ambiente por 30 días.

Medición de Actividad. Los reactivos utilizados fueron: ácido tricloroacético al 40%, el cual se preparó en fresco; nitrito de sodio al 0.1 %; sulfamato de amonio 0.5 % y N-(1-naftil) etilenediamino-HCl en etanol al 95 % (0.5 mg/mL).

Las mezclas reacción estuvieron formadas de 50 μL de fluido sarcoplásmico + 950 μL de buffer fosfatos 0.2 M, pH 7.0 y 1 mL de solución sustrato.

Se prepararon dos blancos:

Blanco 1: 1 mL de solución sustrato + 1 mL de agua

Blanco 2: 1 mL de extracto y 1 mL de buffer fosfatos 0.2 M, pH 7.0.

Tanto la mezcla reacción como los blancos se pusieron a incubar en baño María a 37°C por 2 horas. Se paró la reacción con 1 mL de TCA al 40%. Las mezclas fueron centrifugadas a baja velocidad (3000 X g). A los sobrenadantes se le determinó el contenido de ß-naftilamina.

El contenido de ß-naftilamina se determinó de la siguiente manera: se usaron 250 μL de extractos de TCA y se llevó a 1 mL con TCA al 40%. A los tres minutos se agregó 1 mL de nitrito de sodio: el exceso de nitrito de sodio se descompone adicionando 1 mL de sulfamato de amonio. La reacción se completó a los 2 minutos. Se agregó a cada tubo 2 mL de N- (1-naftil) etilenediamino-HCl, para dar un complejo de color azul oscuro a pH de 1.2. Se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente y luego se midió su absorbancia a 560 nm.

La lectura colorimétrica se convirtió a μg de naftilamina preparando una curva de calibración de ß-naftilamina. El compuesto ß-naftilamina fué disuelto en TCA al 40%. Para la curva se preparó una solución de ß-naftilamina de 1 mg/mL de la cual se tomó

un mL y se aforó a 10 mL con TCA al 40% para dar una solución de 0.1 mg/mL; se tomaron las alícuotas de 0, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125 y 150 μl se completaron a un volumen total de 1 mL con TCA al 40%.

Catepsina D

La actividad de catepsina D en el fluído sarcoplásmico se determinó de acuerdo a la técnica de Makinodan *et al.* (1982), con ligeras modificaciones. Se utilizó hemoglobina como sustrato, que fué desnaturalizada con el buffer reacción de formatos 1.0 M, pH 3.0.

Preparación del sustrato. Se preparó hemoglobina al 2% (peso/volumen). La cantidad requerida de hemoglobina se disolvió en agua y se ajustó el pH con el buffer formatos, 1.0 M pH 3.0. Se preparó 25 mL de hemoglobina al 2%, para lo cual se pesaron 0.5 g de hemoglobina y se disolvieron en 12.5 mL de agua destilada. Para ajustar el pH a 3.18 se agregaron 12.5 mL de buffer de formatos.

Medición de Actividad. Para medir la actividad, las mezclas reacción contenían 1.5 mL de buffer de formato 1.0 M, pH 3.0 + 0.5 mL de sustrato, pH 3.18 + 0.1 mL de fluído sarcoplásmico diluído 1:5 con agua destilada.

Se manejaron dos blancos:

Blanco 1. Contenía 1.5 mL de buffer + 0.1 mL de fluído sarcoplásmico sin diluir + 0.4 mL de agua destilada.

Blanco 2. Contenía 1.5 mL de buffer + 0.5 mL de sustrato de Hb a pH 3.18 + 0.4 mL de agua destilada.

Las mezclas reacción, los blancos y una cantidad de solución de hemoglobina a pH 3.18, se incubaron a 37°C en baño María por 1 h. La reacción se paró adicionando a las mezclas reacción 2.5 mL de TCA al 5% (peso/volumen).

Al blanco 1 se le adicionó 2.5 mL de TCA al 5% + 0.5 mL de hemoglobina a pH 3.18 preincubada y al blanco 2 se le adicionó 2.5 mL de TCA al 5% + 0.5 ml de fluído sarcoplásmico. Se dejaron reposar a temperatura ambiente por 45 minutos y se filtraron a través de papel Whatman No.1. A los sobrenadantes se les determinó su contenido de tirosina por el método de Lowry-Folín (1951) usando 1 mL de éstos y una curva estándar de tirosina.

Se corrió un tiempo cero en el cual se hicieron las mezclas reacción y los controles e inmediatamente se le agregó el TCA. Los filtrados de este tiempo se guardaron para determinarles el contenido de tirosina por el método de Lowry-Folín (1951), junto con los filtrados de las reacciones incubadas mencionadas anteriormente.

La curva de tirosina utilizada fué preparada a partir de una solución madre de tirosina en TCA al 5% a una concentración de 1 mg/mL, de la cual se tomó 1 mL y se aforó a 50 mL con TCA al 5%. De la solución stock se tomaron las siguientes alícuotas: 0, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 μL. El volumen final se llevó a 0.5 mL con agua destilada cuando fue necesario.

La actividad de la enzima se expresó como μg de tirosina liberados del sustrato por minuto y la actividad específica, como actividad por mg de proteína.

Catepsina B

Para determinar la actividad de esta enzima en el fluído sarcoplásmico se utilizaron varias técnicas siguiendo las indicaciones de Sherekar *et al.* (1988).

Para la determinación de los productos finales de la reacción se hizo una combinación de dos técnicas a fin de elaborar el reactivo de color. Se mezcló el reactivo de Fast-Garnet (Housemam *et al.*, 1984) con el reactivo de Mersalil-Brij (Barret, 1976).

Preparación del Reactivo Mersalil-Brij. La preparación de este reactivo se llevó de acuerdo al método de Barret (1984), de la siguiente manera: se mezcló 1 g de ácido mersalílico (o-[(3-[Hidroximercuri]-2-metoxipropil)carbamoil] ácido fenoxiacético; ácido salirgánico) con 24.7 mL de NaOH 0.5M agitando sin interrumpir. Se adicionaron 3.8269 g de EDTA disódico llevándose el volumen a 185.2 mL con agua destilada. Una vez disuelto el EDTA se ajustó el pH a 4.0 con HCl 1 M. Posteriormente se le agregaron 205.75 mL de solución acuosa de Brij al 4% (volumen/volumen) para dar un volumen total de aproximadamente 390 mL. El reactivo se almacenó en frasco ambar a temperatura ambiente.

Preparación del Reactivo de Color. Se preparó una solución a una 0.25 mg/mL de sal Fast-Garnet GBC (2-Metil-4-[(2-metilfelnil)azo]benzenodiazonium) en reactivo Mersalil-Brij.

Preparación del Sustrato. El sustrato utilizado para determinar la actividad de esta enzima fué Benzoil-D-L-arginina-2-naftilamida, a una concentración 4 mM (40 mg/mL) disuelto en dimetilsulfóxido puro.

Medición de Actividad. Las mezclas reacción comprendieron un volumen de 1 mL, el cual contuvo 50 μL de fluído sarcoplásmico + 700 μL de buffer de fosfatos 0.1 M, pH 6.0 + 100 μL de EDTA 1.33 mM + 100 μL de cisteína 1.33 mM: los dos últimos en el mismo buffer de fosfatos.

Se manejaron dos blancos:

Blanco 1. Se preparó igual que las mezclas reacción excepto que contenía buffer en lugar de fluído sarcoplásmico.

Blanco 2. Se preparó igual que las mezclas reacción excepto que contenía buffer en lugar del sustrato Benzoil-D-L-arginina-2-naftilamida.

Ambos, mezclas reacción y blancos, se preincubaron por 5 min a 40°C en baño de agua para activar la enzima. Ya preincubadas, a las mezclas reacción se le adicionaron 50 μL de sustrato y se siguió incubando a 40°C por 30 minutos. Para terminar la reacción se agregó 1 mL del Reactivo de Color.

Se centrifugaron las muestras a baja velocidad (3000 X g) y luego se filtraron a través de papel Whatman No. 4 y a los sobrenadantes se les determinó su absorbancia a 520 nm.

Se corrió una curva estándar de ß-naftilamina disuelta en dimetilsulfóxido a una concentración 1 mg/mL. De esta solución se tomó 1 mL y se aforó a 10 mL con buffer de fosfatos (solución 0.1 mg/mL). Se tomaron alícuotas de 0, 10, 20, 40, 80, 100, 150 y 200 μL, se aforaron a 1 mL con buffer de fosfatos 0.1 M, pH 6.0 y se les adicionó 1 mL de Reactivo de Color descrito anteriormente.

Se llevó a cabo la determinación a un tiempo cero, para el que se formaron las mezclas reacción y blancos e inmediatamente se les adicionó el Reactivo de Color y se midió su absorbancia a 520 nm, los resultados fueron obtenidos por cuantificación en la curva.

Estudios de Inhibición y Activación

Se utilizaron seis diferentes compuestos como inhibidores y activadores: EDTA disódico, $CuSO_4$, Cisteína, Iodoacetamida, TLCK (N-a-tosil-L-lisil-clorometil cetona) y PMSF (Fenil metil sulfonil fluoruro). Estos compuetos se adicionaron durante la reacción para determinar su efecto sobre la hidrólisis del sustrato por las enzimas presentes en el fluído sarcoplásmico.

A continuación se presentan las mezclas reacción, los blancos y controles de todas las enzimas determinadas. Las reacciones para determinar la actividad enzimática se llevaron a cabo según los procedimientos descritos anteriormente.

Se manejaron controles para ver la actividad de la enzima sin ninguno de los compuestos inhibidores, éstos contenían todos los reactivos excepto las soluciones inhibidoras.

Colagenasa

Los compuestos de EDTA, $CuSO_4$, cisteína y iodoacetamida, se disolvieron en buffer Tris-HCl a una concentración de 1.275 mM, pH 7.5; de esta solución se tomaron 4 mL para las reacciones, las cuales se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología anteriormente citada para esta enzima.

El volumen total del medio de reacción fue de 5.1 mL y se formó de 25 mg de colágeno utilizado como sustrato + 1 mL de $CaCl_2$ 1.785 mM en buffer Tris-HCl 49.98 mM, pH 7.5 + 4 mL de solución inhibidora (EDTA, $CuSO_4$, cisteína o iodoacetamida) en el mismo buffer + 0.1 mL de fluído sarcoplásmico.

Se manejaron dos blancos:

Blanco 1: no contenía colágeno

Blanco 2: contenía agua destilada en lugar de fluído sarcoplásmico.

Al mismo tiempo se determinó un control el cual contenía sólo buffer reacción sin ninguno de los compuestos, preparándose conjuntamente sus dos blancos.

El tiempo cero para estos compuestos se determinó haciendo las mezclas para cada uno y para el control, parando inmediatamente la reacción al filtrar para separar el colágeno.

Los compuestos TLCK (10.2 mM en buffer Tris-HCl 49.98 mM, pH 7.5) y PMSF (10.2 mM que fue previamente disuelto en DMSO puro y luego se diluyó hasta un 10%, con buffer Tris-HCl 49.98 mM, pH 7.5), se pusieron a preincubar en baño de hielo con el fluído sarcoplásmico, el TLCK por 2 h y el PMSF por 20 minutos.

La manera de proceder fue la siguiente: Se mezclaron 0.4 mL de fluído sarcoplásmico + 2.0 mL de solución inhibidora (TLCK o PMSF) y de aquí se tomaron 0.6 mL para determinar la actividad enzimática residual.

La mezcla reacción estuvo compuesta de: 25 mg de colágeno + 3.5 mL de buffer Tris-HCl, 49.98 mM, pH 7.5 + 0.6 mL de mezcla preincubada en baño de hielo + 1.0 mL de $CaCl_2$ 1.785 mM, pH 7.5.

Se manejaron dos blancos:

Blanco 1: No contenía colágeno

Blanco 2: No contenía mezcla preincubada.

También se determinó un control, el cual no contenía solución inhibidora; el fluído sarcoplásmico que se manejó para este control fue puro y se mantuvo en hielo durante el mismo tiempo que el fluído sarcoplásmico que contenía inhibidor.

Semejante a Tripsina

Para EDTA, $CuSO_4$, iodoacetamida y cisteína, las mezclas reacción quedaron: 1 mL de $CaCl_2$ 100.2 mM + 4 mL de solución sustrato (1.050 mM) con inhibidor/activador (1.5 mM) en buffer Tris-HCl 50.04 mM, pH 8.2 + 0.5 mL de fluído sarcoplásmico + 0.5 mL de agua destilada.

El blanco contenía buffer Tris-HCl, 50.04 mM, pH 8.2, en lugar del fluído sarcoplásmico.

El control no contenía solución inhibidora, sólo buffer Tris-HCl, 50.04 mM, pH 8.2. El tiempo cero se determinó haciendo las mezclas e inmediatamente se paró la reacción.

Los compuestos TLCK y PMSF se preicubaron con el fluído sarcoplásmico en baño de hielo por 2 y 1 h respectivamente. Se mezclaron 1.5 mL de solución madre de TLCK (6 mM) y PMSF (6 mM, disuelto en DMSO puro y diluyéndose posteriormente al 10% con buffer Tris-HCl 50.04 mM, pH 8.2) con 1.5 mL de fluído sarcoplásmico; de aquí se tomaron 2 mL para determinar la actividad enzimática residual.

La mezcla reacción quedó constituída por 2 mL de mezcla inhibidor-fluído sarcoplásmico preincubado + 3 mL de sustrato BAPNA en DMSO (1.4 mM) + 1 mL de $CaCl_2$ disuelto en buffer Tris-HCl 50.04 mM, pH 8.2.

En el blanco se sustituyó el fluído sarcoplásmico por agua.

A la vez se corrió un control conteniendo: 1 mL de $CaCl_2$ 100.2 mM + 4 mL de solución sustrato (1.050 mM) en buffer Tris-HCl, 50.04 mM, pH 8.2 + 0.5 mL de fluído sarcoplásmico sin preincubar + 0.5 mL de agua destilada.

Semejante a Quimotripsina

Para los compuestos EDTA, $CuSO_4$, iodoacetamida y cisteína las mezclas reacción quedaron constituidas de la siguiente manera: 1.5 mL de buffer Tris-HCl 50.04 mM, pH 8.2 + 0.5 mL de sustrato (4.98 mM) con inhibidor/activador (6 mM) en buffer Tris-HCl 50.04 mM, pH 8.2 + 0.5 mL de $CaCl_2$ 100.2 mM en el mismo buffer + 0.5 mL de fluído sarcoplásmico.

El blanco contenía agua en lugar de fluído sarcoplásmico. El control no contenía inhibidor/activador. De igual manera que para semejante a tripsina se corrió un tiempo cero.

Los compuestos TLCK y PMSF se preicubaron con el fluído sarcoplásmico en baño de hielo, por 2 y 1 h respectivamente. Se mezclaron 1.5 mL de soluciones de TLCK (6 mM) y PMSF (6 mM, disuelto en DMSO puro, diluyéndose posteriormente al 10% con buffer Tris-HCl 50.04 mM, pH 8.2), con 1.5 mL de fluído sarcoplásmico y de aquí se tomaron 2 mL para determinar la actividad enzimática residual.

La mezcla de reacción quedó constituida de: 2 mL de mezcla inhibidor-fluído sarcoplásmico preincubado + 3 mL de sustrato (1.4 mM) + 1 mL de $CaCl_2$.

En el blanco se sustituyó el fluído sarcoplásmico por agua. A la vez, se corrió un control que contenía: 1 mL de $CaCl_2$ 100.2 mM + 4 mL de solución sustrato (1.050 mM) en buffer Tris-HCl 50.04 mM, pH 8.2 + 0.5 mL de fluído sarcoplásmico + 0.5 ml de agua destilada.

En las actividades semejantes a tripsina y quimotripsina, cuando se utilizaron los compuestos TLCK y PMSF se determinó un tiempo cero, en el cual inmediatamente de

hacer la mezcla para preincubación se tomaron las alícuotas correspondientes y se determinaron las reacciones de actividad, incubando en baño de agua directamente.

Catepsina A

Los compuestos EDTA, $CuSO_4$, iodoacetamida y cisteína se prepararon en el buffer de acetatos. Las mezclas estuvieron formadas por: 200 μL de sustrato (76 mM) + 100 μL fluído sarcoplásmico + 700 μL de soluciones inhibidoras (1.43 mM) en el buffer de acetatos.

Los blancos quedaron:

Blanco 1: 200 μL de etanol + 100 μL de fluído sarcoplásmico + 700 μL de buffer de acetatos

Blanco 2: preparado de la misma manera pero sustituyendo etanol por agua.

Se corrió a la vez un control el cual no contenía ninguno de los compuestos inhibidores/activadores.

Los compuestos TLCK y PMSF a una concentración 1.43 mM, se prepararon en el buffer de acetatos previamente el PMSF se disolvió en DMSO puro, diluyéndose posteriormente al 10% con buffer de acetatos.

Se preincubó en baño de hielo 1 mL de fluído sarcoplásmico + 7 mL de solución inhibidora (1.43 mM), (TLCK por 2 h y PMSF por 1 h) y de aquí se tomaron 0.8 mL para determinar la actividad residual.

Las mezclas reacción contuvieron 0.2 mL de sustrato.

Los blancos quedaron:

Blanco 1: 0.2 mL de etanol + 0.8 mL de mezcla preincubada con inhibidor.

Blanco 2: 0.2 mL de agua en lugar de etanol.

Además se manejó un control que no contenía TLCK o PMSF el fluído sarcoplásmico usado para este control se mantuvo en baño de hielo hasta su utilización.

Para el tiempo cero se tomaron las alícuotas inmediatamente después de que se hizo la mezcla preincubada y se llevaron a cabo las determinaciones de las reacciones de actividad, llevadas a cabo de la manera anteriormente citada.

Carboxipeptidasas A y B

Los compuestos EDTA, $CuSO_4$, iodoacetamida y cisteína se prepararon junto con las soluciones sustratos y se llevaron a cabo los experimentos siguiendo el procedimiento descrito en la determinación de actividad específica.

La concentración de todas las soluciones de los compuestos fue de 1.033 mM en la solución sustrato y de aquí se tomaron 3 mL para las reacciones.

En ambos portaceldas se colocaron 3 mL de solución sustrato con inhibidor; el que se tomó como blanco no contenía fluído sarcoplásmico.

Los compuestos de TLCK y PMSF se preincubaron en baño de hielo con el fluído sarcoplásmico; el TLCK por 2 h y PMSF por 1 h. El PMSF fue previamente disuelto en DMSO puro, diluyéndose posteriormente al 10% con buffer Tris-HCl, pH 7.65.

Se pusieron a preincubar en baño de hielo 2.5 mL de soluciones madre de TLCK y PMSF 6.02 mM con 100 μL de fluído sarcoplásmico y de esta mezcla se tomaron a diferentes tiempos de incubación 520 μL para las reacciones de actividad residual.

En el portaceldas que se tomó como blanco se agregaron 2.5 mL de solución sustrato + 520 μL de solución inhibidora y en la celda de la muestra se colocaron 2.5 mL de sustrato + 520 μL de mezcla preincubada con el inhibidor.

Catepsina D

Para determinar el efecto de los compuestos EDTA, $CuSO_4$, iodoacetamida y cisteína, se disolvieron éstos en el buffer reacción: usado en la determinación de actividad específica citada anteriormente, a una concentración de 1.66 mM, de la cual se tomaron 1.5 mL para la reacción.

Se siguió la metodología mencionada anteriormente para esta enzima. El tiempo cero se determinó parando la reacción con TCA al 5% justo al hacer las mezclas y blancos. El control no contenía soluciones inhibidoras/activadoras.

Los compuestos TLCK y PMSF se prepararon a una concentración 1.06 mM. El PMSF fue previamente disuelto en DMSO puro y luego se diluyó al 10% con buffer de formatos. Ambos compuestos se preincubaron con el fluído sarcoplásmico en baño de hielo.

Se mezclaron 6.0 mL de solución inhibidora + 0.4 mL de fluído sarcoplásmico, de aquí se tomaron 1.6 mL para llevar a cabo las reacciones específicas de actividad residual. Las mezclas quedaron constituídas por 1.6 mL de mezcla inhibidora + 0.4 mL de agua destilada + 0.5 mL de sustrato.

Los blancos quedaron:

Blanco 1: 1.6 mL de mezcla preincubada + 0.4 mL de agua destilada; después de la incubación a 37 °C se le agregó 0.5 mL de sustrato.

Blanco 2: 1.5 mL de solución inhibidora + 0.4 mL de agua destilada + 0.5 mL de sustrato; después de incubación a 37°C se le agregó 0.1 mL de fluído sarcoplásmico.

Se determinó un tiempo cero, en el cual se formaron mezclas de solución inhibidora y fluído sarcoplásmico e inmediatamente se formaron las mezclas reacción y blancos llevándose a cabo las reacciones de actividad, siguiendo la metodología citada anteriormente.

Catepsina C

Para evaluar el efecto de los compuestos EDTA, $CuSO_4$, iodoacetamida y cisteína, éstos se prepararon a una concentración de 0.21 mM en buffer fosfatos 0.2 M, pH 7.0.

Las mezclas reacción quedaron: 1 mL de sustrato + 950 μL de solución inhibidora/activadora + 50 μl de fluído sarcoplásmico. Los blancos quedaron:

Blanco 1: 1 mL de sustrato + 50 μL de buffer reacción + 950 μL de solución inhibidora/activadora.

Blanco 2: 1 mL de buffer reacción + 950 μL de solución inhibidora/activadora + 50 μL de fluído sarcoplásmico.

Para el tiempo cero se trataron de la misma manera que para actividad específica, incluída la determinación.

Los compuestos TLCK y PMSF se preincubaron con el fluído sarcoplásmico en baño de hielo, por 2 y 1 h respectivamente. El PMSF fue previamente disuelto en DMSO puro, diluyéndose posteriormente al 10% con buffer fosfatos 0.2 M, pH 7.0.

Se preincubaron 6.65 mL de solución inhibidora TLCK ó PMSF (2.10 mM) + 350 μL de fluído sarcoplásmico y de aquí se tomaron 1 mL para cada determinación de actividad enzimática residual. Las mezclas reacción quedaron: 1 mL de sustrato + 1 mL de mezcla de solución inhibidora con fluído sarcoplásmico preincubado en hielo.

Los blancos quedaron:

Blanco 1: 1 mL de sustrato + 950 μL de solución inhibidora + 50 μL de buffer reacción.

Blanco 2: 1 mL de buffer reacción + 1 mL de mezcla inhibidora.

Para los tiempos cero, se tomó 1 mL de la mezcla preincubada inmediatamente después de agregar el fluído sarcoplásmico y se adicionaron a las diferentes mezclas reacción y blancos determinándose posteriormente la actividad específica por 2 h a 37°C, siguiendo la metodología mencionada anteriormente para esta enzima.

Catepsina B

Para los compuestos $CuSO_4$ (1.43 mM) y Iodoacetamida (1.43 mM), en el buffer reacción (fosfatos 111.11 mM, pH 6.0).

Las mezclas reacción quedaron: se mezclaron 200 μL de cisteína + 200 μL de EDTA + 100 μL de sustrato + 1400 μL de $CuSO_4$ ó Iodoacetamida + 100 μL de fluído sarcoplásmico. Los blancos quedaron:

Blanco 1: 200 μL de cisteína + 200 μL de EDTA + 100 μL de sustrato + 1400 μL de $CuSO_4$ ó Iodoacetamida + 100 μL de buffer reacción.

Blanco 2: en lugar de sustrato 100 μL de fluído sarcoplásmico.

Para los compuestos Cisteína y EDTA, quedaron: Blanco 1) 200 μL de EDTA ó Cisteína + 100 μL de sustrato + 1700 μL de buffer reacción; Blanco 2) 200 μL de EDTA ó Cisteína + 100 μL de fluído sarcoplásmico + 1700 μl de buffer reacción. Para las muestras se mezclaron 200 μL de cisteína ó EDTA + 100 μL de sustrato + 1600 μL de buffer reacción + 100 μL de fluído sarcoplásmico.

La técnica utilizada para determinar la actividad de esta enzima requiere de los compuestos EDTA y cisteína para activarla, y como estos compuestos están incluídos en este trabajo dentro de los inhibidores/activadores, se determinó el efecto sin tener ninguno de los dos compuestos en la reacción quedando de la siguiente manera:

Blanco 1: 100 μl de sustrato + 1900 μl de buffer reacción.

Blanco 2: 100 μl de fluído sarcoplásmico + 1900 μl de buffer reacción.

Muestras: 1800 μl de buffer reacción + 100 μl de sustrato + 100 μl de fluído sarcoplásmico.

También se determinó el efecto que tiene cada uno de los compuestos (EDTA y cisteína) por separado. Se manejó sólo con EDTA para determinar efecto de cisteína y sólo con cisteína para el efecto de EDTA.

Los compuestos TLCK y PMSF , se preincubaron con el fluído sarcoplásmico en baño de hielo, por 2 y 1 h respectivamente. El PMSF fue previamente disuelto en DMSO puro, diluyéndose posteriormente al 10% con buffer fosfatos 0.2 M, pH 7.0.

Se pusieron a preincubar en baño de hielo 17.1 μL de solución inhibidora TLCK (1.11 mM) ó PMSF (1.11 mM) + 0.9 μL de fluído sarcoplásmico y de aquí se tomaron 950 μL de esta mezcla para determinar actividad residual.

Para las mezclas reacción los blancos quedaron:

Blanco 1: se colocaron 900 μL de solución inhibidora y 50 μL de buffer reacción.

Blanco 2: se tomaron 950 μL de la mezcla con inhibidor/activador.

El control no contenía solución inhibidora/activadora

RESULTADOS Y DISCUSION

Estabilidad del Fluído Sarcoplásmico

El incremento en el porcentaje de nitrógeno no proteico (NNP) ó material soluble en ácido tricloroacético en el fluído sarcoplásmico del músculo de sardina (Figura 3), no fué estadísticamente significativo diferente ($p > 0.05$), resultando en un valor promedio de 33.94% durante el período de almacenamiento a 0°C.

Lo anterior sugiere que las enzimas del fluído sarcoplásmico no manifestaron actividad sobre las proteínas presentes en el mismo. Resultados similares fueron obtenidos por Erickson *et al.* (1983), para fluído sarcoplásmico en bacalao (*Gadus macrocephalus*), donde el extracto de ácido tricloroacético del sobrenadante no sufrió cambios dentro de los primeros 4 días almacenado a 4°C.

La actividad enzimática en el fluído sarcoplásmico almacenado a 0 y 4°C (Figura 4), disminuyó drásticamente a las 24 h mostrando una reducción promedio para ambas temperaturas del 60.83% y 47.23% respectivamente.

A las 48 h, la actividad en el fluído almacenado a 4°C fué mínima. Sin embargo, en el almacenado a 0°C, todavía se presentó una actividad detectable equivalente al 23.34% de la actividad inicial. La actividad enzimática se perdió a las 72 h, observándose turbidez y precipitación el el flído. No existe información acerca de la

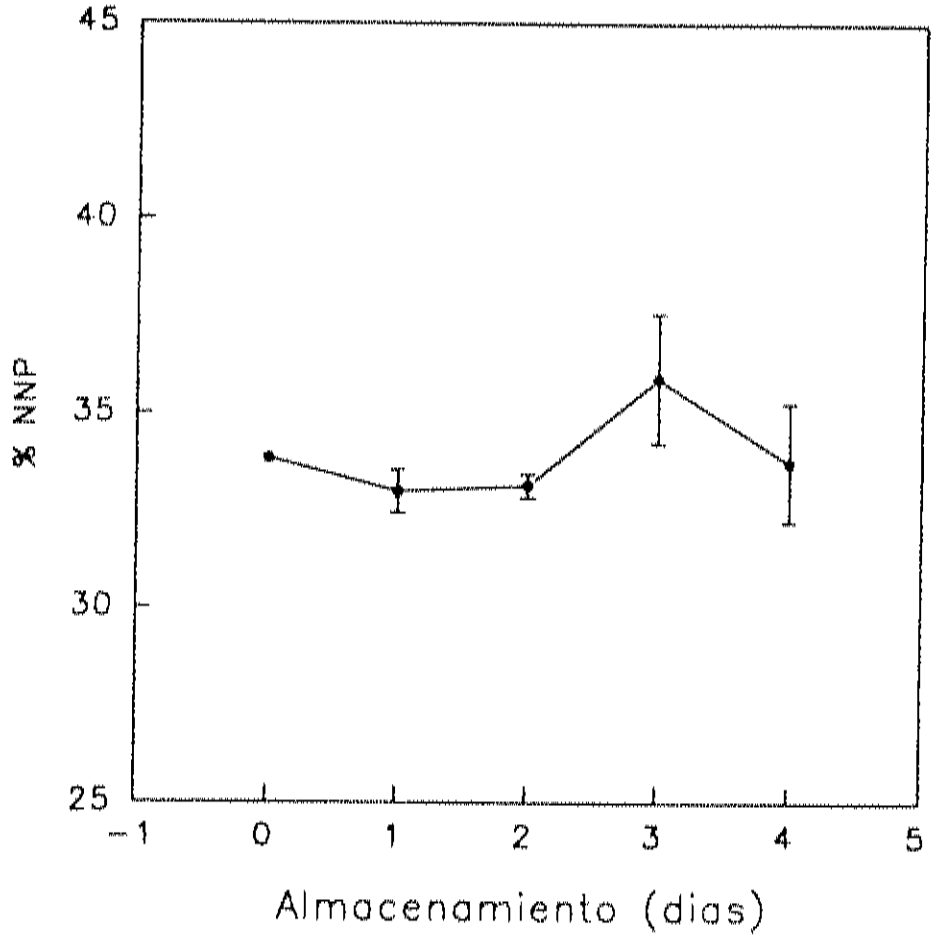

Fig. 3. Determinación de nitrógeno no proteico, en el fluído sarcoplásmico del músculo de sardina. Datos obtenidos en el extracto de acido tricloroacético.

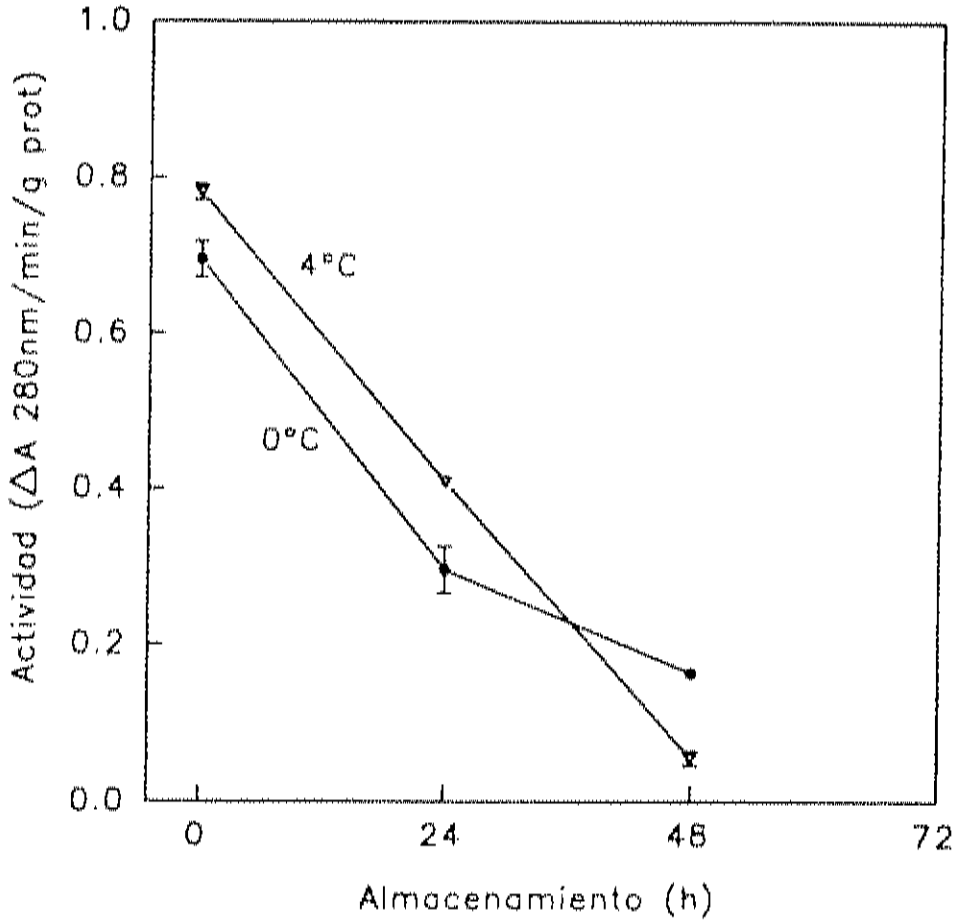

Fig. 4. Estabilidad de la actividad enzimática en el fluído sarcoplásmico almacenado a 0°C y 4°C por 4 días. Datos obtenidos de la hidrólisis de proteínas miofibrilares a pH 7.5 y 38°C.

estabilidad de actividad enzimática en extractos crudos, que pudieran sugerir su manejo durante el experimento.

Con los resultados obtenidos en este trabajo se determinó que la estabilidad de la actividad enzimática en el fluído decrece rápidamente por lo que deberá utilizarse el mismo día de su extracción.

La Figura 5 muestra el comportamiento en la estabilidad de la actividad enzimática presente en el fluído almacenado a 0°C, monitoreada durante las primeras cuatro horas posteriores a su extracción. La actividad enzimática sobre las proteínas miofibrilares se mantuvo constante ($p > 0.05$) por un período de 30 min, para posteriormente disminuir significativamente ($p < 0.05$) mostrando una actividad equivalente al 97.3% y del 96% de la actividad inicial a los 60 min y 120 min respectivamente. A los 180 min la actividad residual fue del 73.3%. No obstante esta última actividad se consideró elevada. Se estableció que el fluído deberá ser utilizado por un período no mayor de dos horas en la determinación de la estabilidad de la actividad enzimática.

No existe información acerca del comportamiento de la actividad enzimática de fluídos sarcoplásmicos, para su manejo y almacenamiento durante el desarrollo del experimento.

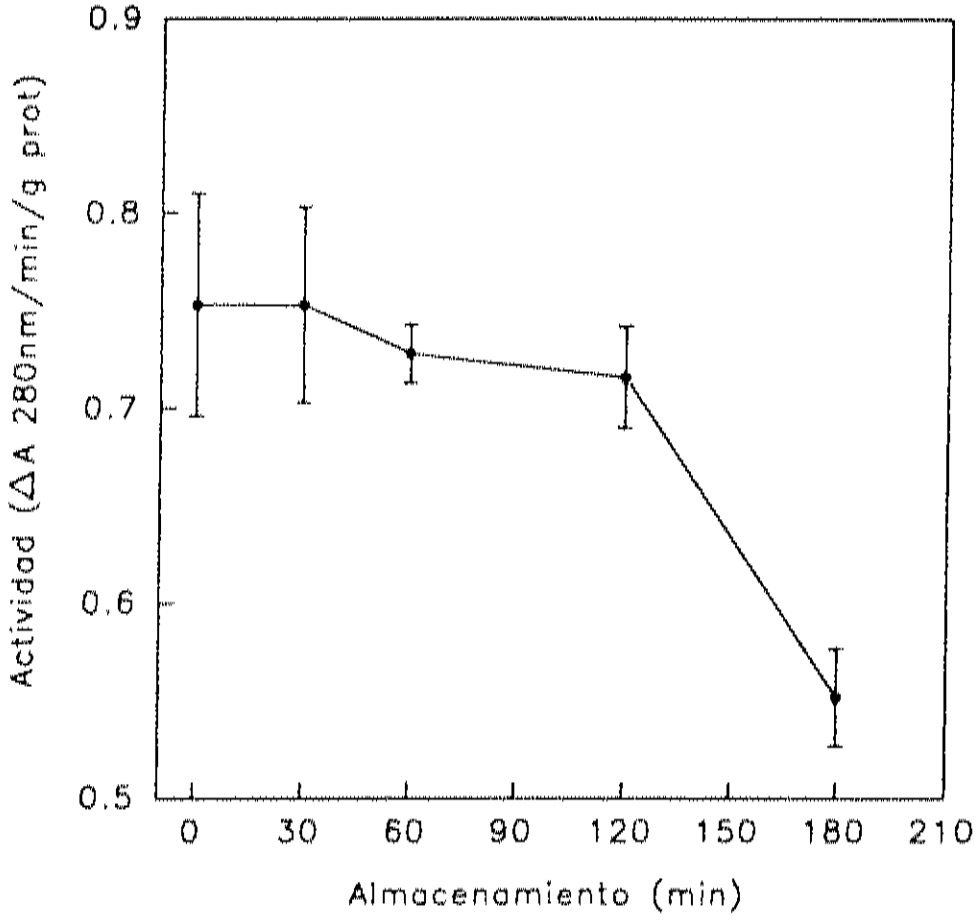

Fig. 5. Estabilidad de la actividad enzimática en el fluído sarcoplásmico alamcenado a 0°C por 4 horas. Datos obtenidos de la hidrólisis de proteínas miofibrilares a pH 7.5 y 65°C.

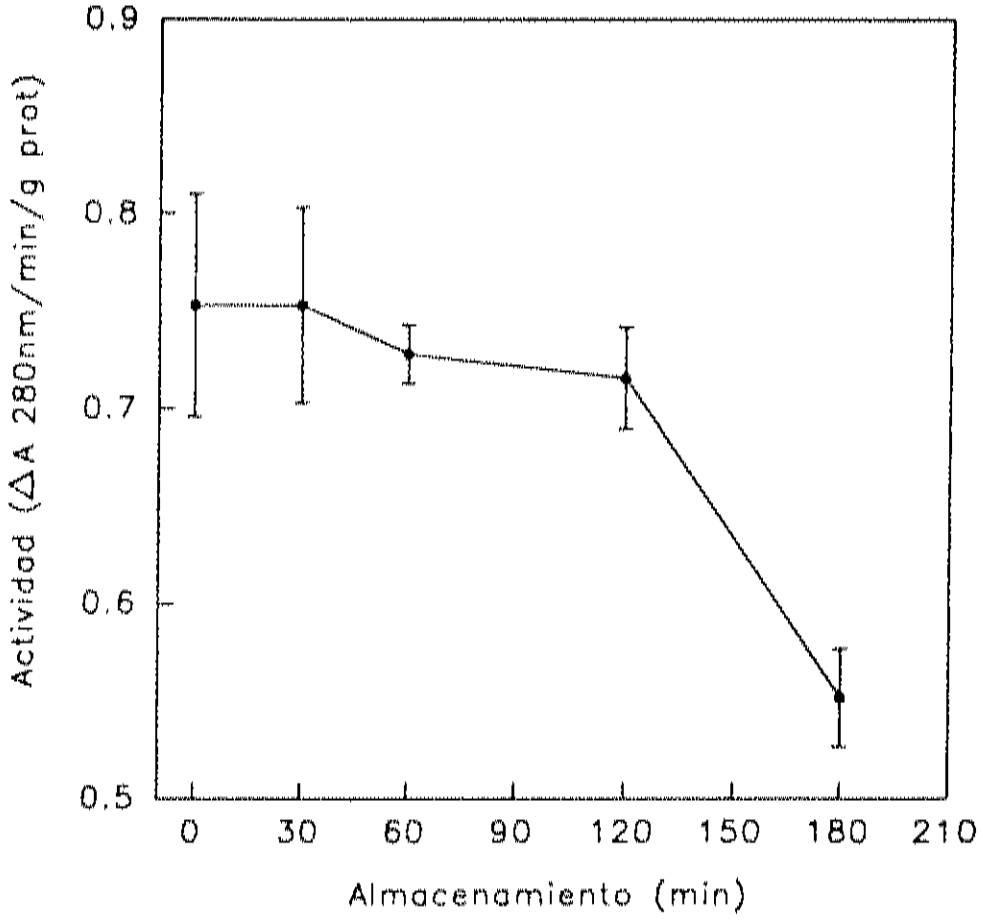

Fig. 5. Estabilidad de la actividad enzimática en el fluído sarcoplásmico alamcenado a 0°C por 4 horas. Datos obtenidos de la hidrólisis de proteínas miofibrilares a pH 7.5 y 65°C.

Efecto de la Temperatura sobre la Actividad y Estabilidad Enzimática

La temperatura mostró un efecto marcado sobre la actividad enzimática presente en el fluído sarcoplásmico del músculo de sardina (Figura 6). Durante el período de incubación, la actividad máxima se manifestó a 65°C. El cambio en absorbancia en el rango de 25°C a 45°C no fue significativo ($p > 0.05$), observándose un aumento significativo ($p < 0.05$) cuando la temperatura se incrementó a 50°C. Estos resultados indicaron la presencia de proteinasas estables al calor.

Erickson *et al.* (1983), y Rodger *et al.* (1984) reportaron un comportamiento similar para la actividad enzimática en fluído sarcoplásmico de músculo de bacalao y un extracto crudo de músculo de calamar respectivamente. Las enzimas para ambos casos mostraron una actividad máxima a 60°C y pH 7.5.

Por otro lado, Makinodan *et al.* (1982) reportaron una actividad máxima a 65°C y pH 8.5 sobre la fracción miofibrilar del músculo de carpa (*Cyprinus carpios*). La enzima actuó tanto sobre las proteínas miofibrilares como sarcoplásmicas. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio, en el cual también se utilizaron proteínas miofibrilares como sustrato.

La actividad enzimática del fluído sarcoplásmico del músculo de sardina mostró ser inestable a temperaturas superiores a los 65°C (Figura 7), mostrando actividad máxima entre 55 y 65°C por períodos de incubación de 150 min.

Efecto de la Temperatura sobre la Actividad

y Estabilidad Enzimática

La temperatura mostró un efecto marcado sobre la actividad enzimática presente en el fluído sarcoplásmico del músculo de sardina (Figura 6). Durante el período de incubación, la actividad máxima se manifestó a 65°C. El cambio en absorbancia en el rango de 25°C a 45°C no fue significativo ($p > 0.05$), observándose un aumento significativo ($p < 0.05$) cuando la temperatura se incrementó a 50°C. Estos resultados indicaron la presencia de proteinasas estables al calor.

Erickson *et al.* (1983), y Rodger *et al.* (1984) reportaron un comportamiento similar para la actividad enzimática en fluído sarcoplásmico de músculo de bacalao y un extracto crudo de músculo de calamar respectivamente. Las enzimas para ambos casos mostraron una actividad máxima a 60°C y pH 7.5.

Por otro lado, Makinodan *et al.* (1982) reportaron una actividad máxima a 65°C y pH 8.5 sobre la fracción miofibrilar del músculo de carpa (*Cyprinus carpios*). La enzima actuó tanto sobre las proteínas miofibrilares como sarcoplásmicas. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio, en el cual también se utilizaron proteínas miofibrilares como sustrato.

La actividad enzimática del fluído sarcoplásmico del músculo de sardina mostró ser inestable a temperaturas superiores a los 65°C (Figura 7), mostrando actividad máxima entre 55 y 65°C por períodos de incubación de 150 min.

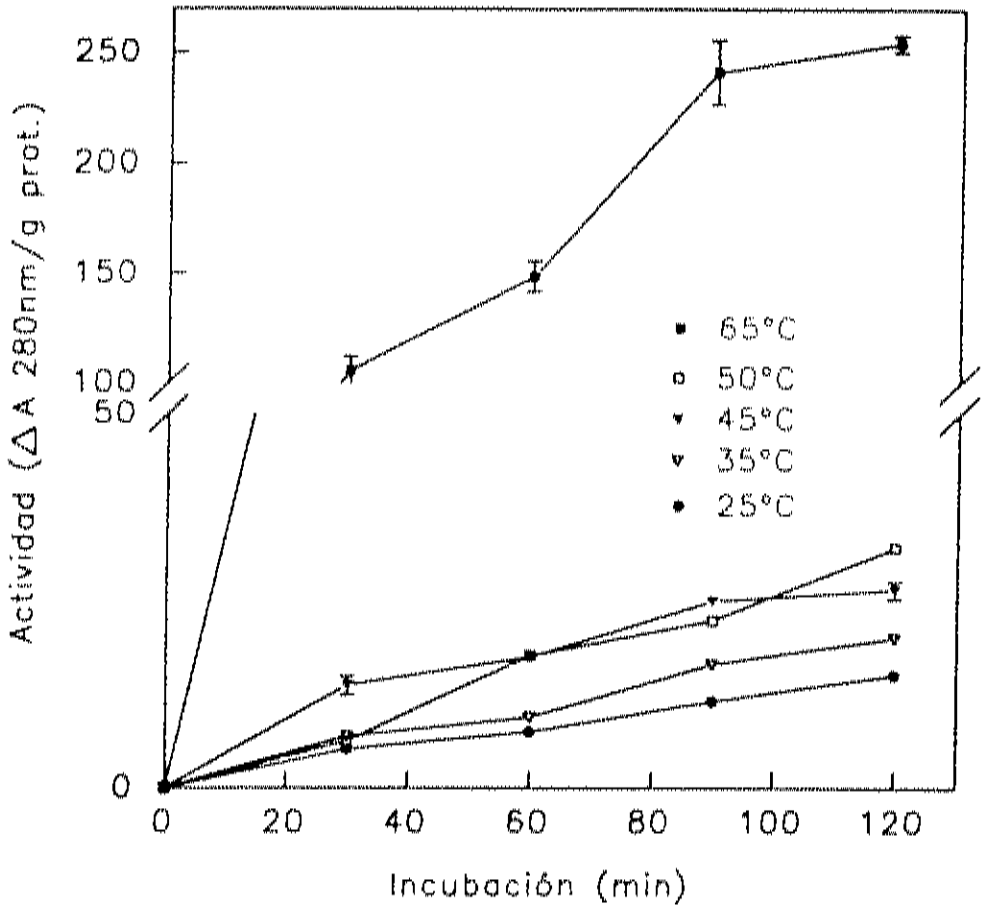

Fig. 6. Efecto de Temperatura sobre la actividad de Proteinasas del Fluido Sarcoplásmico del Músculo de Sardina Monterrey. Datos obtenidos de la hidrólisis de proteínas miofibrilares como sustrato a pH 7.5.

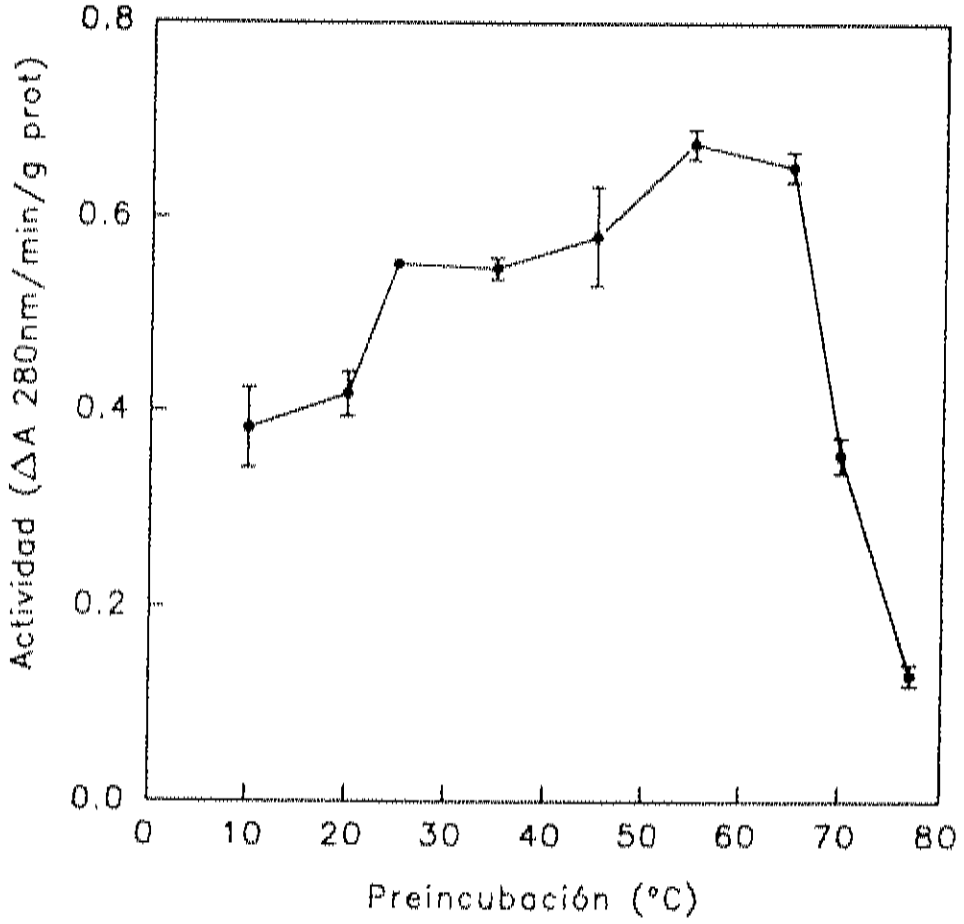

Fig. 7. Estabilidad de la Actividad enzimática a la Temperatura, en el Fluido Sarcoplásmico del Músculo de Sardina. Datos de la hidrólisis de proteínas miofibrilares a pH 7.5 y 65°C.

Estos resultados confirman la presencia de proteínasas estables al calor y son similares a comportamientos obtenidos en otros estudios, donde citan la presencia de proteínasas termoestables en músculo de pescado. Se ha reportado que en concentrado protéico de músculo de arenque del pacífico, el máximo grado de autólisis se presentó a 60°C, pH 6.7 (Koury *et al.*, 1971). Por otro lado en pasta de pescado se detectó la presencia de una enzima estable al calor, con actividad óptima a 60-65°C, utilizando caseína como sustrato (Makinodan *et al.*, 1963; Makinodan e Ikeda, 1969). Esta última enzima mostró actividad sobre las proteínas presentes en kamaboko (Makinodan e Ikeda, 1971).

Efecto del pH sobre la Actividad y Estabilidad Enzimática

El efecto del pH sobre la actividad proteolítica del fluído sarcoplásmico utilizando proteínas miofibrilares como sustrato se muestra en la Figura 8. Se detectaron máximos de actividad a pH 2.5 y 9.5. Sin embargo, la actividad enzimática solo mostró ser estable en el rango de pH 5.5 a 7.5 (Figura 9). No fueron evaluados pH superiores a 9.5.

Los resultados de las pruebas de estabilidad indicaron la presencia de enzimas que actúan a pHs de ligeramente ácidos a alcalinos lo cual concuerda con información reportada en la literatura. La existencia de una enzima alcalina en músculo de pescado que ha tomado interés en los últimos años, sobre todo por su acción durante un proceso tecnológico (Iwata *et al.*, 1973; Makinodan e Ikeda, 1977; Hase *et al.*, 1980). Esta enzima mostró ser activa a 60-65°C y poco activa a temperaturas menores de 50°C.

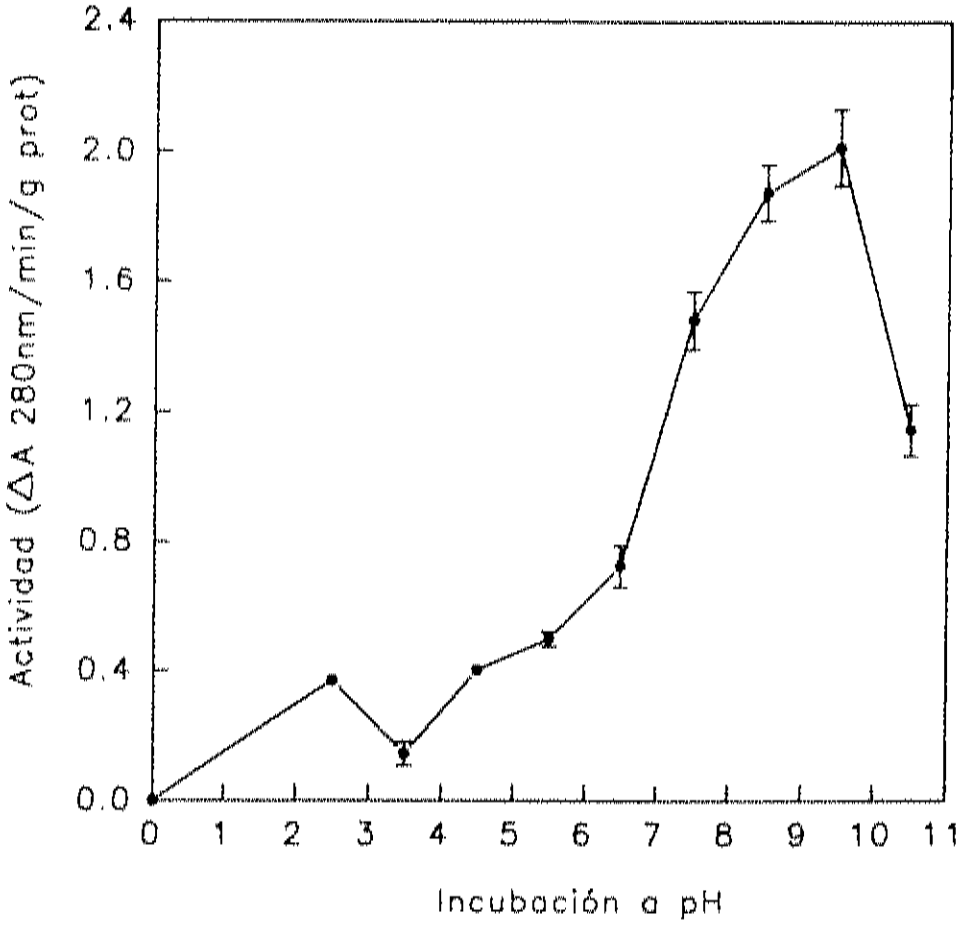

Fig. 8. Efecto de pH sobre la actividad de Proteinasas del Fluido Sarcoplásmico del Músculo de Sardina Monterrey. Datos obtenidos de la hidrólisis de proteínas miofibrilares como sustrato, a 50°C.

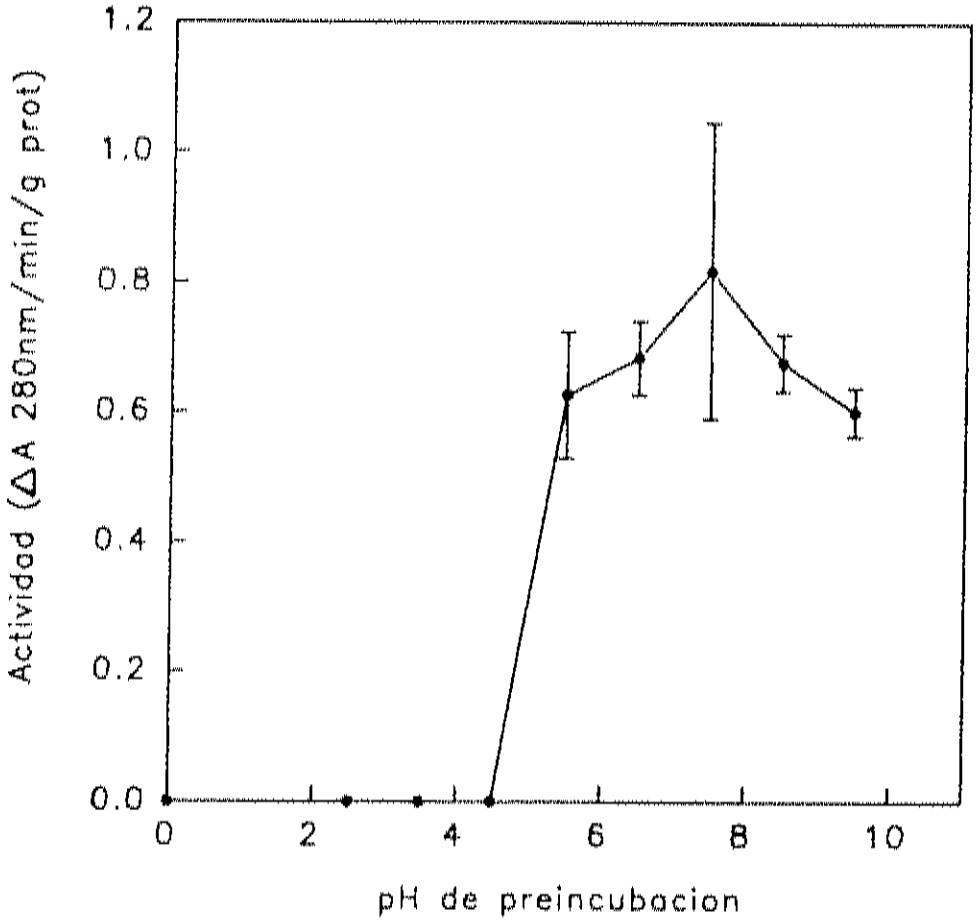

Fig. 9. Estabilidad de la Actividad enzimática al pH, en el Fluído Sarcoplásmico del Músculo de Sardina. Datos de la hidrólisis de proteínas miofibrilares a pH 7.5 y 65°C.

También se ha reportado la presencia de una enzima alcalina en músculo de carpa y en otras especies como lisa, macarela y curvina blanca, la cual mostró su actividad máxima a pH 8.0, 65°C (Deng, 1981; Makinodan *et al.*, 1982)

El comportamiento de la actividad enzimática del fluído sarcoplásmico sobre proteínas miofibrilares en el rango de pH ácido, fué similar a obtenidos en fracciones enzimáticas de músculo de diferentes especies de pescado. En mojarra (*Tilapia mosambica*) se ha detectado acción enzimática a pH de 5.5 y de 25° a 35°C (Draper y Zeece, 1989); usando hemoglobina como sustrato a pH 2.8 a 3.8 y sobre proteínas sarcoplásmicas a pH de 5.0, con temperatura óptima para ambos casos de 50°C (Doke *et al.*, 1980; Jiang *et al.*, 1991).

Estas últimas contribuían grandemente en la degradación miofibrilar y pérdida de textura, aún cuando el pH subía ligeramente y las temperaturas eran relativamente altas (Dutson, 1983).

Efecto de Fuerza Iónica sobre Actividad y Estabilidad Enzimática

En la producción de alimentos marinos es común el uso de la sal e imprescindible en la elaboración de productos tipo gel, donde participa en el proceso de extracción de las proteínas miofibrilares. La adición de sal modifica la fuerza iónica del medio ó alimento, lo cual puede influir en la actividad enzimática presente en el mismo.

De lo anterior se deriva el interés de estudiar el efecto que la fuerza iónica pudiera tener sobre la actividad enzimática presente en el músculo de sardina. Esta podría

ser incrementada en condiciones óptimas, provocando con la aceleración de proteólisis en el músculo ó en productos elaborados a partir del mismo, disminuyendo el uso .

Los estudios del efecto de la fuerza iónica (Figura 10) sobre la actividad de las proteinasas presentes en el fluído sarcoplásmico, indicaron que la fuerza iónica en el rango de 0.2 a 0.4 no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$), mostrando un valor promedio de ΔA 280 nm/min g prot. de 1.03 unidades de absorbancia.

A valores de fuerza iónica superiores a 0.4 resultaron en una disminución promedio ($p < 0.05$) del 32.6% y 47% para valores de fuerza iónica de 0.5 y 0.6 respectivamente. No existe información acerca de cómo este parámetro afecta la actividad de proteinasas en en músculo de pescado.

La actividad enzimática mostró un máximo de estabilidad a fuerza iónica de 0.4 (Figura 11) y valores superiores resultaron en una disminución significativa ($p > 0.05$), interpretándose como una desactivación drástica de la fracción enzimática presente. No exite información detallada acerca de cómo este parámetro influye sobre la estabilidad de la actividad de proteinasas del músculo de pescado.

Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que en un alimento elaborado a partir de músculo de sardina, será necesario mantener una fuerza iónica superior a 0.4, para que la actividad proteolítica presente se inactive. Esta inactivación también dependerá de otras condiciones que influencian la acción enzimática como pH, temperatura, compuestos inhibitorios, etc.

Si se considera un producto tipo gel elaborado a partir de músculo de sardina, con una formulación del 80% de humedad y 2.5% de sal, tendría una fuerza iónica de 0.538

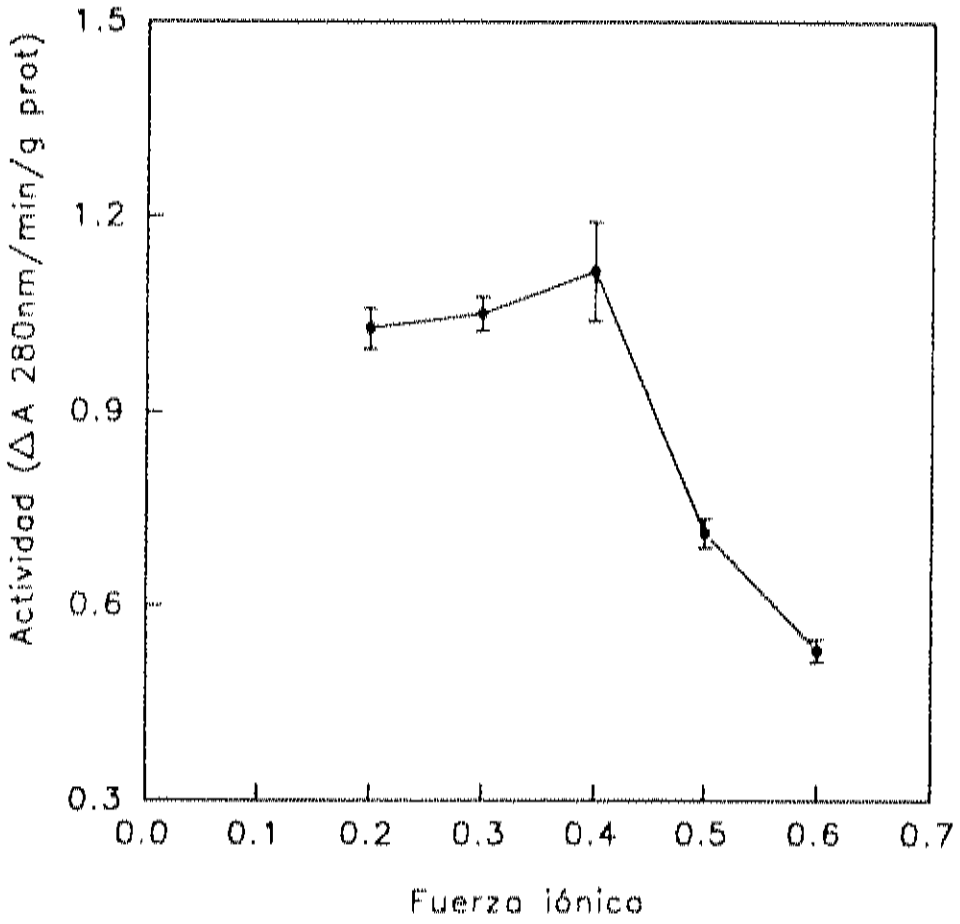

Fig. 10. Efecto de Fuerza Iónica sobre la Actividad de Proteinasas del Fluído Sarcoplásmico del Músculo de Sardina. Datos obtenidos de la hidrólisis de proteínas miofibrilares a pH 7.5 y 50°C.

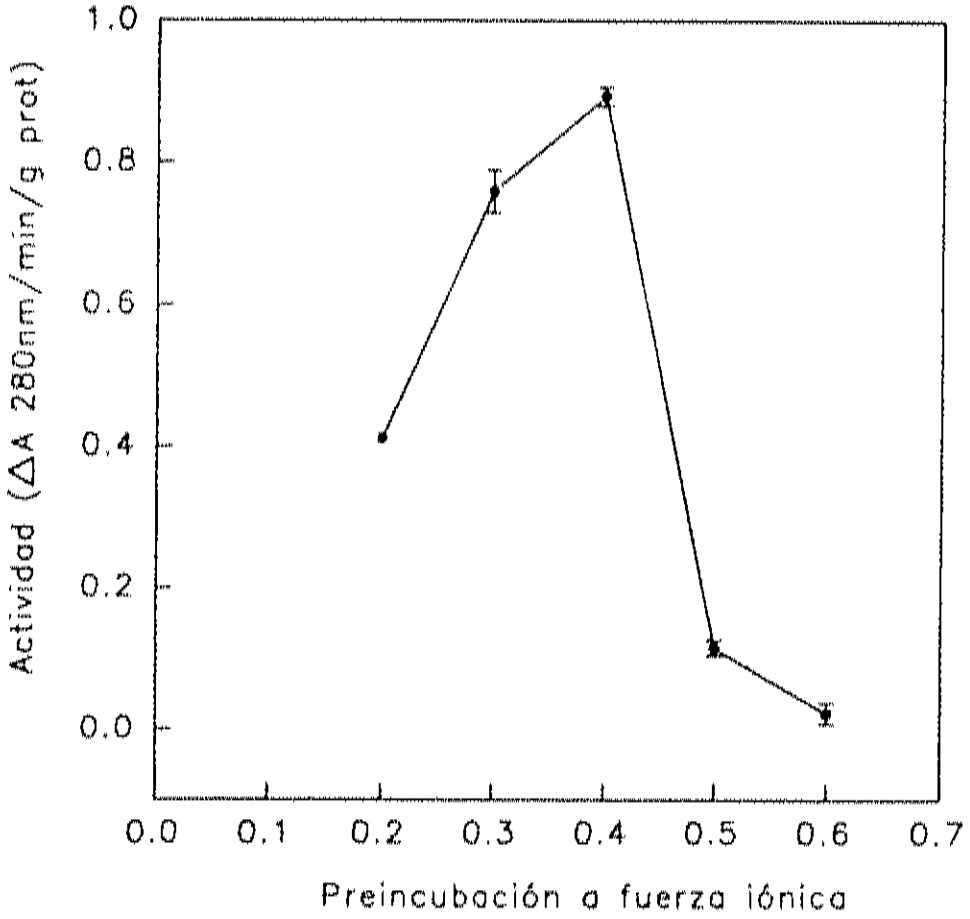

Fig. 11. Estabilidad de la Actividad enzimática a la Fuerza Iónica, en el Fluído Sarcoplásmico del Músculo de Sardina. Datos de la hidrólisis de proteínas miofibrilares a pH 7.5 y 65°C.

considerando únicamente a este soluto. Por lo que la actividad enzimática endógena en el producto, proveniente de la fracción sarcoplásmica del músculo, sería inhibida.

Actividad Específica

Los resultados del estudio del efecto de sustratos e inhibidores y/o activadores sintéticos sobre la actividad enzimática en el fluído sarcoplásmico de músculo de sardina se muestran en los Cuadros 9 y 10.

Las carboxipeptidasas son consideradas como enzimas proteolíticas de origen pancreático, las cuales son capaces de hidrolizar en forma rápida enlaces peptídicos de las proteínas, liberando aminoácidos básicos presentes en el grupo carboxilo terminal (Folk *et al.*, 1960; 1963).

En el presente estudio se observó actividad semejante a carboxipeptidasas A y B, en el fluído sarcoplásmico del músculo de sardina, lo cual se manifestó con la hidrólisis marcada a pH 7.6 de los sustratos hipuril-l-fenilalanina por la A, e hipuril-l-arginina por la B.

La actividad enzimática para ambas fracciones se vió acelerada significativamente ($p < 0.001$) al compararse con el control por $CuSO_4$, TLCK y PMSF, mientras que EDTA, iodoacetamida y cisteína no mostraron ningun efecto significativo ($p > 0.05$). Tanto el TLCK como el PMSF, activaron significativamente ($p > 0.05$) a la enzima como resultado del período de preincubación.

Cuadro 11. Efecto de inhibidores y/o activadores sobre la actividad de diferentes fracciones enzimáticas, detectadas en el fluído sarcoplásmico del músculo de Sardina Monterrey.

	ACTIVIDAD ESPECIFICA					
ENZIMAS	Control	Control (preinc)	TLCK	TLCK (preinc)	PMSF	PMSF (preinc)
Semejante a Carboxipeptidasa A (μg ac. hipúrico/min.mg prot)	5.08[a]	5.08[a]	34.67[b]	38.67[b]	11.55[b]	13.06[b]
Semejante a Carboxipeptidasa B (μg ac. hipúrico/min.mg prot)	4.24[a]	4.24[a]	37.33[b]	37.84[b]	7.92[b]	8.18[b]
Semejante a Quimotripsina (μg p-nitroanilida/min.mg prot)	4.11[a]	4.28[a]	2.19[b]	1.28[b]	2.61[b]	2.64[b]
Catepsina C (μg ß-naftilamina/min.mg prot)	0.119[a]	0.117[a]	0.121[a]	0.048[b]	0.121[a]	0.120[a]
Catepsina D (μg tirosina/min.mg prot)	0.0142[a]	0.0155[a]	0.010[b]	0.0118[b]	0.015[a]	0.0175[a]

Los valores obtenidos son los promedios de dos repeticiones, cuyo coeficiente de variación fue menor al 5%.
Los superíndices indican la diferencia de actividad de las enzimas entre el control y cada uno de los compuestos ($p<0.05$).

TLCK: N-α-tosyl-L-lysine-chloromethyl ketone
PMSF: Phenyl methyl sulfonyl fluoride

Cuadro 10. Efecto de inhibidores y/o activadores sobre la actividad de diferentes fracciones enzimáticas, detectadas en el fluído sarcoplásmico del músculo de Sardina Monterrey.

	ACTIVIDAD ESPECIFICA				
ENZIMAS	Control	EDTA (1mM)	$CuSO_4$ (1mM)	Cisteína (1mM)	Iodoacetamida (1mM)
Semejante a Carboxipeptidasa A (μg ac. hipúrico/min.mg prot)	5.08^a	4.485^a	354.80^b	5.327^a	5.122^a
Semejante a Carboxipeptidasa B (μg ac. hipúrico/min.mg prot)	4.241^a	4.293^a	91.153^b	3.726^a	3.875^a
Semejante a Quimotripsina (μg p-nitroanilida/min.mg prot)	2.544^a	0^b	0.766^b	1.156^b	0.780^b
Catepsina C (μg ß-naftilamina/min.mg prot)	0.121^a	0.124^a	0.023^b	0.115^a	0.114^a
Catepsina D (μg tirosina/min.mg prot)	0.018^a	0.015^b	0.023^b	0.017^a	0.018^a

Los valores obtenidos son los promedios de dos repeticiones, cuyo coeficiente de variación fue menor al 5%.
Los superíndices indican la diferencia entre el control y cada uno de los compuestos ($p<0.05$).

Folk et al., (1960; 1963) y Whitaker (1976) reportaron que las carboxipeptidasas son metaloproteinasas y que son inhibidas por agentes quelantes como EDTA. No existe información acerca de la presencia de carboxipeptidasa A y B en músculo de pescado.

En el fluído sarcoplásmico del músculo de sardina, la fracción enzimática responsable de hidrolizar los sustratos sintéticos anteriormente señalados, no fué influida por EDTA. Estos resultados son determinantes respecto a la no presencia de carboxipeptidasas en el músculo de sardina, pero sí a la presencia de una fracción "semejante" a ellas que es activa a pH 7.65.

Se detectó actividad "semejante a quimotripsina", la cual se manifiestó por la hidrólisis de GNPA a pH 8.2 para producir el compuesto p-nitroanilida. Resultados similares fueron obtenidos por Erickson *et al.*, (1983) para bacalao a pH 7.8, donde también reportaron que esta actividad enzimática fue inhibida por Cu^{++}, TLCK y PMSF.

La actividad en el fluído sarcoplásmico en el músculo de sardina fue inhibida significativamente ($p<0.05$) por EDTA, cisteína, iodoacetamida, $CuSO_4$, TLCK y PMSF, con reducciones en la actividad enzimática equivalentes al 100%, 54.5%, 69.3%, 70.0%, 70.1% y 38.5% respectivamente.

La inhibición enzimática por TLCK se manifestó durante la determinación de la actividad, con una reducción de la actividad enzimática en un 47% y como resultado de la aplicacion del período de preincubación en un 70.1%. Mientras para el compuesto PMSF, la inhibición sólo se manifestó durante la determinación de la actividad, ya que el período de preincubación enzima-inhibidor no mostró ningún efecto.

No existe información acerca del efecto inhibitorio o activador de cisteína e iodoacetamida sobre esta fracción enzimática. De los resultados se concluye que esta fracción enzimática en el fluído sarcoplásmico del músculo de sardina, puede ser considerada como "semejante a quimotripsina".

La catepsina C rompe dipéptidos secuenciales a leucina terminal (Erickson *et al.*, 1983), siendo inhibida por iodoacetamida y $CuSO_4$ (Misaka y Tappel, 1971). Se ha reportado que PMSF no tiene efecto sobre la actividad de esta enzima (Fruton y Mycek, 1956).

Se detectó actividad semejante a esta enzima a pH 7.0, en el fluído sarcoplásmico del músculo de sardina. La actividad de esta enzima fué inhibida significativamente ($p < 0.001$), en un 80% por $CuSO_4$. El efecto de EDTA, iodoacetamida y cisteína sobre la actividad enzimática no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$). El efecto del PMSF y TLCK sobre la actividad no fue significativo ($p > 0.05$) al tiempo cero, mientras que como resultado del período de preincubación sólo el efecto del TLCK fue significativo ($p < 0.001$). La bibliografía no reporta el efecto del TLCK sobre la actividad de esta enzima. Los resultados en el fluído sarcoplásmico mostraron un efecto inhibitorio de este compuesto.

Los trabajos de Erickson *et al.*, (1983) y Frutton y Mycek (1956) muestran la presencia de catepsina C en músculo de pescado, la cual fue inhibida por iodoacetamida y $CuSO_4$ y no fué afectada por PMSF. La actividad del fluído sarcoplásmico en el músculo de sardina concuerdan con las investigaciones anteriores, a excepción del efecto

de la iodoacetamida. La inhibición por éste último fué ligera más no significativa, por lo que se concluye la presencia de catepsina C en el músculo de sardina.

Se ha reportado que la catepsina D, está ampliamente distribuída en las células del pescado (Doke *et al.*, 1980, Makinodan *et al.*, 1982); es una proteinasa intracelular la cual es ligeramente afectada por EDTA (Jiang *et al.*, 1991).

En el presente estudio se detectó actividad de esta enzima en el fluído sarcoplásmico del músculo de sardina, la cual fué significativamente activada ($p = 0.005$) en un 28% por $CuSO_4$ e inhibida significativamente ($p < 0.05$) en un 17% por EDTA. Tanto la iodoacetamida como la cisteína no mostraron ningún efecto ($p > 0.05$) sobre la actividad de esta enzima.

El efecto del PMSF y TLCK sobre la actividad no fue significativo ($p > 0.05$) al tiempo cero, mientras que como resultado del período de preincubación sólo el efecto del TLCK fue significativo ($p = 0.016$).

Los resultados concuerdan con los reportados en la literatura, con relación a la actividad enzimática detectada a pH ácido (Doke *et al.*, 1980; Jiang *et al.*, 1991) y al efecto inhibitorio del EDTA (Jiang *et al.*, 1991), ésto determina la presencia de catepsina D en el fluído sarcoplásmico del músculo de sardina.

Diferentes investigadores reportan la presencia de catepsina A y B en músculo de pescado. Hara *et al.*, (1988) y Matsumiya *et al.*, (1989), detectaron la presencia de catepsina B en músculo de carpa (*Cyprinus carpios*) y macarela (*Scomber japonicus*) respectivamente, mientras que Jiang *et al.*, (1990), reportaron la presencia de dos fracciones con actividad semejante a catepsina A en músculo de chano (*Chanos chanos*).

No se detectó actividad de las enzimas catepsina A y B en el fluído sarcoplásmico del músculo de sardina. Sin embargo, no se puede afirmar la ausencia de éstas en el músculo de esta especie, ya que éstas enzimas pueden manifestar su actividad al aplicar un método de extracción con solventes específicos para el rompimiento de membranas lisosomales, tal como lo recomiendan los investigadores anteriormente citados.

En el presente trabajo el extracto manejado fué obtenido como el fluído del músculo sometido a congelación-descongelación, proceso que provoca el rompimiento de membrana celular y probablemente la membrana lisosomal liberando la actividad enzimática presente.

No se detectó actividad "semejante a tripsina" en el fluído sarcoplásmico del músculo de sardina, lo cual concuerda con lo reportado por Erickson *et al.* (1983), para músculo de bacalao (*Gadus macrocephalus*) . Existen pocos reportes acerca de este tipo de enzimas en músculo de pescado. Jiang *et al.* (1990), reportaron la presencia de una fracción enzimática en el músculo de chano (*Chanos chanos*), la cual mostró actividad a 60°C, pH 8.0, clasificándola como "semejante a tripsina".

Los estudios de Erickson *et al.* (1983) en fluído sarcoplásmico del músculo de bacalao (*Gadus macrocephalus*), no detectaron la presencia de colagenasa. De igual forma, en el presente estudio no se detectó actividad de esta enzima.

CONCLUSIONES

Las determinaciones de nitrógeno no proteico en el fluído sarcoplásmico almacenado por 4 días a 0°C, mostraron que la fracción enzimática de éste no presenta actividad sobre las proteínas del mismo. Esto permitió la utilización del extracto crudo en la determinación de la actividad presente en el mismo, sobre las proteínas utilizadas como sustrato en el estudio. Contrario a lo anterior, se hubiese tenido la necesidad de determinar la magnitud de la hidrólisis previa existente en el fluído, para ser utilizado como control.

Los estudios de estabilidad de la actividad enzimática en el fluído sarcoplásmico demostraron que el fluído deberá ser mantenido a 0°C, además, ser utilizado en un período no mayor de 24 horas y de preferencia en las primeras dos horas después de ser obtenido; de lo contrario la actividad enzimática se reduce significativamente.

De los resultados del efecto de la temperatura, se concluye que la actividad enzimática presente en el fluído sarcoplásmico es termoestable, detectándose una actividad máxima a 65°C que fué estable en el rango de 50° a 65°C.

La presencia de proteinasas resistentes al calor en el músculo de sardina, tendría repercusiones tecnológicas trascendentes donde se apliquen tratamientos térmicos que incluyan el rango de 40 a 65°C, como el proceso de elaboración de productos tipo "Kamaboko" (geles de pescado). Esto se manifestaría en la hidrólisis proteica miofibrilar,

fracción imprescindible en productos manufacturados donde se requiere de una alta funcionalidad aportada por la proteína miofibrilar presente.

El efecto del pH sobre la actividad y estabilidad enzimática, determinó dos valores de máxima actividad a pH 2.5 y 9.5. La actividad detectada fué estable en el rango de pH de 5.5 a 8.5, indicando la presencia de enzimas ligeramente ácidas y enzimas alcalinas. La existencia de fracciones enzimáticas alcalina y ligeramente ácida en el músculo de sardina fue evidente, lo cual debe ser considerado como antecedente en la utilización de este recurso como materia prima para la elaboración productos manufacturados, como el surimi cuyo pH puede variar entre 6.7 y 7.5 (Pacheco-Aguilar, 1989).

Los resultados sobre el efecto de la fuerza iónica concluyen que en un alimento elaborado a partir de músculo de sardina, será necesario mantenela en un valor superior a 0.4 para que la actividad proteolítica presente se inactive.

Los estudios de actividad específica mediante el uso de sustratos e inhibidores y/o activadores sintéticos, indicaron la presencia de proteinasas activas en el fluído sarcoplásmico del músculo de la sardina tales como: "semejante a carboxipeptidasa A", "semejante a carboxipeptidasa B", "semejante a quimotripsina", catepsina C y catepsinas D.

La falta de actividad de enzimas exógenas como Tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas y colagenasa garantizaron que el músculo de sardina utilizado en este estudio no tuvo contaminación visceral, por lo que la actividad de proteinasas en el fluído sarcoplásmico es de carácter endógeno.

La ausencia de enzimas como catepsina A y B en el fluído sarcoplásmico pudo deberse a que el método de extracción no fue suficieme para romper las membranas de los lisosomas u otros organelos. De lo contrario podrían haber las catepsinas A y B y manifestar su actividad.

Del presente trabajo ha surgido la necesidad de purificar y caracterizar individualmente las enzimas detectadas, así como de la implementación de métodos de extracción que garanticen la destrucción de la membrana lisosomal y la liberación de su contenido enzimático.

BIBLIOGRAFIA

Aknes, A. 1988. Location of Enzymes responsible for Autolisis in Bulk-Stored Capelin (Mallotus villosus). Journal of Science and Food Agriculture, 44: 263-271.

Aknes, A. 1989. Effect of Proteinase Inhibitors from Potato on the Quality of Stored Herring. Journal of Science and Food Agriculture, 49: 225-234.

Anglemier, A.F. and Montgomery, M.W. 1976. Amino Acids. Peptides and Proteins. Cap.5, pg. 205-285. In Principles of Food Science, by Owen R. Fennema (Ed). Marcel Dekker, INC. New York and Basel, New York, 10016.

A.O.A.C. 1984. Official Methods os Analysis. 14th edition. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, V.A.

Asghar, A., and Batti, A.R. 1987. Endogenous Proteolytic Enzymes in Skeletal Muscle: Their Significance in Muscle Physiology during Postmortem aging Events in Carcasses. Adv. Food Res. 31:343-451.

Barret, A.J. 1970. Cathepsin D. Purification of Isosymes from Human and Chiken Liver. Journal of Biochemistry. 117:601.

Barret, A.J. 1972. A New Assay for Cathepsin B1 and Other Thiol Proteinases. Anal. Biochem. 47:280.

Barret, A.J. 1973. Human Cathepsin B1. Purification and some Properties of the Enzyme. Journal of Biochemistry. 131:809.

Barret, A.J. 1976. An Improved Colour Reagente of use in Barrett's Assay of Cathepsin B. Analytic Biochemistry, 76:374-376.

Barret, A. J. 1977a. Cathepsin D and other Carboxilproteinases. In Proteinases in Mammalian Cells and Tissues (Edited by Barret A.J.), pp 209-248. North Holland Amsterdam.

Barret, A. J. 1977b. Cathepsin B and Other Thiolproteinases. In Proteinases in Mammalian Cell and Tissues (Edited by Barret A.J.). pp 181-205. North Holland, Amsterdam.

Barret A.J. and Kirschke. 1981. Cathepsin B, Cathepsin H and Cathepsin L in "Methods in Enzymology", L. Lorand (Ed.). Vol. 80 pp 535. Academic Press New York.

Barret, A.J. and McDonald, J.K. eds. 1980. "Mammalian Proteases. A Glossary and Bibliography", Vol. I. Academic Press, London.

Bergman, M. and Fruton, J.S. 1941. The Specificity of Proteinases. Adv. Enzymol. 1:63.

Bergman, I. and Loxley, R. 1963. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydryproline. Analytic Chemistry, 35:1961.

Bird, J.W.C., Berg, T., Milanesi, A., and Stauber, W.T. 1969. Lysosomal Enzymes in Aquatic Species-1. Distribution and Particle Properties of Muscle Lysosomes of Goldfish. Comp. Biochem. Physiol. 30:457-468.

Bird, J.W.C., and Carter, J. 1980. Proteolytic Enzymes in Striated and Nonstriated Muscle. In "Degradative Proceses in Heart and Skeletal Muscles" (K. Wildenthal, ed.), pg. 51. Elsevier, New York.

Bird, J.W.C., Carter, J., Treimer, R.E., Brooks, R.M., and Spanier, A.M. 1980. Porteinases in Cardiac and Skeletal Muscle. Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol., 39:20.

Bird, J.W.C., Spanier, A.M. and Schwartz, W.N. 1978. Cathepsin B and D: Proteolytic Activity and Ultrstructural Localization in Skeletal Muscle. In " Protein Turnover and Lysosomes Function" (H.L. Segal and D.J. Doyle, eds.), pg. 589. Academic Press, New York.

Blow, D.M., and Steitz, T.A. 1970. X-Ray Diffraction Studies of Emzymes. Annu. Rev. Biochem. 39:63.

Bonete, J.M., Manjon, A. Llorca, F. and Iborra, J.L. 1984. Acid proteinasa activity in Fish I. Comparative study of extraction of cathepsins B and D from Mujil Auratus. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 78B, No. 1, pp. 203-203.

Bonnie, S.P., Jen-Min, K., Lih-ju, L. and Hei-Min, Y. 1986. Effect of Endogenous Proteinases on Histamine and Honeycomb Formation in Mackerel. Journal of Food Biochemistry, 10, 305-319.

Bourgeois, C.M. 1986. Evolución del valor agragado de las proteínas de origen animal. Cap. 1, pag. 1-6; en Proteinas Animales, por Bourgeois, C.M. y Le Roux, P. (Editores). Editorial el Manual Moderno S.A. de C.V. Delegación Cuauhtémoc, 06100-México, D.F.

Bury, A.E., and Pennington, R.J. 1973. Arylamidases in Human Muscle. Biochem. Soc. Trans., 1:1306

Bury, A.E., and Pennington, R.J. 1975. Hydrolysis of Dipeptide 2-naftilamides by Human Muscle Enzymes. Journal of Biochemistry., 145:413.

Bury, A.E., Coolbear, T., and Savery, C.R. 1977. Separation and Properties of two Arylamidase from Rat Cardiac Muscle Extracts. J. Biochem. 163:565.

Caldwell, K.A., and Grosjean, O.K. 1971. Lysosomal Cathepsins of Chiken Skeletal Muscle. Distribution and Properties. J. Agric. Food Chem., 19:108.

Chen, C.S., Yan, T.R., and Che, H.Y. 1978. Purification and Properties of Trypsin-like Enzymes and Carboxipeptidase A from Euphausia superba. Journal of Food Biochemistry, 2:349-366.

Chen, C.S., Hamann, D.D., and Weeb, N.B. 1979. Effect of Thermal Processing on Minced Fish Gel Texture. Journal of Food Science. 44:1080.

Chen, C.S., Tso, C.Y. and Jiang, S.T. 1989. Purification and Characterization of Proteases from the Viscera of Milkfish (Chanos chanos). Journal of Food Biochemistry, 12:269-288.

Dahlmann, B., Schroeter, C., Herbertz, L., and Reinauer, H. 1979. Myofibrillar Protein Degradation and Muscle Proteinases in Normal and Diabetic Rats. Biochem. Med.28:33.

Delange, R.J., and Smith, E.L. 1971. Leucine Aminopeptidase and other N-terminal exopeptidases. Enzymes, 11:81.

Deng, J.C. and Lillard, D.A. 1973. The effect of curing agents, pH and temperature on the activity of Porcine Muscle Cathepsins. Journal of Food Science, 38:299

Delaney, R.A.M. 1976. Composition, properties and uses of Whey Protein Concentrate. J. Soc. Dairy Technol. 29(2):91.

Doke, S.N., Ninjoor, V. and Nadkarni, G.B. 1980. Characterization of Cathepsins D from the Skeletal Muscle of Freshwater Fish, Tilapia mossambica. Agric. Biol. Chem. 44:1521-1528.

Erickson, A.H. Conner, G.E., and Blobel, G. 1981. Biosymesis of a Lysosomal Enzyme. J. Biol. Chem. 256:11224.

Erickson, M.C., Gordon, D.T. and Anglemier . A.F. 1983. Proteolytic Activity in the Sarcoplasmic Fluids of Parasited Pacific Whiting (Merluccius productus) and Unparasited True Cod (Gadus macrocephalus). Journal of Food Science, 48:1315.

Fahrney, D.E., and Gold, A.M. 1963. Problem of t5he Serine-histidine H Bond in the Active Site of α-chymotrypsin. J. Am. Chem. Soc. 85:997.

Fang, L.S. and Chiou, S.F. 1989. Effect os Salinity on the Activities of Digestive Proteases from the Tilapia Fish, Oreochromis niloticus in Different Culture Enviroments. Comp. Biochem. Physiol. PT Aj. 93:439.

Fennema, O.R. 1976.Priciples of Food Science. Food Chemistry. Fennema O.R (Ed). Marcel Dekker, INC. New York and Basel.

Fischer, E. H. and Stein, E.A. 1960. Kinetic consequences of Enzyme Inhibition. Cap. 8, pg 260. In Principles of Enzymology for the Food Science, by John Whitaker (Ed). Marcel Dekker, INC. 270 Madison Avenue, New York, New York 10016.

Folco, E.J., Busconi, L., Matone, C., Trucco, R.E. and Sanchez, J.J. 1984. Action of two alkaline proteases and trypsin inhibitor from White croaker skeletal muscle (Micropogan opercularis). In the degradation of miofibrillar proteins. FEBS Letters, 176:215.

Folk, J.E. Piez, K.A., Carroll, W.R. and Gladner, J.A. 1960. Carboxipeptidase B. 4: Purification and Characterization of Porcine anzyme. J. Biol. Chem., 235:2272.

Folk, J.E. and Schirmer, E.W. 1963. The porcine Pancreatic Carboxipeptidase A system. 1. Three forms of the active enzyme. J. Biol. Chem., 238:3884.

Frutton, J.S. and Mycek, M.J. 1956. Studies on Beef Spleen Cathepsin C. Archives of Biochemistry and Biophysics, 65:11.

Gilberg, A., Raa, J. 1980. Tissue degradation and belly busting in Capelin. In Advances in Fish Science and Technology, Ed. Connell J.J. Fishing New Books London, pp. 456-459.

Goldbarg, J.A. and Rutenburg, A. M. 1958. The colorimetric determination of Leucine aminopeptidase in urine and serum of normal subjets and patients with cancer and other diseases. Cancer, 11: 283.

Hara, K., Susumatzu, A., and Ishihara, T. 1988. Purification and Characterization of Cathepsin B from Carp Ordinary Muscle. Nippon Suisan Gakkaishi, 54(7):1243-1252.

Hardy, M.F., and Pennington, R.J.T. 1976. Separation of Cathepsin B1 and Relationed Enzymes from Rat Skeletal Muscle. Biochem. Biophys. Acta. 527:253.

Hardy, M.F., Parsons, M.E., and Pennington, R.J.T. 1975. Separation of some possible Peptide hydrolases from Skeletal Muscle. Int. Symp. Intracell. Protein Catabolism, 2nd Ljubljana, Yugoslavia, pg 25.

Hardy, M.F., Parsons, M.E., and Pennington, R.J.T. 1977. Separation of some possible Peptide hydrolases from Skeletal Muscle. In "Intracellular Protein Catabolism, (V. Turk and M. Marks, eds.), pg 209. Plenum, New York.

Hashimoto, K., Watabe, S., Kono, M. and Shiro, K. 1979. Muscle Protein Composition of Sardine and Mackerel. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 45(11): 1435-1441.

Hirao, T., Hara, K., and Tkahashi, K. 1984. Purification and Characterization of Cathepsin B of Monkey Skeletal Muscle. J. Biochem (Tokyo) 95:871.

Holmes, D., Parsons, M.E., Park, D.C., and Pennington, R.J. 1971. An Alkaline Protease in Muscle Homogenates. J. Biochem. 125:98P.

Hoseman, J.G., MacNaughton, W.K. and Downe, A.E.R. 1984. Cathepsin B and Aminopeptidase Activity in the posterir migdut of "Euschistus euchistoides" (Hemiptera: Pentatomidae). The Canadian Entomologist, 116:1393.

Huang, J.S., Huang, S.S., and Tang, J. 1980. Structure and Function of Cathepsin D. In "Enzyme Regulation and Mechanism of Action" (P. Mildner and B. Ries, eds.), pg 289. Pergam, Oxford.

Husain, S.S., and Baqai, J. 1976. Evidence fro two Types of Sulphydryl Groups in Cathepsins B1 and B1A. Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 35:1460.

Hynd, J.E. 1970. Utilization of Milk proteins. J. Soc. Dairy Technology. 23(2):95.

Iodice, A.A, Leong, V. and Weinstock, I.M. 1966. Separation os Cathepsins A and D of Skeletal Muscle. Archives of Biochemistry and Biophysics, 117:477.

Iodice, A.A., Chin, J., Perker, S., and Weinstock, I.M. 1972. Cathepsins A, B, C, D and Autolysis during Development of Breast Muscle of Normal and Dystrophy chicken. Arch. Biochem. Biophys. 152:166.

Iwata, K., Kobashi, K. and Hase, J. 1974. Studies on muscle alkaline protease III. Distribution of alkaline protease inmuscle of freshwater fish, Marine fish and in internal organ of Carp. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 40:201-209.

Jansen, E.F., Nutting, M.D.F., Jang, R., and Baal, A.K. and 1949. Inhibition of the Proteinase and Esterase Activities of Trypsin and Chymotrypsin by Diisopropyl Fluorophosphate: Crystalization of Inhibited Chymotrypain. J. Biol. Chem. 179:189.

Jiang, S.T., Tsao, C.Y., Wang, Y.T. and Chen, C.S. 1990. Purification and Characterization of Proteases from Milkfish Muscle (Chanos chanos). Journal of Agriculture of Food Chemistry. 38:1458-1463.

Jiang, S.T., Wang, Y.T. and Chen, C.S. 1991. Purification and Characterization of a proteinase identified as Cathepsin D from Tilapia nuscle (Tilapia-nilotica x Tilapia aurea). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39 (9):1597.

Jiang, S.T., Nei, F.P, Chen, H.C., Wang, J.H. 1992. Comparative Study on the Cathepsin D from Banded Shrimp (Peaneus japonicus) and Grass Shrimp (Peaneus monodon). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40(6): 961-966.

Kar, N.C., and Pearson, C.M. 1976. Arylamidase and Cathepsin-A Activity of Normal Dystrophic Human Muscle. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 151:583.

Kar, N.C., and Pearson, C.M. 1978. Muscular Dystrophy and Activatin of proteinases. Muscle Nerve., 1:308.

Keilová, H., Bláha, K., and Keil, B. 1968. Effect of Steric Factors on Digestibility of Peptides Containing Aromatic Amino Acids by Cathepsin D and Pepsin. Eur. J. Biochem. 4:442.

Kinsella, J.E. 1979. Functional Properties of Soy Proteins. J. Am. Oil. Chem. Soc. 56:242.

Kirschke, H., Langner, J., Siemann, S., Wiederanders, B., Asorge, S., and Bohley, P. 1980. Lysosomal Cyatein Proteinases. In " Protein Degaradtion in Health and Disease" (D. Evered and J. Whelan, eds.). pg 15. Ciba Foun. Symp. Ser. (75). Excerpta Medica, Amsterdam.

Kullman, W. 1985. Proteases as catalytic agents in peptide synthesis chemistry: Shiftin the extent of peptide bond synthesis from a "Quantitative negligeable" to a "Quantitative considerable". Journal of Protein Chemistry, 4:1.

Krzysik, B.A., and Adibi, S.A. 1977. Cytoplasmic Dipeptidases Activities of Kidney, Ileum, Jejunium, Liver, Muscle and Blood. Am. J. Physiol. 233: E. 450.

Laakkonen, E., Sherbon, J.W., and Wellington, G.H. 1970. Low-temperature, Long-term Heating of Bovine Muscle. Journal of Food Science. 35:181.

Lanier, T.C., Hamann, T.S., and Thomas, F.B. 1981. Effects of Alkaline Protease in Minced Fish on Texture of Heated-Processed Gels. Journal of Food Science. 46:1643.

Le Coeur, A. y Lescoat, Y. 1986. Pulpas de Pescado y Crustáceos y su Transformación en Embutidos. Cap. 6, pag. 112-141. En Proteínas Animales, por Bourgeois, C.M. y Le Roux, P. (Editores). Editorial el Manual Moderno S.A. de C.V. Delegación Cuauhtémoc, 06100-México, D.F.

Lin, T.S. and Lanier, T. 1980. Properties of an Alkaline Protease from the Skeletal Muscle of Atlantic Croaker, J. Food Biochem. 4:17-28.

Lin, T.Y., and William, H.R. 1979. Inhibition of Cathepsin D by Syntetic Oligopeptides. J. Biol. Chem. 254:11875.

Liston, J. 1965. In the Technology of Fish Utilization. Ed. Kreyzer R. Fishing New Books, London, pp. 53-57.

Lorient, D. 1986. Propiedades Funcionales de las Proteínas de Origen Animal, Cap. 2, pag. 7-31. En Proteinas Animales, por Bourgeois, C.M. y Le Roux, P. (Editores). Editorial el Manual Moderno S.A. de C.V. Delegación Cuauhtémoc, 06100-México, D.F.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randal, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193:651.

Makinodan, Y. and Ikeda, S. 1971. Studies on Fish Muscle Protease-5. On existence of Cathepsins A, B y C. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 37:1002.

Makinodan, Y. and Ikeda, S. 1976b. Studies on Fish Muscle Protease-6. Separation of Carp Muscle Cathepsins A and D, and some Properties of Carp Muscle Cathepsin A. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 42:239.

Makinodan, Y. and Ikeda, S. 1977. Alkeline proteinase of Carp muscle: Effects of some protein denaturing agents on the activity. Journal of Food Science, 42:1026.

Makinodan Y., Hirotsuka, M., and Ikeda, S. 1979. Neutral Proteinase of Carp Muscle. Journal of Food Science, 44:1110-1117.

Makinodan, Y. 1981. Fish Muscle Protease. In "Minor Components of Fish and Shell-Fish, Their Biochemistry and Food Chemistry" (Japanese). Ed. Ikeda, S. Koseisha, K. Co., Tokyo.

Makinodan, Y., Toyohara, H. and Ikeda, S. 1982. Intracellular distribution of carp muscle cathepsin D and an electron micrograf of muscle lisosomal fraction. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 48:1501.

Makinodan, Y., Toyohara, H. and Ikeda, S. 1984. Comparison of Muscle Proteinase Activity Among Fish Species. Comp. Biochem. Physiol. 79B. 129-134.

Makinodan, Y., Toyohara, H. and Niwa, E. 1985. Implication of Muscle Alkaline Proteinase in the Textural Degradation of Fish Meat Gel. Journal of Food Science, 50:1531.

Mandl, I., MacLennan, J.D. and Howes, E.L. 1953. Isolation and Charaeterization of Proteinase and Collagenase from Cl. hystolyticum. Journal of Clinical Investigation, 32:1323.

Matsubara, H., and Feber, J. 1971. Other Bacetrial, Mold and Yeast Proteases. Enzymes. 3:721.

Matsumiya, M., Mochizuki, A., and Otake, S. 1989. Purification and Characterization of Cathepsin B from Ordinary Muscle of Common Mackerel (Scomber japonic us). Nippon Suisan Gakkaishi, 55(2):2185-2190.

McDonald, J.K., Ellis, S., and Reilly, T.J. 1966. Properties of Dipeptidyl Arylamidase I of the Pituitary. Chloride and Sulphydryl Activation of Seryltyrosyl-B,Naphthylamide Hydrolysis. Journal of Biological Chemistry. 242:1494.

McDonald, J.K., and Ellis, S. 1975. On the Sustrate Specificity of Cathepsin B1 and B2 including a New Fluorogenic Substrate fro Cathepsin B1. Life Sci. 17:1269.

McDonald, J.K., and Schwabe, C. 1977. Intracellular Exopeptidases. In "Proetinases in Mammalian Cells and Tissues" (A.J. Barret, ed), pg 331. North-Holland, Amsterdam.

McDonald, J.K., Ellis, S., and Reilly, T.J. 1968. Properties of Dipeptidyl arylamidase I of the Pituitary. Chloride and Sulphydryl Activation of Seryltyrosyl-ß-naftilamide Hydrolysis. J. Biol. Chem. 241:1494.

McDonald, J.K.,Leibach, F.H., Grindeland, R.E., and Ellis, S. 1968. Purification od Dipeptidyl aminopeptidase II (Dipeptidyl arylamidase I) of the Anterior Pituitary Gland. J. Biol. Chem. 243:4143.

McDonald, J.K., Callahan, P.X., Smith, R.E., and Ellis, S. 1971. Polypeptides Degradation by Dipeptidyl Aminopeptidase I (Cathepsin C) and Related Peptidases. In " Tissue Proteinases" (A.J. Barret and J.T. Dingle, eds.), pg 69. North-Holland, Amsterdam.

McDonald, J.K., Zeitmann, B.B., Callahan, P.X., and Ellis, S. 1974. Angiotensinase Activity of Dipeptidyl Aminopeptidase I (Cathepsin C) of Rat Liver. J. Biol. Chem. 249:234.

Metrione, R.M., Okuda, Y., and Fairclough, G.H. 1970. Subunit Structure of Dipeptidyl Transferase. Biochemistry, 9:2427.

Mihalyi, E. 1972. "Aplication of Proteolytic Enzymes to Protein Structures Studies". pg 39. CRC. Press, Cleveland, Ohio.

Misaka, E. and Tappel, A.L. 1971. Inhibition studies of Cathepsins A,B,C, and D from rat liver lysosomes. Comp. Biochem. Physiol. 38B:651.

Murakami, U., and Uchida, K. 1978. Purification and Characterization of a Myosin-cleaving Protease from Rat Heart myofibrils. Biochem. Biophys. Acta, 525:219.

Murakami, U., and Uchida, K. 1980. Ultrastructural Alteration of Rat Cardiac Myofibrils Caused by a Myosin-cleaving Protease. J. Biochem. (Tokyo), 86:553.

Noguchi, T., and Kandatsu, M. 1970. Autolytic Breakdown of Rat Skeletal Muscle Proteins in the Alkaline pH Range. Agric. Biol. Chem., 34:390.

Noguchi, T., and Kandatsu, M. 1971. Purification and Properties of a New Alkaline Protease of Rat Skeletal Muscle. Agric. Biol. Chem., 35:191092.

Otto, K. 1971. Cathepsin B1 and B2. In " Tissue Proteinases" (A.J. Barret and J.T. Dngle, eds.), pg 1. North-Holland, Amsterdam.

Otto, K., and Bhaki, S. 1969. Studies on Cathepsin B1:Specificity and Properties. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350:1577.

Parsons, M.E., and Pennington, R.J. 1976. Separation of Rat liver aminopeptidases. J. Biochem., 155:375.

Parsons, M.E., Parsons, R., and Pennington, R.J. 1976. Dipeptide Hydrolase Activities in Rat Muscle Cultures. Int. J. Biochem. 9:745.

Paterson, A.K., and Knowles, J.R. 1972. The Number of Catalytically Essential Carboxyl Groups in Pepsin. Eur. J. Biochem., 31:510.

Patterson, E.K., Hsiao, S.H., and Kepper, A. 1963. Studies od Dipeptidases and Aminopeptidases. 1. Distinction between Leucine Aminopeptidase and Enzyme thet Hydrolyzes L-leucil-ß-naftilamide. J. Biol. Chem., 238:3611.

Pluskal, M.G., and Pennington, R.J.T. 1973. Peptide Hydrolase in Red and White Muscle. Int. Res. Commun. Syst., 11:3.

Press, E.M., Porter, R.R., and Cebra, J. 1960. The Isolation and Properties of a Proteolytic Enzyme, Cathepsin D, from Bovine Spleen. J. Biochem., 74:501.

Quaglia, G.B. and Orban, E. 1990. Influence of Enzymatic Hydrolisis on Structure and Emulsifying Properties of Sardine (Sardina Pilchardus) Protein Hydrolysates. Journal of Food Science. 55(6): 1571.

Raymond, J. 1961. Organic Constituyents of Fish and Other Aquatic Animals Foods. In Fish as Food. Production, Biochemistry and Microbiology. Cap. 6 pp 145-192, by Georg Borgstrom (Ed.). Academic Press 111 Fifth Avenue, New York, New York. 10003.

Richardson, T. 1976. Enzymes. Cap. 6, pg 285-341. In Principles of Food Science, by Owen R. Fennema (Ed). Marcel Dekker, INC. New York and Basel, New York, 10016.

Rosen, H. 1957. A Modified Ninhydrin Colorimetric Analysisi for Amino Acids. Archives of Biochemistry and Biophysics, 67:10.

Schoellman, G. and Shaw, E.N. 1962. Enzyme Inhibitors, Cap.9, pg 271. In Principles of Enzymology for the Food Science, by John Whitaker (Ed). Marcel Dekker, INC, 270 Madison Avenue, New York, New York 10016.

Segel, I.H. 1976. Biochemical Calculations. How to Solve Mathematical Problems in General Biochemistry. by John Wiley and Sons, Inc (Editors), 2nd. Edition. New York, New York.

Seifter, S., and Harper, E. 1971. The Collagenases. Enzymes, 3:649.

Singer, S.J. 1967. Advances in Protein Chemistry 22(1). In Principles of Enzymology for the Food Sciences, by John Whitaker (Ed). Marcel Dekker, INC, 270 Madison Avenue, New York, New York 10016.

Shaw, E., Mares_Guia, M., and Cohen, W. 1965. Evidence for an Active-center Histidine in Trypsin through Use of a Specific Reagent. Biochemistry, 4:2219.

Sherekar, S.V., Gorre, M.S. and Ninjoor, V. 1988. Purification and Characterization of Cathepsin B, from the Skeletal Muscle of Frehwater Fish, Tilapia mossambica. Journal of Food Science, 53 (4):1018.

Shimizu, Y., Karata, S. and Nishioka, F. 1976. Protein Composition of Fish Meat. Cap. 1, pg 156. In Fish and Krill Protein: Processing Technology, by Taneko Susuki (Ed). Applied Science Publishers LTD. Ripple Road, Barking, Essex, England.

Shimizu, Y., Machida, R., and Takenami, S. 1981. Species Variations in the Gel-forming Characteristic of Fish Meat Paste. Bull. Jap. Soc. Fish. 47:95-104.

Siebert, G. 1958. Protein-Spliting Enzyme Activity in Fish. Experentia, 14:65-66.

Siebert, G., Schmitt, A., and Malorie, R.V. 1965. Reinigung und Eigenschaften von Dorschmuskel khatepsin, Hoppe-Seyler's z. Physiol. Chem., 342:20.

Smith, E.L. 1948a. The Glycylglycine Dipeptidases of Skeletal Muscle and Human Uterus. Journal of Biochemistry, 173:571.

Smith, E.L. 1948b. Studies on Dipeptidases. Journal of Biochemistry, 176:9, 21.

Smith, D.M. and Brekke, C.J. 1984. Functional Properties of Enzymatically Modified Beef Heart Protein. J. Food Science. 49:1525.

Susuki, A., and Goll, D.E., 1974. Quantitative assay for CASF (Ca_{++}-Activated Sarcoplasmic Factor) Activity, and effect of CASF Treatment on ATPase activities of rabbit myofibrils. Agr. Biol. Chem. 38:2167.

Susuki, T. 1981. Protein Composition of Fish Meat. Cap. 1, pg 1-56. In Fish and Krill Protein: Processing Technology, by Taneko Susuki (Ed). Applied Science Publishers LTD. Ripple Road, Barking, Essex, England.

Takahashi, K., Chang, W.J., and Ko, J.S. 1974. Specific Inhibition of Acid Proteases from Brain, Kidney, Skeletal Muscle, and Insectivorous Plants by Diazozetyl-DL-norleucine Methyl Ester and by Pepstatin. Journal of Biochemistry (Tokyo), 76:897.

Tallan, H.H., Jones, M.E., and Fruton, J.S. 1952. On the Proteolytic Enzymes of Animal Tissues. X. Beef Spleen Cathepsin C. J. Biol. Chem., 194:793.

Toyohara, H., Makinodan, Y., and Ikeda, S. 1982. Purification and properties of Carp Muscle, Cathepsin A. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 48:1145-1150.

Tsao, C.Y. and Nagayama, F. 1991. Purification and Characterization of Proteases from Oyster (*Crassotrea gigas*). Journal of Food Biochemistry, 15:81-96.

Tzong-Shin Lin and Tyre C. Lanier. 1980. Propierties of an Alkaline Protease from the Skeletal Muscle of Atlantic croaker. Journal of Food Biochemistry 4:17-28.

Umezawa, H., and Aoyagi, T. 1977. Activities of Proteinase Inhibitros of Microbial Origin. In "Proteinases in Mammalian Cells and Tissues" (A.J. Barret, ed), pg. 637. Elsevier, Amsterdam.

Valle, B.L. 1955. Zn and Metallo-enzymes. Edv. Protein Chem., 10:317.

Whitaker, 1972. Principles of Enzymology for the Food Sciences, by John Whitaker (Ed). Marcel Dekker, INC, 270 Madison Avenue, New York, New York 10016.

Yamahita, M, and Konogaya, S. 1991. Immunohistochemical Localization of Cathepsins B and L in the White Muscle of Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) in Spawning Migration: Probable Participation of Phagocytes Richin Cathepsins in Extensive Muscle Softening of the Matures Salmon. J. Agric. Food Chem. 39:1402.

Susuki, A., and Goll, D.E., 1974. Quantitative assay for CASF (Ca_{++}-Activated Sarcoplasmic Factor) Activity, and effect of CASF Treatment on ATPase activities of rabbit myofibrils. Agr. Biol. Chem. 38:2167.

Susuki, T. 1981. Protein Composition of Fish Meat. Cap. 1, pg 1-56. In Fish and Krill Protein: Processing Technology, by Taneko Susuki (Ed). Applied Science Publishers LTD. Ripple Road, Barking, Essex, England.

Takahashi, K., Chang, W.J., and Ko, J.S. 1974. Specific Inhibition of Acid Proteases from Brain, Kidney, Skeletal Muscle, and Insectivorous Plants by Diazozctyl-DL-norleucine Methyl Ester and by Pepstatin. Journal of Biochemistry (Tokyo), 76:897.

Tallan, H.H., Jones, M.E., and Fruton, J.S. 1952. On the Proteolytic Enzymes of Animal Tissues. X. Beef Spleen Cathepsin C. J. Biol. Chem., 194:793.

Toyohara, H., Makinodan, Y., and Ikeda, S. 1982. Purification and properties of Carp Muscle, Cathepsin A. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish, 48:1145-1150.

Tsao, C.Y. and Nagayama, F. 1991. Purification and Characterization of Proteases from Oyster (*Crassotrea gigas*). Journal of Food Biochemistry, 15:81-96.

Tzong-Shin Lin and Tyre C. Lanier. 1980. Propierties of an Alkaline Protease from the Skeletal Muscle of Atlantic croaker. Journal of Food Biochemistry 4:17-28.

Umezawa, H., and Aoyagi, T. 1977. Activities of Proteinase Inhibitros of Microbial Origin. In "Proteinases in Mammalian Cells and Tissues" (A.J. Barret, ed), pg. 637. Elsevier, Amsterdam.

Valle, B.L. 1955. Zn and Metallo-enzymes. Edv. Protein Chem., 10:317.

Whitaker, 1972. Principles of Enzymology for the Food Sciences, by John Whitaker (Ed). Marcel Dekker, INC, 270 Madison Avenue, New York, New York 10016.

Yamahita, M, and Konogaya, S. 1991. Immunohistochemical Localization of Cathepsins B and L in the White Muscle of Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) in Spawning Migration: Probable Participation of Phagocytes Richin Cathepsins in Extensive Muscle Softening of the Matures Salmon. J. Agric. Food Chem. 39:1402.