



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA.**

**PURIFICACIÓN PARCIAL Y CARACTERIZACIÓN DE  
PROTEASAS DEL PEPINO DE MAR *Isostichopus fuscus* Y  
ALGUNAS APLICACIONES.**

**TESIS PRESENTADA POR:**

M.C. ARISAÍ DEL CARMEN HERNÁNDEZ SÁMANO.

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA.

**DIRECTORA DE TESIS:**

DRA. ISABEL GUERRERO LEGARRETA.

**ASESORAS:**

DRA. RAQUEL GARCÍA BARRIENTOS.

DRA. XOCHITL GUZMÁN GARCÍA.

MÉXICO D.F., 2015.

El posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con categoría de alto nivel, con el convenio 471-0/Doctorado en Biotecnología.

La presente tesis se llevó a cabo con el apoyo de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

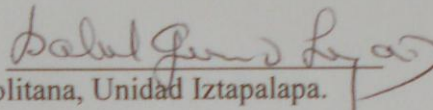
El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis que presentó:

**Arisaí del Carmen Hernández Sámano**

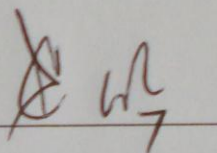
“PURIFICACIÓN PARCIAL Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS DEL PEPINO DE MAR *Isostichopus fuscus* Y ALGUNAS APLICACIONES”.

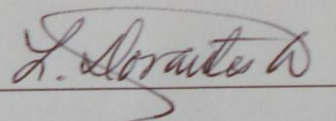
**El día 13 de Mayo del 2015.**

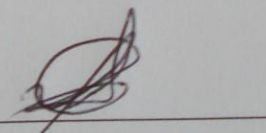
**Directora de la tesis:**

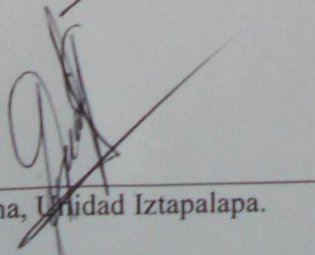
Dra. Isabel Guerrero Legarreta.   
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

**Miembros del jurado:**

Dr. Carlos Regalado González.   
Universidad Autónoma de Querétaro.  
Sinodal.

Dra. Lidia Dorantes Alvarez.   
Instituto Politécnico Nacional.  
Sinodal.

Dra. Raquel García Barrientos.   
Universidad Politécnica de Tlaxcala.  
Asesora.

Dra. Xochitl Guzmán García.   
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.  
Asesora.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco ampliamente a:

❖ **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).**

Por otorgarme una beca para realizar el Doctorado en Biotecnología.

❖ **Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I).** San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Del. Iztapalapa, C.P. 09340, México D.F., México.

Por haberme formado profesionalmente, de la mejor manera posible, durante el Doctorado en Biotecnología.

❖ **Coordinador del Posgrado en Biotecnología.**

Por haberme apoyado en los trámites establecidos del doctorado, y especialmente, por los trámites para la obtención de apoyos económicos para congresos y estancias de investigación.

- Dr. Francisco José Fernández Perrino.
- Dr. Héctor Escalona Buendía.

❖ **Comité tutorial.**

Por las asesorías y evaluaciones durante el Doctorado y por las revisiones de la presente tesis.

Directora:

- Dra. Isabel Guerrero Legarreta.

Asesoras:

- Dra. Xochitl Guzmán García.
- Dra. Raquel García Barrientos.

❖ **Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR).** Instituto Politécnico Nacional 195, C.P. 23096, La Paz, Baja California Sur, México.

Por haberme recibido durante dos estancias de investigación para realizar una parte del trabajo experimental del presente proyecto de Doctorado.

A mis tutores durante la estancia:

- Dr. Felipe Ascencio Valle.
- Dr. Arturo Sierra Beltrán.

❖ **Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM, CEI UAM+CSIC).** Nicolás Cabrera 9, 28049, Madrid, España.

Por haberme recibido durante una estancia de investigación para realizar una parte del trabajo experimental del presente proyecto de Doctorado.

A mis tutoras durante la estancia:

- Dra. Elena Molina Hernández.
- Dra. Blanca Hernández Ledesma.

❖ **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD).** Carretera a la Victoria Km. 0.6, C.P. 83304, Hermosillo, Sonora, México.

Por haberme recibido durante una estancia de investigación para realizar una parte del trabajo experimental del presente proyecto de Doctorado.

A mis tutores durante la estancia:

- Dr. Aarón Fernando González Córdoba.
- Dra. Belinda Vallejo Córdoba.
- Dra. María de Jesús Torres Llanez.

❖ **Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS).** Carretera al Sur Km 5.5, C.P. 23080, La Paz, Baja California Sur, México.

Por formar parte de mi educación al permitirme cursar parte de los créditos que constituyen el plan de estudios del Doctorado en Biotecnología de la UAM, con la materia “Equinodermos”.

- M.C. José Alfonso Vélez Barajas (Especialista en recursos bentónicos).

❖ **Miembros del jurado.**

Por la revisión, evaluación y comentarios sobre la presente tesis.

- Dr. Carlos Regalado González (Universidad Autónoma de Querétaro).
- Dra. Lidia Dorantes Alvarez (Instituto Politécnico Nacional).
- Dra. Raquel García Barrientos (Universidad Politécnica de Tlaxcala).
- Dra. Xochitl Guzmán García (Universidad Autónoma Metropolitana).
- Dr. Sergio Huerta Ochoa (Universidad Autónoma Metropolitana).

## DEDICATORIA

*Dedico la presente tesis de Doctorado en Biotecnología al lector que tenga interés en el tema y haya buscado como referencia este documento. Espero que dicho escrito aporte el conocimiento y experiencia necesarios para el desarrollo de proyectos futuros. Es un placer dedicar mi trabajo a la comunidad científica, una mínima contribución al mundo de la investigación, ya que la comprensión de los fenómenos bioquímicos de organismos marinos es compleja y es escasa comparada con lo que falta por dilucidar.*

*De la misma forma, dedico este trabajo a todos aquellos seres humanos que de alguna forma me brindaron apoyo y ayuda para llevar a cabo mis estudios de posgrado, la terminación del proyecto doctoral y la escritura de tesis. Principalmente a mi familia conformada por Andrés Hernández A., Honoria Sámano A., J. Nicolás Hernández R. y J. Nicolás Hernández S., y a todos mis amigos del laboratorio y externos, que sin su cariño y compañía esta meta sería insignificante en mi vida.*

*Arisaí del Carmen Hernández Sámano.*

## ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMEN</b> .....   | <b>18</b> |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>22</b> |
| <b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....  | <b>26</b> |
| <b>2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....  | <b>28</b> |
| 2.1. Características generales de <i>Isostichopus fuscus</i> .....                               | 28        |
| 2.1.1 Clasificación taxonómica.....  | 28        |
| 2.1.2 Características morfológicas externas e internas.....                                      | 28        |
| 2.1.3 Alimentación.....  | 30        |
| 2.1.4 Reproducción.....  | 30        |
| 2.1.5 Depredadores.....  | 31        |
| 2.1.6 Mecanismos de defensa y regeneración celular.....  | 31        |
| 2.1.7 Hábitat y distribución.....  | 32        |
| 2.1.8 Importancia ambiental.....   | 33        |
| 2.1.9 Importancia económica.....   | 34        |
| 2.1.10 Acuicultura de <i>I. fuscus</i> en México.....  | 35        |
| 2.1.11 Tecnología de productos de pepino de mar.....   | 36        |
| 2.1.12 Legislación para protección de <i>I. fuscus</i> en México.....                            | 37        |
| 2.1.13 Composición y valor nutricional.....  | 38        |
| 2.1.14 Compuestos bioactivos y actividad biológica.....  | 38        |
| 2.2 Enzimas proteolíticas de organismos marinos.....   | 40        |
| 2.2.1 Clasificación de proteasas.....  | 41        |
| 2.2.2 Purificación y caracterización de proteasas.....   | 42        |
| 2.2.3 Aplicaciones de proteasas.....   | 45        |
| 2.3 Hidrolizados de proteína.....  | 46        |
| 2.4 Péptidos bioactivos (Actividad antioxidante).....  | 46        |
| <b>3 ANTECEDENTES</b> .....  | <b>48</b> |
| <b>4 JUSTIFICACIÓN</b> .....   | <b>51</b> |
| <b>5 HIPÓTESIS</b> .....   | <b>51</b> |
| <b>6 OBJETIVOS</b> .....   | <b>51</b> |
| 6.1 Objetivo general.....  | 51        |
| 6.2 Objetivos particulares.....  | 51        |
| <b>7 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | <b>52</b> |
| 7.1 Obtención de especímenes.....  | 52        |
| 7.2 Análisis de especímenes.....   | 52        |
| 7.3 Análisis proximal.....   | 52        |
| 7.4 Obtención de extracto proteolítico crudo de los órganos de estudio de <i>I. fuscus</i> ..... | 53        |
| 7.5 Caracterización del extracto proteolítico.....   | 53        |
| 7.5.1 Concentración de proteína.....   | 54        |
| 7.5.2 Determinación de actividad proteolítica.....   | 54        |
| 7.5.3 Efecto del pH sobre la actividad proteolítica.....   | 54        |
| 7.5.4 Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica.....                              | 54        |
| 7.5.5 Cinética de inactivación térmica.....  | 55        |
| 7.5.6 Efecto de almacenamiento en refrigeración sobre la actividad proteolítica.....             | 55        |
| 7.5.7 Efecto de inhibidores de proteasas sobre la actividad proteolítica.....                    | 55        |
| 7.5.8 Efecto de iones sobre la actividad proteolítica.....                                       | 55        |
| 7.5.9 Análisis electroforéticos.....   | 56        |
| 7.5.9.1 SDS-PAGE.....  | 56        |
| 7.5.9.2 Zimografía.....  | 56        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 7.6      | Purificación parcial de proteasas.....  | 56        |
| 7.6.1    | Precipitación selectiva de proteínas. ....  | 57        |
| 7.6.2    | Ultrafiltración. ....   | 57        |
| 7.6.3    | Cromatografía de intercambio iónico.....  | 58        |
| 7.6.3.1  | Cromatografía de intercambio iónico en lote. ....   | 58        |
| 7.6.3.2  | Cromatografía de intercambio iónico por LPLC .....  | 58        |
| 7.7      | Purificación e identificación de proteínas por espectrometría de masas (HPLC-MS). ....  | 58        |
| 7.8      | Hidrólisis de proteína y gelatina del músculo de <i>I. fuscus</i> con extracto proteolítico de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> ..... | 59        |
| 7.8.1    | Obtención de proteína y gelatina del músculo de <i>I. fuscus</i> . ....   | 59        |
| 7.8.2    | Producción de hidrolizados de proteína y gelatina del músculo de <i>I. fuscus</i> . ....  | 59        |
| 7.8.3    | Determinación de capacidad antioxidante (ORAC). ....  | 60        |
| 7.8.4    | Purificación de péptidos con actividad antioxidante (RP-HPLC). ....   | 60        |
| 7.9      | Hidrólisis de proteínas de huevo y leche con extracto proteolítico de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> .....                          | 60        |
| 7.9.1    | Análisis electroforético (SDS-PAGE). ....   | 61        |
| 7.9.2    | Análisis por RP-HPLC. ....  | 61        |
| 7.10     | Análisis estadístico. ....  | 61        |
| 7.11     | Estrategia experimental. ....   | 62        |
| <b>8</b> | <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>  | <b>63</b> |
| 8.1      | Análisis de especímenes.....  | 63        |
| 8.2      | Análisis proximal. ....   | 64        |
| 8.3      | Caracterización de los extractos proteolíticos crudos. ....   | 64        |
| 8.3.1    | Determinación del tiempo de reacción con el extracto del músculo ventral. ....  | 64        |
| 8.3.2    | Determinación de concentración de proteína. ....  | 65        |
| 8.3.3    | Efecto del pH sobre la actividad proteolítica. ....   | 65        |
| 8.3.4    | Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica. ....  | 67        |
| 8.3.5    | Cinética de inactivación térmica. ....  | 69        |
| 8.3.6    | Efecto de almacenamiento en refrigeración sobre la actividad proteolítica. ....   | 71        |
| 8.3.7    | Efecto de inhibidores de proteasas sobre la actividad proteolítica. ....  | 72        |
| 8.3.8    | Efecto de iones sobre la actividad proteolítica. ....   | 74        |
| 8.3.9    | Análisis electroforético (SDS-PAGE y Zimografía). ....  | 77        |
| 8.4      | Purificación parcial de proteasas de los órganos de estudio de <i>I. fuscus</i> .....   | 79        |
| 8.4.1    | Estudio preliminar con extracto proteolítico del músculo ventral.....   | 79        |
| 8.4.1.1  | Precipitación selectiva de proteínas. ....  | 79        |
| 8.4.1.2  | Ultrafiltración. ....   | 80        |
| 8.4.2    | Cromatografía de intercambio aniónico en lote. ....   | 82        |
| 8.4.2.1  | Extracto proteolítico del músculo ventral de <i>I. fuscus</i> . ....  | 82        |
| 8.4.2.2  | Extracto proteolítico del tracto digestivo de <i>I. fuscus</i> . ....   | 84        |
| 8.4.2.3  | Extracto proteolítico de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> . ....  | 86        |
| 8.4.3    | Cromatografía de intercambio aniónico por LPLC.....   | 88        |
| 8.5      | Caracterización de extractos proteolíticos parcialmente purificados. ....   | 89        |
| 8.5.1    | Determinación de concentración de proteína. ....  | 89        |
| 8.5.2    | Efecto del pH sobre la actividad proteolítica. ....   | 90        |
| 8.5.3    | Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica. ....  | 92        |
| 8.5.4    | Análisis electroforético (SDS-PAGE y Zimografía). ....  | 94        |
| 8.6      | Purificación de proteínas por HPLC. ....  | 96        |
| 8.7      | Identificación de proteínas por espectrometría de masas (LC-MS). ....   | 100       |



|       |  |            |
|-------|--|------------|
| 8.8   | Hidrólisis de proteína y gelatina del músculo de <i>I. fuscus</i> con extracto proteolítico de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> y determinación de actividad antioxidante..... | 102        |
| 8.8.1 | Purificación de péptidos con actividad antioxidante (RP-HPLC).....   | 104        |
| 8.9   | Hidrólisis de proteínas de huevo y leche con extracto proteolítico de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> .....   | 106        |
| 8.9.1 | Hidrólisis de ovoalbúmina. ....  | 107        |
| 8.9.2 | Hidrólisis de caseína.....   | 108        |
|       | <b>CONCLUSIÓN GENERAL</b> .....  | <b>112</b> |
|       | <b>PERSPECTIVAS</b> .....  | <b>113</b> |
|       | <b>PRODUCTIVIDAD ACADÉMICA</b> .....   | <b>114</b> |
|       | <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....  | <b>116</b> |
|       | <b>ANEXOS</b> .....  | <b>139</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla |   | Página |
|-------|---|--------|
| 1     | Compuestos bioactivos de pepinos de mar y su actividad biológica.   | 39     |
| 2     | Características fisicoquímicas de proteasas de organismos marinos y terrestres.   | 41     |
| 3     | Antecedentes de purificación de enzimas proteolíticas del pepino de mar <i>S. japonicus</i> .   | 49     |
| 4     | Cantidades de sulfato de amonio por litro para precipitación selectiva de proteínas.  | 57     |
| 5     | Análisis proximal del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> .   | 64     |
| 6     | Concentración de proteína de extractos proteolíticos crudos de <i>I. fuscus</i> .   | 65     |
| 7     | Tiempo de vida media a 60°C de extractos proteolíticos crudos de <i>I. fuscus</i> .   | 71     |
| 8     | Efecto de inhibidores de proteasas sobre la actividad de extractos proteolíticos crudos de <i>I. fuscus</i> .   | 73     |
| 9     | Efecto de iones (10 mM) sobre la actividad de extractos proteolíticos crudos de <i>I. fuscus</i> .  | 74     |
| 10    | Interpretación del efecto de iones sobre la actividad de extractos proteolíticos de <i>I. fuscus</i> .  | 75     |
| 11    | Concentración de proteína de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del músculo ventral de <i>I. fuscus</i> obtenidas por precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .   | 79     |
| 12    | Parámetros de recuperación de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del músculo ventral de <i>I. fuscus</i> obtenidas por precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .  | 80     |
| 13    | Concentración de proteína de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del músculo ventral de <i>I. fuscus</i> obtenidas por precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y ultrafiltración.  | 80     |
| 14    | Parámetros de recuperación de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del músculo ventral de <i>I. fuscus</i> obtenidas por precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y ultrafiltración.   | 81     |
| 15    | Concentración de proteína de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del músculo ventral de <i>I. fuscus</i> obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y ultrafiltración.   | 82     |
| 16    | Parámetros de recuperación de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del músculo ventral de <i>I. fuscus</i> obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y ultrafiltración.  | 83     |
| 17    | Concentración de proteína de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del tracto digestivo de <i>I. fuscus</i> obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y ultrafiltración.  | 84     |
| 18    | Parámetros de recuperación de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del tracto digestivo de <i>I. fuscus</i> obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y ultrafiltración. | 85     |

| <b>Tabla</b> |  | <b>Página</b> |
|--------------|--|---------------|
| 19           | Concentración de proteína de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y ultrafiltración.  | 86            |
| 20           | Parámetros de recuperación de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y ultrafiltración. | 87            |
| 21           | Concentración de proteína de extractos parcialmente purificados de <i>I. fuscus</i> por LPLC.  | 89            |
| 22           | Esquema de purificación de proteasas de <i>I. fuscus</i> .   | 100           |
| 23           | Proteasas de <i>I. fuscus</i> identificadas por espectrometría de masas (LC-MS).   | 101           |
| 24           | Actividad antioxidante de hidrolizados de proteína muscular de <i>I. fuscus</i> .  | 102           |
| 25           | Actividad antioxidante de hidrolizados de proteína y gelatina muscular de <i>I. fuscus</i> a 24 h.   | 102           |
| 26           | Actividad antioxidante de péptidos de proteína muscular de <i>I. fuscus</i> .  | 103           |
| 27           | Actividad antioxidante de los péptidos de la fracción menor a 3 kDa del hidrolizado de proteína muscular de <i>I. fuscus</i> (E:S=1:1, 24 h).  | 104           |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura |   | Página |
|--------|---|--------|
| 1      | Morfología externa de <i>I. fuscus</i> , ejemplar del complejo insular Espíritu Santo del Golfo de California (México).   | 29     |
| 2      | Representación esquemática de la morfología interna de <i>I. fuscus</i> .   | 29     |
| 3      | Morfología externa de <i>I. fuscus</i> juvenil.   | 31     |
| 4      | Áreas de captura de <i>I. fuscus</i> en Baja California (México).   | 33     |
| 5      | Preparaciones culinarias de pepino de mar.  | 34     |
| 6      | Estación de proceso de pepino de mar en Nueva Caledonia, Madagascar y Papúa-Nueva Guinea.   | 37     |
| 7      | Morfología externa de pepinos de mar <i>I. fuscus</i> capturados en el Golfo de California (México).  | 63     |
| 8      | Espículas de <i>I. fuscus</i> .   | 63     |
| 9      | Actividad específica del extracto proteolítico crudo del músculo ventral de <i>I. fuscus</i> en función del tiempo de reacción.   | 64     |
| 10     | Efecto del pH sobre la actividad de extractos proteolíticos crudos de <i>I. fuscus</i> .  | 66     |
| 11     | Estabilidad al pH de extractos proteolíticos crudos de <i>I. fuscus</i> .   | 66     |
| 12     | Efecto de la temperatura sobre la actividad de extractos proteolíticos crudos de <i>I. fuscus</i> .   | 68     |
| 13     | Estabilidad térmica de extractos proteolíticos crudos de <i>I. fuscus</i> .   | 68     |
| 14     | Cinética de inactivación térmica a 70°C de extractos proteolíticos crudos de <i>I. fuscus</i> .   | 70     |
| 15     | Efecto de almacenamiento en refrigeración (4°C) sobre la actividad enzimática de extractos proteolíticos crudos de <i>I. fuscus</i> .   | 71     |
| 16     | SDS-PAGE y zimografía del extracto proteolítico crudo del músculo ventral de <i>I. fuscus</i> .   | 77     |
| 17     | SDS-PAGE y zimografía del extracto proteolítico crudo del tracto digestivo de <i>I. fuscus</i> .  | 78     |
| 18     | SDS-PAGE y zimografía del extracto proteolítico crudo de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> .   | 78     |
| 19     | Actividad específica de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del músculo ventral de <i>I. fuscus</i> obtenidas por precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .  | 79     |
| 20     | Actividad específica de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del músculo ventral de <i>I. fuscus</i> obtenidas por precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y ultrafiltración.   | 81     |
| 21     | Actividad específica (pH 8) de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del músculo ventral de <i>I. fuscus</i> obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y ultrafiltración. | 82     |

| <b>Figura</b> |  | <b>Página</b> |
|---------------|--|---------------|
| 22            | Actividad específica (pH 6-10) de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del músculo ventral de <i>I. fuscus</i> obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y ultrafiltración.  | 83            |
| 23            | Actividad específica (pH 8) de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del tracto digestivo de <i>I. fuscus</i> obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y ultrafiltración.    | 84            |
| 24            | Actividad específica (pH 6-10) de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del tracto digestivo de <i>I. fuscus</i> obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y ultrafiltración. | 85            |
| 25            | Actividad específica (pH 8) de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y ultrafiltración.       | 86            |
| 26            | Actividad específica (pH 6-10) de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y ultrafiltración.    | 87            |
| 27            | Perfil cromatográfico (LPLC) del extracto proteolítico parcialmente purificado del músculo ventral de <i>I. fuscus</i> .   | 88            |
| 28            | Perfil cromatográfico (LPLC) del extracto proteolítico parcialmente purificado del tracto digestivo de <i>I. fuscus</i> .  | 88            |
| 29            | Perfil cromatográfico (LPLC) del extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> .   | 89            |
| 30            | Efecto del pH sobre la actividad proteolítica de extractos parcialmente purificados de <i>I. fuscus</i> .  | 90            |
| 31            | Efecto de la temperatura, a pH 6, sobre la actividad proteolítica de extractos parcialmente purificados de <i>I. fuscus</i> .  | 92            |
| 32            | Efecto de la temperatura, a pH 8, sobre la actividad proteolítica de extractos parcialmente purificados de <i>I. fuscus</i> .  | 93            |
| 33            | SDS-PAGE del extracto proteolítico parcialmente purificado del músculo ventral de <i>I. fuscus</i> . Tinción con azul de Coomassie.  | 94            |
| 34            | SDS-PAGE del extracto proteolítico parcialmente purificado del músculo ventral de <i>I. fuscus</i> . Tinción con plata.  | 94            |
| 35            | Zimografía del efecto del pH sobre la actividad del extracto proteolítico parcialmente purificado del músculo ventral de <i>I. fuscus</i> (hidrólisis de caseína, 60°C).   | 95            |
| 36            | Zimografía de la estabilidad térmica del extracto proteolítico parcialmente purificado del músculo ventral de <i>I. fuscus</i> (hidrólisis de caseína, pH 6, 60°C). Preincubación 1 h.   | 95            |
| 37            | SDS-PAGE de los extractos proteolíticos parcialmente purificados de los tentáculos y tracto digestivo de <i>I. fuscus</i> . Tinción en plata.  | 95            |

| <b>Figura</b> |   | <b>Página</b> |
|---------------|---|---------------|
| 38            | Zimografía de los extractos proteolíticos parcialmente purificados de los tentáculos y tracto digestivo de <i>I. fuscus</i> (hidrólisis de caseína, pH 6, 60°C).  | 96            |
| 39            | Perfil cromatográfico (RP-HPLC) del extracto proteolítico parcialmente purificado del músculo ventral de <i>I. fuscus</i> y actividad específica de las fracciones purificadas.                                   | 96            |
| 40            | Perfil cromatográfico (RP-HPLC) de la fracción purificada “IV” del extracto proteolítico parcialmente purificado del músculo ventral de <i>I. fuscus</i> y actividad específica de las subfracciones purificadas. | 97            |
| 41            | Perfil cromatográfico (RP-HPLC) del extracto proteolítico parcialmente purificado del tracto digestivo de <i>I. fuscus</i> y actividad específica de las fracciones purificadas.                                  | 97            |
| 42            | Perfil cromatográfico (RP-HPLC) de la fracción purificada “9” del extracto proteolítico parcialmente purificado del tracto digestivo de <i>I. fuscus</i> y actividad específica de la subfracción purificada.     | 98            |
| 43            | Perfil cromatográfico (RP-HPLC) del extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> y actividad específica de las fracciones purificadas.                                     | 98            |
| 44            | Perfil cromatográfico (RP-HPLC) de la fracción purificada “I” del extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> y actividad específica de la subfracción purificada.        | 99            |
| 45            | Perfil cromatográfico (RP-HPLC) de la fracción purificada “E” del extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> y actividad específica de la subfracción purificada.        | 99            |
| 46            | Actividad antioxidante de la fracción menor a 3 kDa del hidrolizado de proteína muscular de <i>I. fuscus</i> (E:S=1:1, a 24 h).   | 103           |
| 47            | Perfil cromatográfico de la fracción menor a 3 kDa del hidrolizado de proteína muscular de <i>I. fuscus</i> (E:S=1:1, 24 h) para la purificación de los péptidos.   | 104           |
| 48            | Actividad antioxidante del péptido “II” de la fracción menor a 3 kDa del hidrolizado de proteína muscular de <i>I. fuscus</i> (E:S=1:1, 24 h).  | 104           |
| 49            | SDS-PAGE de hidrolizados de proteínas de huevo y leche generados por hidrólisis con extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> .   | 106           |
| 50            | Densitogramas de perfiles electroforéticos de hidrolizados de proteínas de huevo y leche generados por hidrólisis con extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> .       | 106           |
| 51            | SDS-PAGE de hidrolizados de ovoalbúmina generados por hidrólisis con extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> .  | 107           |
| 52            | Perfil cromatográfico (RP-HPLC) de hidrolizados de ovoalbúmina generados por hidrólisis con extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> .                                 | 108           |

| <b>Figura</b> |   | <b>Página</b> |
|---------------|---|---------------|
| 53            | SDS-PAGE de hidrolizados de caseína generados por hidrólisis con extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> .                        | 109           |
| 54            | Perfil cromatográfico (RP-HPLC) de hidrolizados de caseína generados por hidrólisis con extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> . | 109           |
| 55            | Perfil cromatográfico (RP-HPLC) de hidrolizados de caseína generados por hidrólisis con extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> . | 110           |
| 56            | SDS-PAGE de hidrolizados de caseína generados por hidrólisis con extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> .                        | 110           |
| 57            | Perfil cromatográfico (RP-HPLC) de hidrolizados de caseína generados por hidrólisis con extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de <i>I. fuscus</i> . | 111           |

## ÍNDICE DE ANEXOS

| Anexo |  | Página |
|-------|--|--------|
| 1     | Curvas estándar para la determinación de concentración de proteína.  | 140    |
| 2     | Análisis de especímenes <i>I. fuscus</i> recolectados en el Golfo de California.   | 141    |
| 3     | Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey de la actividad de extractos proteolíticos crudos del músculo ventral de <i>I. fuscus</i> en función del tiempo de reacción. | 141    |
| 4     | Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey del efecto del pH sobre la actividad de extractos proteolíticos crudos de <i>I. fuscus</i> .                                 | 142    |
| 5     | Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey de la estabilidad al pH de extractos proteolíticos crudos de <i>I. fuscus</i> .  | 142    |
| 6     | Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey del efecto de la temperatura sobre la actividad de extractos proteolíticos crudos de <i>I. fuscus</i> .                      | 143    |
| 7     | Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey de la estabilidad a la temperatura de extractos proteolíticos crudos de <i>I. fuscus</i> .                                   | 143    |
| 8     | Cálculo de tiempo de vida media de extractos proteolíticos crudos de <i>I. fuscus</i> .  | 144    |
| 9     | Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey del efecto de almacenamiento en refrigeración sobre la actividad de extractos proteolíticos crudos de <i>I. fuscus</i> .     | 144    |
| 10    | Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey del efecto de inhibidores de proteasas sobre la actividad de extractos proteolíticos crudos de <i>I. fuscus</i> .            | 145    |
| 11    | Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey del efecto de iones sobre la actividad de extractos proteolíticos crudos de <i>I. fuscus</i> .                               | 146    |
| 12    | Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey de actividad de extractos proteolíticos parcialmente purificados de <i>I. fuscus</i> .                                       | 146    |
| 13    | Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey del efecto del pH sobre la actividad de extractos proteolíticos parcialmente purificados de <i>I. fuscus</i> .               | 147    |
| 14    | Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey del efecto de la temperatura sobre la actividad de extractos proteolíticos parcialmente purificados de <i>I. fuscus</i> .    | 147    |
| 15    | Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey de purificación de proteínas de <i>I. fuscus</i> por HPLC.   | 148    |
| 16    | Curvas de calibración e hidrolizados de proteína del músculo de <i>I. fuscus</i> para el cálculo de actividad antioxidante.  | 149    |
| 17    | Curvas de calibración e hidrolizados de proteína y gelatina del músculo de <i>I. fuscus</i> para el cálculo de actividad antioxidante.   | 150    |
| 18    | Curvas de calibración y péptidos de hidrolizado de proteína del músculo de <i>I. fuscus</i> para el cálculo de actividad antioxidante.   | 151    |
| 19    | Curvas de calibración y péptidos purificados de hidrolizado de proteína del músculo de <i>I. fuscus</i> para el cálculo de actividad antioxidante.   | 152    |



## ABREVIATURAS

| Abreviatura           | Significado   |
|-----------------------|---|
| U/mg                  | Actividad específica= unidad de actividad proteolítica (U)/mg de proteína.  |
| Kd                    | Constante de inactivación enzimática aparente.  |
| $t_{1/2}$             | Tiempo de vida.   |
| AUC                   | Área bajo la curva “Area under the curve” (de cinética de fluorescencia).   |
| Net AUC               | Área bajo la curva neta.  |
| PMSF                  | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.  |
| TLCK                  | Na-tosil-L-lisin clorometilcetona.  |
| TI                    | Inhibidor de tripsina.  |
| EDTA                  | Ácido etilen diamino tetra acético.   |
| MWCO                  | Corte de peso molecular “Molecular weight cut off”.   |
| SDS-PAGE              | Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio “Dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”.  |
| LPLC                  | Cromatografía líquida de baja presión “Low pressure liquid chromatography”.   |
| RP-HPLC               | Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa “Reverse phase-High resolution liquid chromatography”.   |
| LC-MS<br>ó HPLC-MS    | Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas “Liquid chromatography-Mass spectrometry”.   |
| ORAC-FL               | Capacidad de absorción de radicales de oxígeno-fluoresceína “Oxygen radical absorbance capacity-fluorescein”.   |
| LDTI                  | “Leech derived tryptase inhibitor”.   |
| F1                    | Fracción no retenida por cromatografía de intercambio aniónico en lote.   |
| F2                    | Fracción eluida con NaCl 0.25 M por cromatografía de intercambio aniónico en lote.  |
| F3                    | Fracción eluida con NaCl 0.50 M por cromatografía de intercambio aniónico en lote.  |
| F2 pp.60%<br>>100 kDa | Fracción eluida con NaCl 0.25 M por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitada con sulfato de amonio saturado al 60%, con peso molecular mayor a 100 kDa. |
| F3 pp.60%<br>>100 kDa | Fracción eluida con NaCl 0.50 M por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitada con sulfato de amonio saturado al 60%, con peso molecular mayor a 100 kDa. |

## RESUMEN

Los organismos marinos se han adaptado a diferentes condiciones ambientales a través del tiempo, estas adaptaciones se han traducido en proteasas con propiedades únicas. Los pepinos de mar son invertebrados del fondo marino apreciados en la gastronomía oriental por su alto valor nutricional y compuestos bioactivos. Dichos organismos poseen un importante carácter autolítico, lo que ha motivado el estudio de sus enzimas proteolíticas. No obstante, hasta el momento no existen reportes acerca de las proteasas de *Isostichopus fuscus*, una de las especies de pepino de mar más abundantes en México. Por lo tanto, el objetivo de la presente tesis fue purificar parcialmente y caracterizar extractos proteolíticos de diferentes órganos de *I. fuscus* del Golfo de California (México) y estudiar su capacidad para generar hidrolizados de proteínas. Se capturaron 12 especímenes y se observaron sus características morfológicas externas, se analizaron las espículas presentes y se determinaron los parámetros morfométricos. Los pepinos de mar se disectaron en músculo ventral, tracto digestivo y tentáculos para la determinación del contenido de proteína y obtención de extractos proteolíticos crudos para su caracterización enzimática, en la que se determinó: el pH óptimo de actividad proteolítica, la estabilidad al pH, la temperatura óptima de actividad, la estabilidad a la temperatura, el efecto de almacenamiento a 4°C, cinéticas de desnaturalización térmica, el tiempo de vida media, el efecto de inhibidores de proteasas, el efecto de iones metálicos, el peso molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), y la identificación de actividad proteolítica por zimografía (hidrólisis de caseína 2% a pH 6 y 60°C). Además, se purificaron parcialmente los tres extractos proteolíticos crudos obtenidos, se determinó el efecto del pH y la temperatura sobre su actividad proteolítica, y se estimó el peso molecular de las proteasas presentes por SDS-PAGE. La purificación parcial de los tres extractos proteolíticos se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónico, en lote y por cromatografía líquida de baja presión (LPLC) (elución con NaCl 0.5 M). El extracto proteolítico del músculo ventral, adicionalmente, se sometió a precipitación de proteínas con sulfato de amonio saturado al 60% y ultrafiltración con membranas de 100 kDa (recuperando las proteasas mayores a 100 kDa), debido a que con esa combinación de métodos de purificación se obtuvo mayor actividad proteolítica durante estudios preliminares. Posteriormente, los extractos proteolíticos parcialmente purificados fueron purificados por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) registrando su actividad proteolítica, factor de purificación y porcentaje de recuperación, asimismo se determinó la homología de las proteasas purificadas de *I. fuscus* con otras proteasas por medio de espectrometría de masas (MS). Finalmente, se utilizó el extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos para generar hidrolizados de proteína. Los hidrolizados de proteína se obtuvieron a partir del músculo dorsal de *I. fuscus*, de dos proteínas del huevo (ovoalbúmina y lisozima) y dos proteínas lácteas (caseína y  $\beta$ -lactoglobulina). Los hidrolizados de proteína fueron generados con diferentes relaciones enzima:sustrato y tiempos de hidrólisis. En el caso de los hidrolizados del músculo dorsal se midió la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) de los péptidos generados, seleccionando el hidrolizado con mayor valor de ORAC para la purificación del péptido con mayor capacidad antioxidante, la cual consto de ultrafiltración con membranas de 3 kDa y RP-HPLC. En el caso de los hidrolizados de las proteínas de huevo y leche, los péptidos generados se analizaron por SDS-PAGE y RP-HPLC, seleccionando las proteínas con mayor hidrólisis.

Las características morfológicas externas y el análisis de espículas confirmaron el género y la especie de *I. fuscus*, el peso y longitud promedios fueron de 380 g y 23.3 cm correspondientes a especímenes adultos de 5 a 7 años de edad. Se determinó 21% de proteína en el músculo ventral, 32% en el tracto digestivo y 15% en los tentáculos, similar a lo reportado para *Isostichopus badiotus*. El extracto proteolítico crudo del músculo ventral presentó actividad óptima a pH 2, 6, y 8 (37°C). Los extractos proteolíticos crudos del tracto digestivo y de los tentáculos coincidieron en el pH óptimo de actividad, presentando actividad máxima a pH 6 y 8 (37°C). Los extractos proteolíticos crudos de las tres regiones estudiadas presentaron estabilidad en un intervalo de pH entre 2 y 8. El músculo ventral a pH 2-6 (67-80% de actividad residual, excepto a pH 3 con 48% de actividad residual); el tracto digestivo a pH 2-4 y 8 (88-95% de actividad residual); y los tentáculos a pH 3-5 y 7 (91-95% de actividad residual). De manera análoga, las temperaturas óptimas de actividad proteolítica de los extractos proteolíticos crudos fueron 40-60°C; 40 y 70 °C; y 60°C, respectivamente. Adicionalmente, se observó que a bajas temperaturas, entre 0 y 10 °C, los tres extractos proteolíticos estudiados presentaron actividad proteolítica, ésta es una característica relevante debido a que permitiría un menor gasto de energía ya que no sería necesario elevar la temperatura para alcanzar alta actividad proteolítica. Los extractos proteolíticos fueron estables a temperaturas entre 10 y 50°C; el músculo ventral de 20-30°C (91-100% de actividad residual); el tracto digestivo de 30-50°C (85-89% de actividad residual); y los tentáculos a 10 y 30 °C (85-86% de actividad residual); por lo que el tracto digestivo fue el más estable a alta temperatura. Los extractos proteolíticos crudos presentaron actividades residuales de 52% para el músculo ventral, 41% para el tracto digestivo y 66% para los tentáculos, después de permanecer 22 días a 4°C. Además, todos los extractos proteolíticos presentaron hasta 79% de actividad residual al incubarse por 1 h a 70°C con tiempos de vida media alrededor de 3 h; el extracto del músculo ventral fue el más estable a la desnaturalización térmica con tiempo de vida media de 3.5 h, seguido del extracto del tracto digestivo con 3.1 h y de los tentáculos con 2.6 h. No obstante, no es posible establecer la resistencia de una proteasa específica a la desnaturalización por calor, debido a que se emplearon extractos crudos donde están presentes diferentes enzimas proteolíticas. El comportamiento de los extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus* ante el pH y temperatura, indicó que las proteasas de *I. fuscus* tienen mayor estabilidad a pH y temperatura que lo reportado para el pepino de mar *Stichopus japonicus*, sugiriendo que las características de las proteasas de *I. fuscus* están ligadas a las diferencias que existen entre dichas especies y los hábitats en que se desarrollan. A pH 6, el extracto proteolítico crudo del músculo ventral fue parcialmente inhibido con pepstatina A (68% de actividad residual) y  $\beta$ -mercaptoetanol (76% de actividad residual); el extracto proteolítico del tracto digestivo fue parcialmente inhibido con PMSF (79% de actividad residual) y pepstatina A (81% de actividad residual); y el extracto proteolítico de los tentáculos fue parcialmente inhibido con TLCK (79% de actividad residual) y pepstatina A (83% de actividad residual). Por lo tanto, se sugirió la presencia predominante de aspartil y cisteín proteasas en el extracto proteolítico del músculo ventral, y en los extractos proteolíticos del tracto digestivo y de los tentáculos, la presencia de serín y aspartil proteasas. A pH 8, los extractos proteolíticos crudos mostraron inhibición significativa con EDTA (actividades residuales de 41% para músculo ventral, 71% para tracto digestivo y 81% para tentáculos) y TI (actividades residuales de 54% para músculo ventral, 75% para tracto digestivo y 82% para tentáculos). Por lo tanto, los resultados anteriores sugirieron la presencia predominante de metalo proteasas en los tres extractos proteolíticos.

La actividad de las proteasas del extracto del músculo ventral se inhibió cerca de la mitad con  $\text{Cu}^{2+}$  (42% de actividad residual) y  $\text{Mn}^{2+}$  (59% de actividad residual), mientras que  $\text{Hg}^{2+}$  aumentó 16% la actividad proteolítica; el extracto proteolítico del tracto digestivo presentó la menor actividad residual con  $\text{Ba}^{2+}$  (75%), mientras que el  $\text{Ca}^{2+}$  aumentó 1% la actividad proteolítica; y el extracto proteolítico de los tentáculos se inhibió parcialmente con  $\text{Ba}^{2+}$  (71% de actividad residual). El extracto proteolítico del músculo ventral presentó una proteína predominante de 180 kDa; en el extracto del tracto digestivo se identificaron dos proteínas de 109 y 39-42 kDa; y en el extracto de los tentáculos tres proteínas de 106, 68 y 39 kDa. Los estudios de zimografía mostraron la presencia de proteasas en los tres extractos proteolíticos. Con base en los resultados obtenidos en los estudios de efecto de iones sobre las proteasas y electroforesis, se sugirió la presencia de cisteín y metalo proteasas en los tres extractos proteolíticos crudos.

Los tres extractos proteolíticos parcialmente purificados mostraron actividades óptimas en los siguientes valores o intervalos de pH: pH 6-8 y pH 10 para el músculo ventral; pH 6 y pH 8-9 para el tracto digestivo; y pH 6-8 para los tentáculos; similar a lo reportado para *S. japonicus*. El pH del agua donde habitan los pepinos de mar podría influir en el comportamiento de sus enzimas digestivas como se ha demostrado para otras especies marinas, el pH para el cultivo óptimo de *I. fuscus* es de 8.4-8.5. Asimismo, la tendencia del aumento de la actividad proteolítica hacia pH alcalino podría explicarse debido a que los pepinos de mar se alimentan de forma constante y por tanto ingiere grandes cantidades de agua de mar la cual se encuentra a pH neutro, así como al tipo de alimentación, ya que se ha demostrado que factores tales como características fisiológicas y régimen nutricional influyen en la actividad de las enzimas digestivas de especies marinas. Las temperaturas a las que se presentaron las actividades proteolíticas óptimas, a pH 6, de los extractos proteolíticos parcialmente purificados del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos fueron 50°C, 60°C, 10°C, respectivamente; mientras que las actividades proteolíticas óptimas a pH 8 se observaron a 10°C para el músculo ventral; 50°C para el tracto digestivo; y 30 y 50 °C para los tentáculos. En general, las proteasas de *I. fuscus* mostraron actividad óptima a temperaturas más altas que las proteasas de *S. japonicus*, posiblemente por las características fisicoquímicas del medio ambiente en que se desarrolla, ya que *S. japonicus* habita en ambientes con temperaturas de 3°C a 26°C, e *I. fuscus* puede vivir en aguas de 8°C a más de 30°C. Se ha reportado que la temperatura óptima de las proteasas de organismos marinos generalmente varía con el tipo de órganos y especies. En el mismo contexto, en los pH's y temperaturas estudiados, el extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos mostró mayor actividad proteolítica que los otros extractos estudiados, lo que sugirió un sistema alternativo de digestión ya que el pepino de mar es capaz de expulsar sus órganos internos (como método de defensa) y regenerarlos. Se identificó una proteasa con peso molecular estimado entre 46 y 49 kDa en los tres extractos proteolíticos parcialmente purificados (músculo ventral, 49 kDa; tracto digestivo, 47 kDa; tentáculos, 46 kDa). Los resultados coincidieron con lo reportado para cisteín y metalo proteasas de *S. japonicus*.

Los extractos proteolíticos purificados del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos presentaron actividades específicas de 17252 U/mg, 7504 U/mg, y 3907 U/mg, con factores de purificación de 26.6, 28.2, y 12.2, y recuperación del 0.5%, 1.2%, y 1.7%, respectivamente.

Se encontró ligera homología con tripsina y complejo tripsina-inhibidor de triptasa (LDTI, “Leech derived tryptase inhibitor”), sin embargo, al no tener homología con serín, aspartil, cisteín o metalo proteasas previamente descritas, se sugirió que pueden tratarse de nuevos miembros del grupo de las proteasas.

El hidrolizado de proteína muscular de *I. fuscus* generado con el extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus*, tuvo mayor actividad antioxidante con una relación enzima:sustrato de 1:1 por 24 h. La fracción con peso molecular menor a 3kDa de dicho hidrolizado tuvo una capacidad antioxidante de 0.92  $\mu\text{mol}_{\text{Trolox}}/\text{mg}_{\text{proteína}}$  (valor de ORAC), coincidiendo con el efecto antioxidante del Trolox (antioxidante sintético). El péptido purificado de dicha fracción tuvo un valor de ORAC de 0.74  $\mu\text{mol}_{\text{Trolox}}/\text{mg}_{\text{proteína}}$ . La producción de péptidos antioxidantes a partir del músculo de *I. fuscus* autolizado o de baja calidad puede ser una alternativa para aprovechar este recurso.

Por otra parte, la ovoalbúmina y la caseína tuvieron mayor hidrólisis con el extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus* (relación enzima:sustrato 1:2, v/v) comparado con la hidrólisis de lisozima y  $\beta$ -lactoglobulina. Se obtuvieron péptidos de ovoalbúmina de 30-36 kDa a 60°C por 24 h, y péptidos de 8-30 y 33.8 kDa a 7°C por 48 h; y en la hidrólisis de caseína se obtuvieron péptidos de 10-20 y menor a 10 kDa a 60°C por 24 h, tres péptidos de 10.6, 11.3, y 7.2 kDa a 7°C por 24 h y un péptido de 7.2 kDa a 7°C por 48 h. La caseína se hidrolizó nuevamente pero a una relación enzima:sustrato mayor (1:4, v/v) generándose péptidos de 14.2, 17.6 y 19.5 kDa a 7 y 60 °C por 24 h, y un péptido de 14.2 kDa a 7°C por 48 h. Existen escasos reportes sobre hidrólisis de ovoalbúmina y caseína a baja temperatura. El presente estudio puede ser relevante, una vez estudiada la inmunorespuesta de los hidrolizados obtenidos, debido a que una parte de la población pediátrica es alérgica a las proteínas de leche y/o huevo. Además, los péptidos generados en la hidrólisis de caseína y ovoalbúmina podrían poseer actividades biológicas benéficas.

En conclusión, se observó la presencia de proteasas estables al pH, a la temperatura y al almacenamiento en refrigeración, y con actividad proteolítica a baja temperatura, lo que genera ventajas en su utilización. En el mismo contexto, el estudio del extracto proteolítico de los tentáculos de *I. fuscus* es una aportación novedosa ya que hasta el momento se desconocen reportes sobre proteasas de los tentáculos de pepinos de mar. Adicionalmente, no se ha reportado la presencia de péptidos antioxidantes en hidrolizados de proteína de *I. fuscus*, ni la generación de hidrolizados de proteínas (en este caso, proteína muscular de *I. fuscus*, y proteínas de huevo y leche) con proteasas de pepino de mar.



## ABSTRACT

Marine organisms have adapted to different environmental conditions over time, these adaptations have resulted in protease with unique properties. Sea cucumbers are marine invertebrates appreciated in oriental gastronomy for its high nutritional value and bioactive compounds. These organisms have an important autolytic character, which has motivated the study of its proteolytic enzymes. However, so far there are no reports about proteases from *Isostichopus fuscus*, one species of sea cucumber most abundant in Mexico. Therefore, the objective of this thesis was to partially purify and characterize the proteolytic extracts from different organs of *I. fuscus* from Gulf California (Mexico) and test their ability to generate protein hydrolysates.

12 specimens were collected and external morphological characteristics were observed, spicules were analyzed, and the morphometric parameters were determined. The sea cucumbers were dissected in ventral muscle, digestive tract and tentacles, and the protein content was determined and crude proteolytic extracts were obtained for enzymatic characterization. In the characterization was determined: the optimal pH for proteolytic activity, stability to pH, the optimal temperature for proteolytic activity, temperature stability, the effect of storage at 4°C, thermal denaturation kinetics, the half-life, the effect of protease inhibitors, the effect of metal ions, the molecular weight by gel electrophoresis polyacrylamide sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE), and the identification of proteolytic activity by zymography (2% casein hydrolysis at pH 6 and 60°C). Furthermore, the three obtained crude proteolytic extracts were partially purified, the effects of pH and temperature on its proteolytic activity were determined, and the molecular weight of the proteases by SDS-PAGE was estimated. Partial purification of the three proteolytic extracts was performed using anion exchange chromatography in batch and low pressure liquid chromatography (LPLC) (elution with 0.5 M NaCl). Proteolytic extract of ventral muscle, additionally, was subjected to protein precipitation with saturated ammonium sulfate to 60% and ultrafiltration with membranes of 100 kDa (recovering major proteases to 100 kDa), because with this combination of purification methods higher proteolytic activity was obtained in preliminary studies. Subsequently, the purified partially proteolytic extracts were purified by high resolution liquid chromatography in reverse phase (RP-HPLC) registering its proteolytic activity, purification factor and recovery rate. The homology of the purified proteases from *I. fuscus* to other proteases was determined by mass spectrometry (MS). Finally, the purified partially proteolytic extract of tentacles for to generate protein hydrolysates was used. Protein hydrolysates were obtained from the dorsal muscle of *I. fuscus*, two egg proteins (lysozyme and ovalbumin) and two milk proteins (casein and  $\beta$ -lactoglobulin). Protein hydrolysates were generated with different relationships of enzyme:substrate and hydrolysis times. In the case of dorsal muscle hydrolysates the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of the peptides generated were measured, selecting the hydrolyzate with more ORAC value for the purification of the peptide with the highest antioxidant capacity, wich was by ultrafiltration with 3 kDa membrane and RP-HPLC. In the case of egg and milk hydrolysates, the generated peptides were analyzed by SDS-PAGE and RP-HPLC, selecting the best proteins hydrolysis.

External morphology and spicules analysis confirmed the genus and species of *I. fuscus*, the weight and length averages were 380 g and 23.3 cm corresponding to adult specimens of 5-7 years old. 21% protein in the ventral muscle, 32% in the digestive tract and 15% in the tentacles, similar to that reported for *Isostichopus badionotus*, was determined. Crude proteolytic extract of ventral muscle presented optimum activity at pH 2, 6, and 8 (37°C). Crudes proteolytic extracts of digestive tract and tentacles had optimum activity at pH 6 and 8 (37°C). The proteolytic extracts of the regions studied showed stability in a pH range between 2 and 8. Ventral muscle at pH 2-6 (67-80% residual activity, except to pH 3 with 48% residual activity); digestive tract at pH 2-4 and 8 (88-95% residual activity); and tentacles at pH 3-5 and 7 (91-95% residual activity). Similarly, the optimum temperatures of proteolytic activity of crude proteolytic extracts were 40-60°C; 40 and 70°C; and 60°C, respectively. Additionally, it was observed that at low temperatures between 0 and 10°C, the three proteolytic extracts showed proteolytic activity, this is an important feature because it would allow for less energy as it would be necessary high temperature to achieve high proteolytic activity. Proteolytic extracts were stable at temperatures between 10 and 50°C; ventral muscle at 20-30°C (91-100% residual activity); the digestive tract at 30-50°C (85-89% residual activity); and tentacles at 10 and 30 °C (85-86% residual activity); so the digestive tract was more stable to temperature over 85% residual activity. Crude proteolytic extracts showed 52% residual activity for the ventral muscle, 41% for the digestive tract and 66% for the tentacles, after standing 22 days at 4°C. Furthermore, all proteolytic extracts showed up to 79% residual activity when were incubated for 1 h at 70°C; ventral muscle extract was more stable to thermal denaturation with half-life of 3.5 h, followed by the digestive tract extract with 3.1 h, and the tentacles with half-life of 2.6 h. However, it is not possible to set the resistance to heat denaturation of a specific protease because various proteolytic enzymes are present in the proteolytic extract. Proteolytic behavior of *I. fuscus* crude extracts to pH and temperature, said *I. fuscus* proteases have higher pH and temperature stability than that reported for the sea cucumber *Stichopus japonicus*, suggesting that the characteristics of the proteases from *I. fuscus* are linked to the differences between these species and the habitats in which they develop. At pH 6, the crude proteolytic extract from ventral muscle was partially inhibited by pepstatin A (68% residual activity) and  $\beta$ -mercaptoethanol (76% residual activity); proteolytic extract from digestive tract was partially inhibited with PMSF (79% residual activity) and pepstatin A (81% residual activity); and the proteolytic extract from tentacles was partially inhibited with TLCK (79% residual activity) and pepstatin A (83% residual activity). Therefore, the dominant presence of cysteine and aspartyl proteases in the proteolytic extract from ventral muscle was suggested, and in the extracts from digestive tract and tentacles, the presence of serine and aspartyl proteases. At pH 8, the crude proteolytic extracts showed significative inhibition with EDTA (residual activities: 41% for ventral muscle, 71% for digestive tract, and 81% for tentacles) and TI (residual activities: 54% for ventral muscle, 75% for digestive tract, and 82% for tentacles). Therefore, the above results suggested the predominant presence of metallo proteases in the three proteolytic extracts. The protease activity of ventral muscle extract was inhibited approximately half with  $\text{Cu}^{2+}$  (42% residual activity) and  $\text{Mn}^{2+}$  (59% residual activity), while  $\text{Hg}^{2+}$  increased 16% proteolytic activity; proteolytic extract from digestive tract showed the lowest residual activity with  $\text{Ba}^{2+}$  (75%), whereas  $\text{Ca}^{2+}$  increased 1% proteolytic activity; and proteolytic extract from tentacles was partially inhibited with  $\text{Ba}^{2+}$  (71% residual activity).

The proteolytic extract from ventral muscle presented a predominant protein of 180 kDa; in the digestive tract extract two proteins of 109 and 39-42 kDa were identified; and the tentacles extract presented three proteins of 106, 68 and 39 kDa. Zymography studies showed the presence of proteases in the three proteolytic extracts. Based on the results of effect of ions on proteases and electrophoresis studies, the presence of cysteine and metallo proteases in the three crude proteolytic extracts was suggested.

The three partially purified proteolytic extracts showed optimum activities in the following values or ranges of pH: pH 6-8 and pH 10 for the ventral muscle; pH 6 and pH 8-9 for the digestive tract; and pH 6-8 for the tentacles; similar to that reported for *S. japonicus*. The water pH where the sea cucumbers inhabit could influence the behavior of their digestive enzymes as has been demonstrated for other marine species, the optimal pH for the cultivation of *I. fuscus* is 8.4-8.5. Also, the trend of increased proteolytic activity towards alkaline pH could be explained because sea cucumbers feed constantly and therefore eat high amounts of sea water which is neutral pH and for the type of food, since it has been shown that factors such as physiological characteristics and nutritional regimen influence the activity of the digestive enzymes of marine species. The temperatures at which the optimum proteolytic activity at pH 6, from partially purified proteolytic extracts from ventral muscle, digestive tract and tentacles were 50°C, 60°C, 10°C, respectively; while the optimum proteolytic activities at pH 8 were observed at 10°C for ventral muscle; 50°C for digestive tract; and 30 and 50 °C for tentacles. In general, *I. fuscus* proteases showed optimum activity at higher temperatures than *S. japonicus* proteases, possibly by the physicochemical characteristics of the environment in which it develops, since *S. japonicus* lives in temperatures of 3°C to 26°C, and *I. fuscus* can live in water at 8°C to over 30°C. It has been reported that the optimum temperature of protease from marine organisms generally varies with the type of organs and species. In the same context, the partially purified proteolytic extract from tentacles showed higher proteolytic activity than other extracts studied, suggesting an alternative digestion system because the sea cucumbers are able to expel his internal organs (as defense method) and regenerate them. A protease with estimated molecular weight between 46 and 49 kDa in the three partially purified proteolytic extracts (46 kDa for ventral muscle; 47 kDa for digestive tract; 49 kDa for tentacles) was identified. The results were consistent with those reported for cysteine and metallo proteases from *S. japonicus*.

The purified proteolytic extracts from ventral muscle, digestive tract and tentacles presented specific activities of 17252 U/mg, 7504 U/mg, and 3907 U/mg, with purification factors of 26.6, 28.2, and 12.2, and recovery of 0.5%, 1.2%, and 1.7%, respectively. It found homology with trypsin and complex trypsin-tryptase inhibitor (LDTI, Leech derived tryptase inhibitor), so having no homology with serine, aspartyl, cysteine and metallo proteases previously described, it was suggested that they may be new members of the proteases group.

The hydrolyzate of muscle protein from *I. fuscus* generated with the partially purified proteolytic extract from *I. fuscus* tentacles, had higher antioxidant activity with an enzyme:substrate ratio of 1:1 for 24 h. The fraction with molecular weight below 3kDa of this hydrolyzate had an antioxidant capacity of 0.92  $\mu\text{mol}_{\text{Trolox}}/\text{mg}_{\text{protein}}$  (ORAC) coinciding with the antioxidant effect of Trolox (synthetic antioxidant).



The peptides purified from this fraction had an ORAC value of 0.74  $\mu\text{mol}_{\text{Trolox}}/\text{mg}_{\text{protein}}$ . Production of antioxidant peptides from muscle autolyzed of *I. fuscus* or muscle with low quality can be an alternative for to tap this resource.

Moreover, ovalbumin and casein had higher hydrolysis with partially purified proteolytic extract from *I. fuscus* tentacles (enzyme:substrate ratio 1:2, v/v) compared to the hydrolysis of lysozyme and  $\beta$ -lactoglobulin. Ovalbumin peptides of 30-36 kDa at 60°C for 24 h, and peptides of 8-30 and 33.8 kDa to 7°C for 48 h were obtained; and the casein hydrolysis were obtained peptides of 10-20 and less than 10 kDa to 60°C for 24 h, three peptides of 10.6, 11.3, and 7.2 kDa to 7°C for 24 h, and 7.2 kDa peptide at 7°C for 48 h. Casein was hydrolyzed again but to higher enzyme:substrate ratio (1:4, v/v) generating peptides of 14.2, 17.6 and 19.5 kDa at 7 and 60 °C for 24 h, and 14.2 kDa peptide at 7°C for 48 h. There are few reports on ovalbumin and casein hydrolysis at low temperature. This study may be relevant, once studied the immune response of these hydrolysates, because part of the pediatric population is allergic to milk and/or egg proteins. In addition, the peptides generated in the casein and ovalbumin hydrolysis could have beneficial biological.

In conclusion, the presence of stable proteases at pH, temperature and refrigerated storage was observed with proteolytic activity at low temperature, leading to advantages in their use. In the same context, the study of proteolytic extract from the *I. fuscus* tentacles is a novel contribution as far proteases reports on the tentacles of sea cucumbers are unknown. Additionally, has not been reported the presence of antioxidant peptides in protein hydrolyzates from *I. fuscus*, or the generation of protein hydrolysates (in this case, muscle protein from *I. fuscus*, and egg and milk proteins) with sea cucumber proteases.

## 1 INTRODUCCIÓN

Cuando se intentan comprender los procesos químicos en las células y los organismos, sus interacciones y cambios, es preciso aislar los diversos constituyentes, identificarlos y estudiar sus estructuras y propiedades. Para separar las moléculas, se aprovechan las diferencias que existen entre ellas, como solubilidad, tamaño, masa, carga eléctrica o afinidad por otras moléculas. Por lo tanto, para pasar desde células o tejidos a un material purificado, se suelen utilizar diferentes técnicas de purificación de modo secuencial (Mathews y col., 2002).

Se han realizado una serie de estudios para purificar y caracterizar las proteasas de organismos marinos (Haard y Simpson, 2000); en términos de aplicaciones industriales, las proteasas son de las enzimas más importantes y ampliamente utilizadas (Chaplin y Bucke, 1990; Whitaker, 1994), por ejemplo, en la industria de detergentes y cuero, así como en aplicaciones farmacéuticas tales como medicamentos digestivos y anti-inflamatorios (Zhang y Kim, 2010).

Los organismos marinos se han adaptado a diferentes condiciones ambientales a través del tiempo, estas adaptaciones junto con otros factores se han traducido en proteasas con propiedades únicas en comparación con las enzimas proteolíticas de animales terrestres, plantas o microorganismos. Entre éstas propiedades destacan su mayor eficiencia catalítica, estabilidad a bajas temperaturas de reacción, considerable actividad y estabilidad catalítica a pH neutro y alcalino, entre otras (Haard y Simpson, 2000). El conocimiento sobre estas enzimas es útil tanto para determinar los plazos máximos de almacenamiento (evitando la autólisis) y para desarrollar aplicaciones prácticas en fisiología, bioquímica y ciencias de la alimentación (García-Carreño, 1992; Haard, 1992; Jiang y col., 1991). En los procesos de alimentos, las enzimas marinas pueden proveer numerosas ventajas sobre las enzimas que tradicionalmente se usan debido a su actividad y estabilidad bajo condiciones de reacción extremas o inusuales (Rasmussen y Morrissey, 2007). Sin embargo, actualmente hay un uso limitado de proteasas marinas en la industria, entre otras razones, por la relativa escasez de información básica (Haard y Simpson, 2000).

Por otra parte, los pepinos de mar han llamado la atención por sus múltiples peculiaridades. Dichos organismos son invertebrados marinos de cuerpo cilíndrico que viven en el fondo de los mares. Pertenecen al phylum *Echinodermata* y clase *Holothuroidea*; en este phylum también se encuentran los erizos, lirios, arañas y estrellas de mar. Los holotúridos cumplen un importante papel ecológico en la estructura y funcionamiento de las comunidades bentónicas (Bakus, 1973). Además, son muy demandados en el mercado asiático para su consumo, destacando China y Japón a nivel mundial (Toral-Granda, 2008; Purcell y col., 2010), lo que ha contribuido al desarrollo de una pesquería específica sobre esta especie (De Paco y col., 1993). Son apreciados en la gastronomía oriental como un alimento tradicional con supuestas propiedades afrodisíacas y curativas (Gentle, 1979; Conand, 1990; Richmond y col., 1995). China es el principal productor a nivel mundial y se destina principalmente a las industrias alimentaria y farmacéutica (Lovatelli y col., 2004). El pepino de mar deshidratado de alta calidad puede llegar a alcanzar precios de hasta 500 dólares americanos (Purcell y col., 2012).

Los pepinos de mar poseen alto valor nutricional ya que se compone de aproximadamente 55% (peso seco) de proteína y 2% de grasa, variando según la especie (Wang, 1997) y posee altos niveles de aminoácidos esenciales como arginina, valina, leucina y triptófano (Lovatelli y col., 2004). Asimismo cerca del 70% del total de proteína consiste de colágeno (Saito y col., 2002), el cual puede ser convertido en gelatina al hervirse y puede utilizarse como potencial sustancia bioactiva (Zeng y col., 2007). Adicionalmente, poseen diversos compuestos bioactivos que han sido estudiados (Bordbar y col., 2011).

En México, la captura de pepino de mar se inició a finales de la década de 1980, sobre todo en las penínsulas de Baja California y Yucatán (Lovatelli y col., 2004). Una de las especies más abundantes es el pepino de mar café *Isostichopus fuscus* (Ludwig, 1875), la cual es la especie comercial más común encontrada en el oriente del Pacífico. *I. fuscus* se distribuye desde Baja California (México) a Ecuador (Deichmann, 1958; Maluf, 1991). Es uno de los holotúridos más grandes y de los más cotizados en el mercado asiático por la textura suave de su piel (Caso, 1961). En general, la especie alcanza longitudes de hasta 28 cm y pesos de 960 g, en el Golfo de California (México) (Herrero-Pérezrul, 1994; Salgado-Castro, 1994; Fajardo-León y col., 1995). Sin embargo, en México, es extraído y exportado de forma ilegal desde antes de otorgarse los primeros permisos de pesca comercial en 1987. La medida de protección que se tiene actualmente es la NOM-059-SEMARNAT-2010 que determina a la especie en la categoría de protegida (Diario Oficial, 2004).

Los pepinos de mar poseen alta capacidad digestiva y de autólisis en respuesta a diferentes factores ambientales y mecánicos (Dai, 1990), por lo que se han realizado varios estudios sobre sus enzimas proteolíticas. Entre las especies de pepino de mar más estudiadas por su valor comercial se encuentra *Stichopus japonicus*, procedente de los mares de Japón y China (Jiixin, 2004; Liao, 1997). No obstante, se desconocen reportes acerca de las proteasas de *I. fuscus*. Por lo tanto, el objetivo general de este estudio fue purificar parcialmente y caracterizar extractos proteolíticos de *I. fuscus* capturado en el Golfo de California (México) y estudiar la capacidad de sus proteasas para generar hidrolizados de proteínas.

## 2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

### 2.1. Características generales de *Isostichopus fuscus*.

El phylum *Echinodermata* figura entre los invertebrados marinos bentónicos más conocidos, está formado por las clases *Asteroidea* (estrellas de mar), *Ofiuroidea* (arañas de mar), *Equinoidea* (erizos de mar), *Crinoidea* (lirios de mar) y *Holothuroidea* (pepinos de mar) (Calva, 2002).

El nombre holoturoideo fue dado por el filósofo griego Aristóteles (“holos”: completo y “thurios”: empujar, avanzar). El nombre científico *Cucumis marimus* el cual significa “pepino de mar” fue acuñado por el taxonomista de invertebrados Pliny the Elder (23-79 A.D.) (Ridzwan y col., 2007). Este organismo es conocido comúnmente como pepino de mar (español), sea cucumber (inglés), *namako* (japonés), trepang, *bêche-de-mer*, balate (quizá en Malayo), cohombro de mar, carajo de mar, entre otros.

#### 2.1.1 Clasificación taxonómica.

La clasificación taxonómica del pepino de mar *Isostichopus fuscus* es la siguiente:

Domínio: Eukarya.

Reino: Animal.

Phylum: Echinodermata.

Clase: Holothuroidea.

Orden: Aspidochirotida.

Familia: Stichopodidae.

Género: *Isostichopus*.

Especie: *fuscus*.

Nombre científico: *Isostichopus fuscus*, Ludwig 1875 (sinónimo: *Stichopus fuscus*).

Nombre común: pepino de mar café.

En general, los pepinos de mar son clasificados y divididos taxonómicamente con base en la descripción de las siguientes características morfológicas externas e internas (Zetina y col., 2002): forma general del cuerpo, disposición y forma de los pies ambulacrales, número y forma de los tentáculos, forma del anillo calcáreo y forma y combinación de espículas u osículos (Pawson, 1982; Toral-Granda, 2005). A continuación se describirán las características morfológicas de *I. fuscus*.

#### 2.1.2 Características morfológicas externas e internas.

Morfológicamente la clase *Holothuroidea* presenta un cuerpo cilíndrico donde se aprecia perfectamente diferenciada una superficie dorsal y una ventral, así como una parte anterior donde se encuentra la boca rodeada de tentáculos y el extremo posterior distal donde está el ano (Figura 1) (Solís-Marín y col., 2009).

*I. fuscus* tiene una longitud total media de  $20.8 \pm 2.8$  cm, con tamaños que van desde 13 hasta 31 cm (Toral-Granda y Martínez, 2007). Son animales adaptados a la reptación, por lo cual poseen pies ambulacrales, de los cuales los más desarrollados son los inferiores; otros pies se sitúan en los dos radios dorsales, son llamados “podios” y tienen funciones sensibles (Figura 1). Hay diferentes formas de tentáculos: dendroide, pinado, digitado, peltado y peltado-dendroide. *I. fuscus* presenta tentáculos peltados (Solís-Marín y col., 2009).

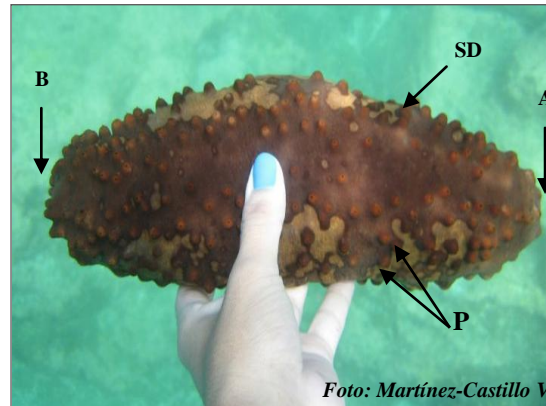


Figura 1. Morfología externa de *I. fuscus*, ejemplar del complejo insular Espíritu Santo del Golfo de California (México). SD = Superficie dorsal; A = Ano; B = Boca; P = Podios.

La forma del cuerpo, número y forma de tentáculos, posición de la boca y el ano, disposición y forma de los pies ambulacrales son las características morfológicas que determinan los grupos a nivel de orden (Solís-Marín y col., 2009).

Las características morfológicas internas más importantes para la clasificación a nivel de familia y género son: la forma del anillo calcáreo, número y forma de los canales pétreos, forma y número de madreporitas, número y longitud de vesículas de Poli, disposición de gónadas, presencia o ausencia de túbulos de Cuvier, músculos retractores, forma y disposición de los árboles respiratorios, forma de los músculos longitudinales y disposición y trayectoria del intestino (Figura 2) (Solís-Marín y col., 2009).

El sistema digestivo clásico del orden *Aspidochirotida*, al cual pertenece *I. fuscus*, comienza en los tentáculos, continúa con la boca y prosigue el esófago y la región estomacal, enseguida se produce un angostamiento y el intestino. De todo el sistema, el órgano más conspicuo es el intestino el cual se encuentra enrollado dentro del celoma. Dicho enrollamiento muestra una posición definida, puesto que primero desciende a la parte posterior (intestino delgado), recorriendo la región media dorsal, luego se curva y asciende a la parte anterior; desciende a lo largo de la región ventral media y la parte final del intestino prosigue en un recto de tamaño considerable que desemboca en una cloaca amplia y por último está el ano (Figura 2). Frecuentemente el intestino y el recto contienen arena.

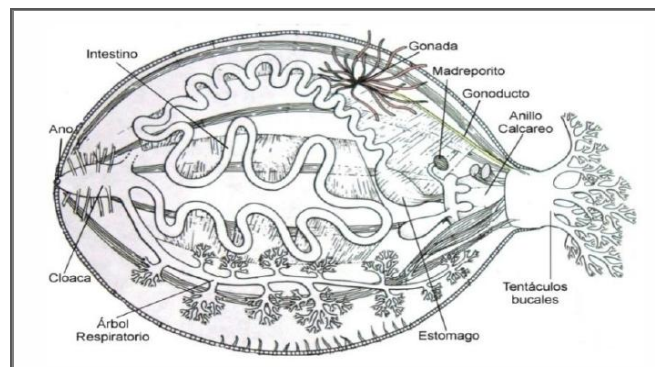


Figura 2. Representación esquemática de la morfología interna de *I. fuscus* (Ruppert y Barnes, 1996).

Para la identificación de la especie, la característica más importante es la diferente combinación y forma de depósitos calcáreos llamados espículas u osículos (estructuras de carbonato de calcio con tamaños entre 20 y 600  $\mu\text{m}$ ) los cuales conforman el endoesqueleto de los pepinos de mar, estos se encuentran embebidos en la piel y en las paredes de algunos órganos internos (Solís-Marín y col., 2009), estas estructuras internas y el sistema vascular acuífero son las que les confieren sostén y movilidad (Brusca y Brusca, 2003).

Existen diferentes formas de espículas: mesas o tablas, botones, placas perforadas, cuerpos en forma de “C” y barrotos, entre otros. La familia *Stichopodidae*, a la que pertenece *I. fuscus*, posee generalmente espículas en forma de tablas, en algunas ocasiones cuerpos en forma de “C” y, con menor frecuencia, botones. Este tipo de espículas son uno de los elementos esqueléticos más comunes en la piel (Solís-Marín y col., 2009).

### 2.1.3 Alimentación.

No se han dilucidado todavía la mayoría de los mecanismos alimenticios de los pepinos de mar. Sin embargo, se sabe que en su alimentación siempre intervienen los tentáculos y que se alimentan de recursos como plancton, detritus, contenido orgánico presente en fango y limo, algas o microalgas como *Rhodomonas* y *Dunaliella* (Calva, 2002), y algunos invertebrados (Pawson, 1982).

En cuanto a la acuicultura del pepino de mar, ésta es relativamente reciente. Huiling y col. (2004), reportaron las necesidades nutricionales de *Apostichopus japonicus*. La alimentación artificial utilizada estuvo compuesta principalmente de harina de pescado, *Sargassum thumbergii* y subproductos sólidos de la producción de vino y cerveza. Los autores determinaron que el contenido óptimo de proteína en la dieta es de 22%. La tasa máxima de ganancia de peso ocurrió cuando la dieta era rica en treonina, valina, leucina, fenilalanina, lisina, histidina y arginina; y disminuyó cuando la dieta era rica en fibra.

Específicamente para *I. fuscus* no se tiene una dieta estándar definida para su producción en acuicultura. En Ecuador, se está realizando el cultivo de esta especie a pequeña escala a través de experimentos sobre alimentación de larvas de *I. fuscus* utilizando una mezcla de microalgas vivas, principalmente *Rhodomonas* y *Dunaliella* (Mercier y col., 2004). México, también se ha comenzado la crianza en estanques de este holotúrido y se están realizando estudios para definir el tipo de alimentación óptima para su producción. Inicialmente se han utilizado mezclas de microalgas y suplementos. Battaglene (1999) utilizó la mezcla de más de 4 microalgas como alimento para larvas de *Holothuria scabra* a concentraciones de 20,000 a 40,000 células/mL. Otros autores han reportado mezclas de *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis galbana* y *Rhodomonas salina* (Agudo, 2006; Duy, 2010).

### 2.1.4 Reproducción.

*I. fuscus* presenta sexos separados; es gonocórico (dioico), aunque no muestra dimorfismo sexual externo, el sexo se identifica mediante la histología de las gónadas (Howaida y col., 2004). Tienen una única gónada que presenta cinco estadios de desarrollo: indiferenciado, gametogénesis, madurez, desove y postdesove. El ciclo reproductor es anual, con un desove en verano. La especie muestra una temporada reproductiva influenciada por la afluencia de agua caliente (Salgado-Castro, 1994; Herrero-Pérezrul, 1994; Fajardo-León y col., 1995).



*I. fuscus* alcanza la madurez sexual cuando tiene un peso de 161 a 171 g (peso húmedo escurrido) (Toral-Granda y col. 2007; Herrero-Pérezrul, 1994). Para larvas en cautiverio, ésta especie completa su metamorfosis y se instala entre los 22 y 27 días, alcanzando 35 mm a los 72 días en cultivo (Mercier y col., 2004). Al igual que otros equinodermos, algunas especies incuban sus huevos. La incubación se produce en la zona ventral o dorsal del animal. La larva es llamada auricularia y el pepino de mar joven llega a medir aproximadamente 1.5 cm de largo a (Figura 3) (Hamel y col., 2003). La vida de los holotúridos se estima entre los 5 y 10 años, los especímenes más viejos podrían tener alrededor de 12 años de edad (Cameron y col., 1989).

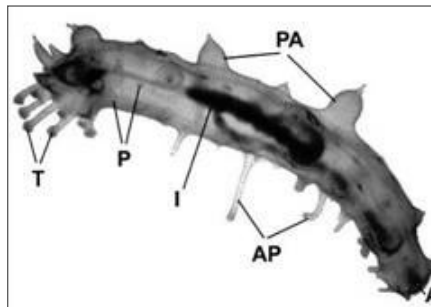


Figura 3. Morfología externa de *I. fuscus* juvenil (Mercier y col., 2004). T = Tentáculos; P = Pigmentos de la pared del cuerpo; I = Intestino; AP = Podios ambulacrales; A = Ano; PA = Papilas.

### 2.1.5 Depredadores.

Los pepinos de mar tienen pocos enemigos naturales, se mencionan sólo algunos como cangrejos, peces y estrellas de mar del género *Solaster* (Calva, 2002). También, dentro de los equinodermos, los holotúridos representan la clase más infestada por parásitos, más de un tercio de los parásitos viven sobre o dentro de holotúridos (Jangoux, 1990). Las partes principales del cuerpo que sufren las infestaciones son el sistema digestivo y el celoma. Las enfermedades son en su mayoría estructurales como llagas en la superficie de la epidermis, perforaciones en el árbol respiratorio y en el celoma. Se han registrado como parásitos algunas bacterias causantes de ulceración de la piel, hongos, protozoos que viven en el tracto digestivo y árbol respiratorio, y metazoos como platelmintos del phylum *Platyhelminthes* (Becker, 2002; Barel y Kramer, 1977).

### 2.1.6 Mecanismos de defensa y regeneración celular.

Los pepinos de mar tienen estrategias singulares de defensa contra sus depredadores. Algunas especies son capaces de expulsar los llamados “túbulos de Cuvier” los cuales están compuestos aproximadamente de 60% de proteínas y 40% de carbohidratos, una composición única entre las secreciones de invertebrados marinos (DeMoor y col., 2003). Los túbulos de Cuvier poseen una gran adhesividad por lo que inmovilizan e inhabilitan al depredador. Dicha adhesividad se debe parcialmente a las proteínas (DeMoor y col., 2003; VandenSpiegel y Jangoux, 1987). *I. fuscus* no presenta túbulos de Cuvier, sin embargo, utiliza otra estrategia de defensa la cual consiste en expulsar su tracto digestivo a través del ano para distraer al depredador y escapar. Los órganos expulsados son sustituidos por el organismo por diferentes mecanismos de regeneración biológica (Dolmatov y col., 2009). El tiempo requerido para la regeneración de los órganos eviscerados varía entre especies. Experimentalmente, se ha observado que los holotúridos regeneran el tracto digestivo en aproximadamente un mes, aunque *Holothuria scabra* requiere solo 7 días para el proceso completo de regeneración; *Sclerodactyla briareus* y *Holothuria glaberrima* requieren de 20 a 30 días, y *Stichopus mollis* requiere de 145 días (García-Arrarás y col., 2001).

La evisceración de órganos, no es el único mecanismo de defensa de los holotúridos, ciertas especies de los géneros *Holothuria*, *Stichopus*, *Cucumaria*, *Paraaudina*, *Thelenota*, *Pentacta* y *Actinopyga* también descargan, al ser manipulados, un fluido gomoso procedente de glándulas especiales situadas en la pared del cuerpo (Valledor, 1994). Este fluido contiene una sustancia designada como holoturina, la cual está constituida por saponinas y glucósidos, que tiene una función defensiva contra los depredadores (Kalinin y col., 2008). La holoturina es tóxica al ser ingerida y es irritante para la piel. El mal sabor de ésta toxina quizá explique que los holotúridos tienen muy pocos predadores. Por otra parte, el fluido viscoso hace que se adhieran partículas de arena sobre la superficie externa del animal, incrementando su mimetismo, lo que probablemente sea un método de defensa (Valledor, 1994).

### **2.1.7 Hábitat y distribución.**

Los pepinos de mar se encuentran principalmente en el fondo marino, son abundantes en los fondos arenosos, en arrecifes de coral profundos y en zonas abisales. Destacan en cantidad entre los equinodermos abisales ya que al tener un esqueleto conformado por espículas, son más tolerantes a las grandes profundidades, y por ende, a las altas presiones hidrostáticas (Calva, 2002).

*I. fuscus* habita preferentemente en fondos marinos rocosos y coralinos (Toral-Granda y col., 2007); ocasionalmente también en fondos arenosos y fangosos. Se puede encontrar desde aguas someras hasta 61 m de profundidad (Kerstitch, 1989), pero generalmente vive en la zona costera alrededor de 39 m de profundidad (Deichman, 1958; Maluf, 1991). La pesquería de esta especie se realiza a profundidades de 1 a 20 m (Fajardo-León y Vélez-Barajas, 1996). En Baja California (México) reside principalmente en hábitats de coral y roca (Herrero-Perézrul y col., 1999). Esta especie se puede encontrar durante todo el día, siendo más activa de noche (Shepherd y col., 2004; Toral, 2004).

*I. fuscus* se distribuye desde el Golfo de California (México) a Ecuador, incluyendo el archipiélago de Revillagigedo (México), la isla del Coco (Costa Rica) y las islas Galápagos (Ecuador) (Deichmann, 1958; Maluf, 1991; Solís-Marín y col., 2009). Hooker y col. (2005) reporta su presencia en las Islas Lobos de Afuera (Perú) y Caso (1961) incluye a la Patagonia. Se puede encontrar en todo el archipiélago de las Islas Galápagos, con densidades más altas en las Islas Fernandina e Isabela (Murillo y col., 2002). En México, la distribución geográfica de esta especie comprende principalmente las costas de Sonora, Baja California y Baja California Sur (BCS) (Figura 4), así como en la costa oeste de BCS, al sur de la Isla Margarita (Deichmann, 1958; Caso, 1961; Fajardo-León y col., 1995). En el litoral del Pacífico, en los estados de Guerrero y Oaxaca (Salgado-Castro, 1994; Fajardo-León y Vélez-Barajas, 1996).



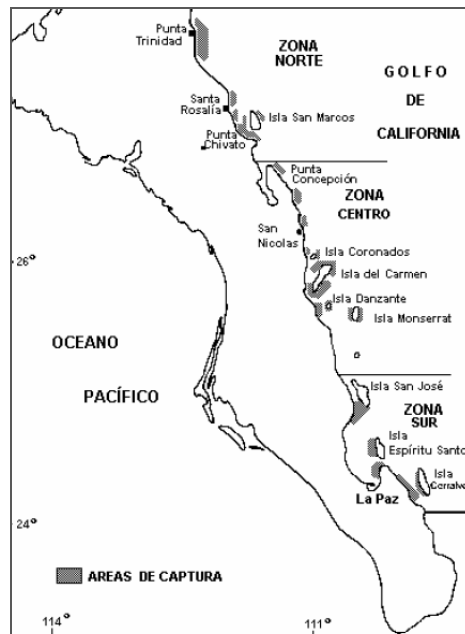


Figura 4. Áreas de captura de *I. fuscus* en Baja California (México) (Reyes-Bonilla, 1997).

### 2.1.8 Importancia ambiental.

El pepino de mar tiene gran valor dentro del ecosistema marino debido a que filtra los sedimentos oceánicos y devuelve nutrientes a la red alimenticia. Por lo tanto, permite que los nutrientes del fondo sean aprovechables por organismos de otros niveles tróficos. Son los responsables de cambios significativos en la composición del sedimento y reciclaje de nutrientes. Asimismo, mezcla las capas superiores del fondo facilitando la penetración de oxígeno (Calva, 2002). Este proceso evita la acumulación de materia orgánica en descomposición y puede ayudar a controlar poblaciones de plagas y organismos patógenos, incluidas ciertas bacterias.

Coulon y Jangoux (1993) encontraron que una población de *Holothuria tubulosa* puede filtrar de 5.9 a 12.9 kg m<sup>-2</sup> año<sup>-1</sup> de sedimento dependiendo de los regímenes de temperatura y tamaño corporal. Debido a esta actividad de alimentación, los holotúridos pueden alterar la estabilidad del fondo marino donde habitan (Coulon y Jangoux, 1993; Dar y Ahmad, 2006). Por otro lado, sus huevos y larvas forman parte del plancton el cual es alimento vital de otras especies marinas.

En el mismo contexto, son comunes las asociaciones entre holotúridos y otros organismos comensales como cangrejos, bivalvos y peces. Los bivalvos viven en la cloaca o habitan en la pared del tracto digestivo (Jangoux, 1990). Un caso especial de simbiosis intradigestiva es la desarrollada por *Megadenus cantharelloides* que alcanza la pared del tracto digestivo de *Stichopus chloronotus* con el fin de alimentarse del tejido dérmico (Humphreys y Lützen, 1972). Algunos peces se pueden alojar en la cloaca del pepino de mar y entran o salen del animal cuando se abre el esfínter del ano (Calva, 2002), la mayoría pertenece a los géneros *Carapus* y *Encheliophis*, de la familia *Carapidae*, también son usualmente encontrados en el árbol respiratorio o en la cavidad celómica. Los pepinos de mar también actúan como estimuladores del desarrollo para algunas larvas de *Carapus sp.* (Lovatelli y col., 2004).

### 2.1.9 Importancia económica.

Los holotúridos son consumidos en diferentes preparaciones culinarias principalmente en países asiáticos (Figura 5). Generalmente se utiliza el músculo, aunque el intestino es también consumido como un alimento marino fermentado (“*konowata*”, en japonés).

Los pepinos de mar se comercializan frescos, secos o deshidratados (“*iriko*”, en japonés), y en salmuera, entre otras presentaciones. Se han empleado como tónico y remedio tradicional en la cultura asiática para diversas heridas internas y externas, ya que se cree que tienen propiedades curativas (Battaglione y col., 1999). En la literatura china y malaya se reportan para el tratamiento de hipertensión, asma, reumatismo, cortaduras, quemaduras, impotencia y constipación (Lawrence y col., 2009; Yaacob y col., 1997). Adicionalmente a los usos medicinales, existe alta demanda de pepino de mar como alimento afrodisiaco (Mehmet y col., 2011; Fredalina y col., 1999). Por otra parte, el pepino de mar es un alimento con alto valor nutricional. El pepino de mar deshidratado es vendido principalmente en China, seguido de Corea, Indonesia y Japón. También se exportan cantidades importantes hacia Estados Unidos y Australia (Bordbar y col., 2011).



Figura 5. Preparaciones culinarias de pepino de mar. Izquierda: pepinos de mar en salsa (China); Derecha: “*Namako*” (*Apostichopus japonicus*) de Kobe (Japón) (Purcell y col., 2010).

Múltiples especies de pepino de mar han sido explotadas por la creciente demanda global. Muchas de las biomoléculas presentes en diferentes especies de pepino de mar se han extraído y utilizado en la industria farmacéutica y de los alimentos, en este último caso como suplemento alimenticio para deportistas por su contenido de sulfato de condroitina, componente principal del cartílago, y para personas con algunas deficiencias nutricionales.

El precio de los pepinos de mar depende del tamaño del animal, el tipo de comercialización, en fresco o procesado, y principalmente de la calidad final. La talla comercial es de 24 cm de longitud (Salgado-Castro, 1994). Los organismos más grandes generalmente gobiernan los precios por kilogramo. El pepino de mar japonés, *Apostichopus japonicus*, puede llegar a costar más de 300 USD/kg seco en los mercados, si los animales están en perfecto estado. Algunas especies tropicales, particularmente *Holothuria scabra* y *Holothuria lessona* pueden tener un alto precio si son especímenes grandes y bien procesados (Massin y col., 2009). Actualmente, en Hong Kong, *H. scabra* es vendido a precios que van de 115 a 640 USD/kg seco, y en muchas ocasiones hasta 1670 USD/kg seco. Cada organismo de 1.5-2.0 kg de peso fresco, equivale a 75-100 g de peso seco (Purcell y col., 2012).

En 2003, el precio de venta del pepino de mar deshidratado en el mercado de Malasia fue alrededor de 110 USD/kg y congelado de 23-24 USD/kg; en las Islas Galápagos el precio del pepino de mar en salmuera fue de 22.88 USD/kg (Murillo y col., 2003). Una tendencia similar se observa también en otros mercados de Asia.

En el 2001, el 66% de la producción mundial de pepino de mar silvestre se originó en Asia, seguida de Oceanía (16%), Norte y Centroamérica (12%) y África (5%). La mayoría de la recolección de pepino de mar en 2004 se realizó en el Océano Pacífico, en particular en el noroeste (43%) y en la región centro-occidental (32%) (México, América Central y América del Sur) (Lovatelli y col., 2004). Para el 2001, las exportaciones de pepinos de mar a nivel mundial fueron de más de 5 300 toneladas (TM), con un valor de 30.9 millones de dólares (FAO, 2008). El 84% del volumen y el 90% del valor de estas exportaciones fueron de pepino de mar curado. En términos de volumen, Hong Kong fue el principal exportador con 3 900 TM, seguido por China y las Islas Salomón. Hong Kong también fue el principal exportador en términos de valor con 22.7 millones de dólares. Para el mismo año, las importaciones de pepinos de mar ascendieron a 7 300 TM, representando 56.7 millones de dólares. Hong Kong SAR fue el primer importador en volumen con 4 400 TM, seguido por China y Taiwán, en términos de valor, Hong Kong fue el primer importador con 50.4 millones de dólares. La mayor parte de pepino mar importado se compuso de productos secos, salados o en forma de salmuera (68%), seguida por congelados (31%) y una mínima cantidad de pepinos de mar frescos o refrigerados (Lovatelli y col., 2004).

En la región centro-occidental del Pacífico (México, América Central y América del Sur) existen alrededor de 300 especies de holotúridos en aguas poco profundas (Preston, 1993). Hay 35 especies de pepinos de mar conocidas y utilizadas para su producción y comercialización. Se trata de especies que en general tienen paredes gruesas, entre ellas se encuentra *I. fuscus* (Toral-Granda, 2008). La demanda por el pepino de mar *I. fuscus* fomentó el inicio de su captura comercial en México entre 1987 y 1988. El interés por explotar comercialmente este recurso se manifestó principalmente en Baja California, y en Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. Sin embargo, dado que en México no se consume el pepino de mar, una vez procesado y empacado se exporta. Actualmente en México existen dos presentaciones para la exportación del producto: el pepino precongelado y el deshidratado, siendo la primera la más rentable (Aguilar-Ibarra y Ramírez-Soberón, 2002). *I. fuscus* es uno de los equinodermos holotúridos más grandes y de los más cotizados en los mercados asiáticos por la textura suave de su piel (Caso, 1961). En 2001, México tuvo una producción de pepino de mar de 481 toneladas lo que representó 2.6% de la producción mundial. Actualmente la mayoría del pepino de mar *I. fuscus* de México es exportado a Hong Kong y Estados Unidos ya sea refrigerado o deshidratado (FAO, 2012). Hong Kong importó más de 14 toneladas de México de 1995 a 2005; los datos disponibles en la FAO indica un total de 2 564 TM capturadas desde 1998 hasta 2005, con un promedio de captura anual de  $320.5 \pm 86.3$  TM (Toral-Granda, 2008).

En México, el precio de pepino de mar por unidad fresca se encontró entre 1 a 6 USD para el año 2013. Se reportó una producción de 2 762.4 TM de pepino de mar, con un valor de 4.6 millones de dólares (SAGARPA, 2013; FAO, 2012). No hay información sobre las capturas y exportaciones por especie.

### **2.1.10 Acuicultura de *I. fuscus* en México.**

La producción exitosa de juveniles de *S. japonicus* en la década de 1980 facilitó su acuicultura en Japón y China (Yuan y col., 2006; Zhang y Liu, 1998). Se desarrollaron métodos efectivos de cultivo de pepino de mar en jaulas, estanques y semi-intensivos. Hasta el momento, el cultivo semi-intensivo ha sido ampliamente utilizado para la producción de pepino de mar en el norte de China. Es un sistema de alta densidad para la cría de pepinos de mar adultos y producción de juveniles. Cuando los pepinos de mar son lo suficientemente grandes, se ponen en estanques de tierra o en aguas marinas costeras poco profundas para crecer (Yuan y col., 2006).

La alimentación con dietas preparadas es un factor principal en la acuicultura para aumentar el crecimiento y la producción (Abdel-Tawwab y col., 2007; Xia y col., 2013). Los diferentes métodos de procesamiento de alimentos para organismos acuáticos, causan cambios químicos y físico-químicos en las materias primas, lo que puede afectar la digestibilidad de los nutrientes (Camire, 2001; Morken y col., 2011; Sorensen y col., 2011). Se han realizado numerosas investigaciones sobre alimentación y digestión, requerimientos nutricionales y óptimos ingredientes para alimentos de pepinos de mar. Los alimentos en pasta o puré son ampliamente utilizados en el cultivo de pepino de mar (Tanaka, 1958; Okorie y col., 2008; Seo y col., 2011).

Mercier y col. (2004) reportaron el primer estudio sobre crianza de *I. fuscus* proveniente de las islas Galápagos en instalaciones en las costas de Ecuador. Los autores presentaron información sobre desove, fertilización, cultivo larvario, control de enfermedades y crecimiento de juveniles. El estudio se realizó durante tres años y se determinó, que en condiciones óptimas, los pepinos de mar juveniles pueden crecer hasta 8 cm de longitud en 3.5 meses. La tasa de supervivencia fue entre 30-50%. Además, proponen el uso de estanques de camarones abandonados como una opción prometedora para el cultivo de *I. fuscus* (Hamel y col., 2003; Mercier y col., 2004; Becker y col., 2009). En México, existen pocos reportes sobre cultivo de *I. fuscus*, el primero y más importante es el realizado por Mercier y col. (2012), donde se incluyeron métodos de desarrollo larval y crecimiento de juveniles con sistemas de crianza en tierra en costas mexicanas, además estudiaron aspectos como: alimentación, crecimiento y biología reproductiva de *I. fuscus*. Sin embargo, aún no existen manuales estándares publicados para la crianza de *I. fuscus*, por lo que su acuicultura se lleva a cabo tomando como referencia el cultivo de otras especies comerciales (Hair y col., 2012) como *Holothuria scabra* (Agudo, 2006; Lovatelli y col., 2004) y *Stichopus japonicus* (Lovatelli y col., 2004).

Los proyectos actuales de acuicultura de *I. fuscus* en México se localizan en los estados de Sonora, Sinaloa y Baja California Sur. Algunos ejemplos son Acuicultura Dos Mil S.A. de C.V., en Mazatlán, Sinaloa; y la Sociedad Cooperativa Piripichi S.C. de R.L. en colaboración con la Universidad Autónoma de Baja California Sur, donde tienen el objetivo de reproducción y producción de semilla de *I. fuscus* para la recuperación de la pesquería en Baja California Sur. La reproducción acuícola de pepino de mar es impulsada también por los pescadores locales como una alternativa a la pesca convencional (Herrero-Perézrul, 2005).

### **2.1.11 Tecnología de productos de pepino de mar.**

Los productos derivados de pepinos de mar que se comercializan son principalmente los congelados, en salmuera y los deshidratados. Debido a que no existe producción a nivel industrial, existen diferentes procesos para la obtención de dichos productos, dependiendo de la especie y del lugar de captura. Ke y col. (1987) reportaron un proceso que incluye hervir las paredes del cuerpo de los pepinos de mar a presión durante 60 min con NaCl 3%, posteriormente son secadas en un horno al vacío a temperatura ambiente y finalmente calentadas nuevamente a 60°C. En Maine, Estados Unidos, los principales productos derivados de *Cucumaria frondosa* son el músculo envasado al vacío o congelado y el músculo hervido y secado (Feindel, 2002; Bruckner, 2006; Therkildsen y Petersen, 2006). En Estados Unidos las especies de *Parastichopus* se hierven, secan y salan, algunos son comercializados congelados y otros frescos (Bruckner, 2006). En Nueva Caledonia, Madagascar y Papúa-Nueva Guinea, los pepinos de mar se secan en bastidores de malla después de ser sometidos a ebullición (Figura 6).



Figura 6. Estación de proceso de pepino de mar en Nueva Caledonia, Madagascar y Papúa-Nueva Guinea (Purcell y col., 2010).

Con respecto a los usos medicinales del pepino de mar, algunos productos procesados son las tabletas, comercializadas en Asia y Estados Unidos, las cuales se elaboran con el músculo seco de pepinos de mar. En Malasia, los extractos de piel hervida se consumen como tónico para el tratamiento del asma, la hipertensión, el reumatismo, y la cicatrización de cortaduras y quemaduras (Bordbar y col., 2011). Algunos productos que contienen extractos de pepino de mar se emplean en el tratamiento de la artritis reumatoide, osteoartritis y espondilitis reumática. En Malasia, los pepinos de mar son usados en una gran variedad de productos incluyendo gelatina, crema corporal, shampoo y pasta de dientes (Choo, 2008).

#### 2.1.12 Legislación para protección de *I. fuscus* en México.

La explotación ilegal de *I. fuscus* en la península de Baja California (México) se inició en la década de 1980 como una actividad de pequeña escala que respondió a la demanda internacional de los países orientales. Los primeros permisos oficiales de pesca comercial de esta especie se otorgaron en 1987 (Aguilar-Ibarra y Ramírez-Soberón, 2002).

En 2002, el pepino de mar *I. fuscus* fue sujeto a protección especial, permitiendo el uso de esta especie bajo condiciones restringidas. Para 2003, *I. fuscus* se incluyó en el Apéndice III del Convenio de Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) convirtiéndose en el primer y hasta ahora la única especie de pepino de mar incluida en CITES. Esto puede ser un valioso instrumento ya que una parte de CITES tiene por objeto ayudar en la protección de especies específicas, especialmente si tales especies están en el comercio ilegal para abastecer a los mercados extranjeros (Willock y col., 2004).

En 2005, se desarrolló un plan de manejo adaptativo bajo un esquema participativo de los gobiernos locales y nacionales, comunidad científica y asociaciones de pescadores, para evaluar continuamente el impacto de esta pesca. Este plan incluye la asignación de cuotas para la acuicultura y los informes de capturas y población, está sujeto a revisión anual y es adaptado a los nuevos resultados obtenidos (Toral-Granda, 2007). Esta información ayuda a decidir las medidas de gestión adicionales para garantizar la sostenibilidad del recurso (Herrero-Perézrul, 1999).

Actualmente, la medida de protección para el pepino de mar está publicada en el Diario Oficial de la Federación en la norma oficial mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, “Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo”.



La norma NOM-059-SEMARNAT-2010, determina que el pepino de mar está en la categoría de protección especial, la cual se define como: “Aquellas que podrían llegar a encontrarse amenazadas por factores que inciden negativamente en su viabilidad, por lo que se determina la necesidad de propiciar su recuperación y conservación o la recuperación y conservación de poblaciones de especies asociadas”.

La pesquería de *I. fuscus* se gestiona en régimen de concesión de acuerdo a la “Unidad de Manejo para la Vida Silvestre” (UMA) aprobado por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Sólo Cuba, Perú, Chile, Ecuador y México han regulado las actividades pesqueras de pepino de mar. México y Ecuador se han enfocado en *I. fuscus*. Parte del programa de protección es la ubicación en Baja California Sur de predios de propiedad federal registrados para el aprovechamiento extractivo de *I. fuscus* muchos de los cuales están ubicados en polígonos situados en el Golfo de California (Toral-Granda, 2008).

### **2.1.13 Composición y valor nutricional.**

En general, el pepino de mar se compone de aproximadamente 55% de proteína, 2% de grasa (Wang, 1997) y 0.2-2% de carbohidratos (Mehmet y col., 2011), en peso seco, variando según la especie. La pared del cuerpo del pepino de mar consiste de colágeno insoluble que representa cerca del 70% de la proteína total (Saito y col., 2002). Chen (2003) reportó un contenido de proteína de hasta 83% para pepino de mar seco pudiendo ser vendido como nutraceutico o encapsulado.

Los pepinos de mar tienen un alto perfil de nutrientes ya que contienen vitaminas A, B1 (tiamina), B2 (riboflavina) y B3 (niacina), además de minerales como calcio, magnesio, hierro y zinc (Bordbar y col., 2011). También, contienen altos niveles de aminoácidos esenciales como lisina, arginina, triptófano, treonina y fenilalanina (DeMoor y col., 2003; Wen y col., 2010). Otro aspecto importante en la composición de aminoácidos del pepino de mar es la combinación de los mismos con funciones biológicas como glicina (componente mayoritario con 5.57-12.50 g/100 g peso húmedo) (Bordbar y col., 2011), ácido glutámico (4.69-7.31 g/100 g peso húmedo), ácido aspártico (3.48-5.06 g/100 g peso húmedo), alanina (2.95-5.77 g/100 g peso húmedo) y arginina (2.71-4.95 g/100 g peso húmedo) (Wen y col., 2010).

Las relación aminoácidos esenciales/aminoácidos totales, así como aminoácidos esenciales/aminoácidos no esenciales del intestino y del aparato respiratorio del pepino de mar son cercanas a los patrones ideales establecidos por la FAO/WHO (Yuan y col., 2010) sugiriendo un alto valor nutritivo. Adicionalmente a lo anterior, los holotúridos poseen diversos compuestos bioactivos que se discutirán en la siguiente sección (Bordbar y col., 2011).

### **2.1.14 Compuestos bioactivos y actividad biológica.**

El océano posee una gran biodiversidad y representa un rico reservorio de alimentos nutritivos y componentes bioactivos, en particular péptidos bioactivos y agentes antimicrobianos, anti-inflamatorios y anticancerígenos (Venugopal, 2009; Guerard y col., 2011; Blunden, 2001). En los pepinos de mar existen cantidades considerables de compuestos bioactivos, especialmente glicósidos triterpenoides (saponinas), sulfatos de condroitina, glicosaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, esteroides (glucósidos sulfatos), fenólicos, péptidos, cerebrosidos y lectinas (Bordbar y col., 2011).

Los compuestos químicos presentes en diferentes especies de pepino de mar han mostrado actividades biológicas y farmacológicas, tales como antiangiogénica (Tian y col., 2005; Tong y col., 2005), anticancerígena (Roginsky y col., 2004), anticoagulante (Nagase y col., 1995; Chen y col., 2011), antihipertensiva (Hamaguchi y col., 2010), antiinflamatoria (Collin, 2004), antimicrobiana (Beauregard y col., 2001), antioxidante (Althunibat y col., 2009; Mamelona y col., 2007), antitrombótica (Pacheco y col., 2000), antitumoral (Zou y col., 2003; Tian y col., 2005; Tong y col., 2005), y cicatrización de heridas (San Miguel-Ruíz y García-Arrarás, 2007).

En la Tabla 1 se presentan algunos de los compuestos bioactivos reportados en diferentes especies de pepino de mar y su actividad biológica estudiada. Entre los compuestos bioactivos más estudiados en el pepino de mar están el glicosaminoglicano de holoturia y el fucano de holoturia, que contienen sulfato de condroitina (polisacárido sulfatado) como fracción principal (Volpi y col., 2006; Popov y col., 2002; Mourão y col., 1996). El sulfato de condroitina se ha extraído de este holotúrido desde la década de 1990; se ha utilizado en el tratamiento de la artritis y de otras patologías de las articulaciones. Posee un intervalo amplio de propiedades biológicas, entre las que destacan su acción anticoagulante y antitrombótica. El sulfato de condroitina se ha obtenido de especies como *Ludwigothurea grises*, recolectado en Río de Janeiro, Brasil, y *Stichopus japonicus*, de las costas de Hokkaido, Japón (Volpi y col., 2006).

Asimismo, el pepino de mar tiene una alta concentración de colágeno que puede ser convertido en gelatina para utilizarse como sustancia bioactiva (Zeng y col., 2007). De igual forma, debido a que la proteína de pepino de mar es rica en glicina, ácido glutámico y arginina, este holotúrido es utilizado como fuente de aminoácidos con una importante función biológica en la regulación del sistema inmune (Zhao y col., 2008).

Tabla 1. Compuestos bioactivos de pepinos de mar y su actividad biológica (Modificado de Bordbar y col., 2011).

| Especies de pepino de mar  | Compuestos bioactivos  | Actividad                                      |
|--|--|--|
| <i>Pentacta quadrangularis</i> ,<br><i>Cucumaria frondosa</i> .  | saponinas sulfatadas (filinospido A, filinospido E, fracciones: B1000 y sulfato de condroitina).   | anti-angiogénico                               |
| <i>Holothuria scabra</i> , <i>Holothuria leucos pilota</i> , <i>S. chloronotus</i> ,<br><i>Cucumaria frondosa</i> , <i>Cucumaria okhotensis</i> ,<br><i>Mensamaria intercedens</i> , <i>Pearsonothuria graeffei</i> ,<br><i>S.japonicus</i> .  | triterpenoide (trondosido A), triterpeno oligoglicosidos (okhotosidos B1, B2, B3), triterpeno glicosidos (intercedensidos A, B, C), glicolipido (grondanol A), triterpeno oligoglicosidos (holoturina A y 24-dehidroequinosido, frondanol(R)-A5p), base esfingoides composición de cerebrosidos. | anticáncer                                     |
| <i>Fudwigothurea grisea</i> , <i>Thelenota ananas</i> .  | sulfato de condroitina fucosilado.   | anti-coagulante                                |
| <i>Stichopus japonicus</i> .   | polipéptidos de bajo peso molecular, polipéptidos ácidos, mucopolisacáridos, colágeno y aminoácidos bioactivos.  | antifatiga                                     |
| <i>Actinopyga echinites</i> , <i>Actinopyga miliari</i> ,<br><i>Holothuria atra</i> , <i>Holothuria scabra</i> ,<br><i>Bohadshia argus</i> , <i>Cucumaria frondosa</i> ,<br><i>Holothuria poli</i> , <i>Hemoiedema spectabilis</i> ,<br><i>Psolus patagonicus</i> , <i>Actinopyga lecanora</i> ,<br><i>Bohadshia marmorata</i> . | sapogeninas esteroidales, glicosidos triterpeno sulfatados (hemoiedemosidos A y B, patagonicosido A, holoturina B, patagonicosido A), glicosidos triterpeno tipo holostano (marmoratosido A, 17 $\alpha$ -hidroximpatiensido A, impatiensido A y bivittosido D), péptidos bioactivos.            | anti-microbiano, antibacteriano y antifúngico. |

Tabla 2. Compuestos bioactivos de pepinos de mar y su actividad biológica (Modificado de Bordbar y col., 2011).

| Especies de pepino de mar   | Compuestos bioactivos  | Actividad                |
|---|--|--------------------------|
| <i>Cucumaria frondosa</i> , <i>Stichopus japonicus</i> , <i>Paracaudina chilensis</i> , <i>Holothuria scabra</i> , <i>Holothuria leucospilota</i> , <i>Stichopus chloronotus</i> , <i>Acaudina molpadioides</i> .   | hidrolizados de gelatina, hidrolizados de proteína, péptidos biactivos, fenoles y flavonoides, polipeptidos de colágeno, enzimas (superperóxido dismutasa, catalasa, glutatiónperoxidasa, y glutatión reductasa).  | antioxidante             |
| <i>Stichopus japonicus</i> .  | glicosaminoglicanos (holoturiano glicosaminoglicano).  | antitrombótico           |
| <i>Stichopus japonicus</i> , <i>Holothuria atra</i> , <i>Holothuria scabra</i> , <i>Cucumaria echinata</i> .  | lectina CEL III <sup>1</sup>   | hemolítica<br>citotóxica |
| <i>Acaudina molpadioides</i> , <i>Cucumaria frondosa</i> .  | péptidos de hidrolizados de gelatina <sup>2</sup> ; hidrolizados de proteína <sup>3</sup>  | anti-hipertensivo        |
| <i>Staurocucumis liouvillei</i> .   | glicosidos triterpenos trisulfatados (liouvilosidos A y B).  | antiviral                |
| <i>Stichopus japonicus</i> .  | sulfato fucano, glucosamina, condroitina.  | osteoartritis            |
| <i>Mensamaria intercedens</i> , <i>Holothuria hilla</i> , <i>Pentacta quadrangularis</i> , <i>Holothuria forskali</i> , <i>Stichopus japonicus</i> , <i>Holothuria nobilis</i> , <i>Holothuria fuscocinerea</i> , <i>Holothuria impatiens</i> , <i>Ludwigothurea grisea</i> , <i>Cucumaria japonica</i> . | glicosidos triterpeno (intercedensidos D-I, hillasidos A y B, holoturinosidos A, B, C y D, desholoturina A, nobilisidos A, B y C, fuscocinerosidos A, B, y C), glicoproteína, saponinas sulfatadas (filinopsido A), mucopolisacarido, glicosidos triterpeno monosulfatados (cumasido), glicosido triterpeno tipo lanostano (impatiensido A), polisacaridos sulfatados. | antitumoral              |

<sup>1</sup> Hatakeyama y col. (2002); Matsubara y col. (2007); Oda y col. (1997).

<sup>2</sup> Zhao y col. (2007).

<sup>3</sup> Hamaguchi y col. (2010).

## 2.2 Enzimas proteolíticas de organismos marinos.

Los organismos marinos comprenden miles de especies diversas que subsisten en diferentes hábitats (Haard, 1992). La diferencia de factores ambientales tales como temperatura, presión, salinidad, intensidad de la luz y disponibilidad de oxígeno, han causado a través del tiempo que los animales marinos se adapten a estas condiciones, lo que se ha traducido en la presencia de enzimas con propiedades especializadas en comparación con las enzimas homólogas de animales terrestres, plantas o microorganismos (Simpson y Haard, 1987). Las enzimas proteolíticas o proteasas de organismos marinos producidas por las glándulas digestivas tienen acción lítica catalizando la rotura de enlaces peptídicos con la participación de moléculas de agua, de la misma forma que ocurre con las proteasas de plantas, animales terrestres y microorganismos (Haard y Simpson, 2000).

Algunas de las características distintivas de las proteasas digestivas marinas son: mayor eficiencia catalítica y estabilidad a temperaturas de reacción bajas, menor termoestabilidad, y actividad catalítica y estabilidad a pH neutro o alcalino (Tabla 2) (Simpson y Haard, 1987; Asgeirsson y Bjarnasson, 1989). Las proteasas digestivas de los animales marinos también pueden diferir de las terrestres en su sensibilidad a la presión (Ashie y col., 1996), en la capacidad para hidrolizar proteínas nativas y en la sensibilidad a pH, sales, urea, detergentes y otros materiales (Simpson y Haard, 1985; Guizani y col., 1991). Sin embargo, el uso industrial de las proteasas marinas es limitado a causa de la relativa escasez de información básica sobre estas enzimas, entre otras razones (Haard y Simpson, 2000).



Tabla 3. Características fisicoquímicas de proteasas de organismos marinos y terrestres (Haard y Simpson, 2000).

| Enzima                    | Fuente                 | T. Biológica (°C) | P.M. (kDa)  | pH óptimo | T. óptima (°C) |
|---------------------------|------------------------|-------------------|-------------|-----------|----------------|
| <b>Aspartil proteasas</b> |                        |                   |             |           |                |
| <b>Pepsina</b>            | Bacalao del Atlántico  | 0 - 5             | 35.5        | 3.5       | 40             |
|                           | Capelán                | (-1) - 4          | 23, 27      | 3.7, 2.5  | 38, 43         |
|                           | Bacalao Polar          | (-1.5) - 2        | 40, 42      | 2         | 37             |
|                           | Sardina                | 10                | 33, 37      | 2, 4      | 40, 55         |
|                           | Porcino                | 37                | 32-35       | 2         | 47             |
| <b>Serín proteasas</b>    |                        |                   |             |           |                |
| <b>Tripsina</b>           | Bacalao del Atlántico  | 0 - 5             | 24.2, 24.8  | 7.5 - 8   | 40             |
|                           | Capelán                | (-1.0) - 4        | 28          | 7.5 - 8   | 45             |
|                           | Bacalao de Groenlandia | (-2.0) - 2        | 23.5        | 7.5       | 35             |
|                           | Sardina                | 10                | 22.9 - 28.9 | 10        | 45             |
|                           | Bovino                 | 37                | 23          | 8.2       | 45             |
| <b>Quimotripsina</b>      | Bacalao del Atlántico  | 0 - 5             | 26          | 7.8       | 52             |
|                           | Trucha arcoíris        | 15                | 28.2 - 28.8 | 9.0       | 55             |
|                           | Bovino                 | 37                | ---         | 7.2       | 57             |
| <b>Elastasa</b>           | Bacalao del Atlántico  | 0 - 5             | 28          | 7.5 - 9   | 43             |
|                           | Porcino                | 37                | ---         | 7.5 - 9   | 58             |

### 2.2.1 Clasificación de proteasas.

Las proteasas digestivas de los animales marinos se clasifican con los mismos criterios utilizados para proteasas de otros animales, plantas o microorganismos. El método estándar de clasificación propuesto por la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímicos (IUB) se basa en los mecanismos catalíticos. Las clases de enzimas se diferencian por criterios, tales como la naturaleza de los grupos en los sitios catalíticos, la especificidad por el sustrato, la respuesta a inhibidores, o por la actividad y estabilidad en condiciones ácidas, neutras o alcalinas (Haard y Simpson, 2000).

El sistema de la Comisión de Enzimas para la clasificación asigna cuatro números precedidos de la abreviatura EC (“Enzyme Commission”). El primer número es asignado en función del tipo de reacción química catalizada. Así, para el grupo de enzimas digestivas o proteasas marinas, el primer número es “3”, que significa que son hidrolasas (catalizan reacciones de hidrólisis). El segundo número se refiere a la subclase. Para las hidrolasas, la subclase se basa en el tipo de enlace hidrolizado. Las proteasas digestivas marinas hidrolizan enlaces peptídicos, por lo que todas estas enzimas tienen el número “4” como segundo dígito. El tercer dígito de acuerdo al sistema de la EC subdivide las enzimas en subsubclases que define estrictamente los tipos de enlaces hidrolizados o identifica la naturaleza química de los grupos esenciales en los centros catalíticos de las enzimas. Por último, el cuarto dígito, es un número serial asignado a las enzimas dentro de la subsubclase (Haard y Simpson, 2000). Así, las proteasas digestivas de los animales marinos se clasifican en cuatro categorías: serín proteasas, cisteín proteasas, aspartil proteasas y metalo proteasas (Whitaker, 1994).

### **Serín proteasas (EC 3.4.21).**

Son un grupo de endoproteasas activas a pH neutro o ligeramente alcalino, e inestables o inactivas en condiciones ácidas. Se caracterizan por la presencia de residuos de serina, histidina y ácido aspártico en sus sitios catalíticos. Son inhibidas por diisopropilfosforidato (DFP), a través de la reacción con el grupo hidroxilo de la serina que está en el sitio activo (Mihalyi, 1978). Se encuentran en los tejidos del páncreas, el ciego pilórico y los intestinos de los animales.

### **Cisteín proteasas (EC 3.4.22).**

Son un grupo de endoproteasas con residuos de cisteína e histidina como grupos esenciales en los sitios catalíticos. Estas enzimas requieren del grupo tiol (-SH), proporcionado por el residuo de cisteína del sitio activo para que su estructura esté intacta, de ahí que también sean llamadas tiol proteasas ó sulfhidril proteasas. Las tiol proteasas son inhibidas por iones de metales pesados y sus derivados, así como por agentes alquilantes y agentes oxidantes (Mihalyi, 1978).

### **Aspartil proteasas (EC 3.4.23).**

Las aspartil proteasas, son un grupo de endoproteasas con alta actividad y estabilidad a pH ácido, e inestables o inactivas en condiciones alcalinas. También se conocen como ácido proteasas ó carboxil proteasas debido a que sus sitios catalíticos se componen de los grupos carboxilo de dos residuos de ácido aspártico (Whitaker, 1994).

### **Metallo proteasas (EC 3.4.24).**

Son enzimas hidrolíticas cuya actividad depende de la presencia de cationes divalentes. Los estudios de modificación química sugieren que puede haber al menos un residuo de tirosilo y un residuo de imidazol asociados a los sitios catalíticos de estas proteasas (Whitaker, 1994). Son inhibidas por agentes quelantes, tales como 1,10-fenantrolina y EDTA, y algunas veces por el simple proceso de diálisis. La mayoría de las metallo proteasas más conocidas son exopeptidasas.

## **2.2.2 Purificación y caracterización de proteasas.**

Las proteasas digestivas han sido aisladas de varios animales marinos utilizando básicamente los mismos principios aplicados a recuperar enzimas similares a partir de tejidos de animales de tierra, vegetales y microorganismos. Así, las técnicas de purificación se basan en diferencias de solubilidad (precipitación con sales, disolventes orgánicos), tamaño (cromatografía de exclusión, diálisis); carga (cromatografía de intercambio iónico, electroforesis), y unión a ligandos específicos (cromatografía de afinidad, de interacción hidrofóbica).

En general, la purificación se realiza homogeneizando la muestra con un amortiguador a pH alrededor de 7, posteriormente es centrifugando para obtener las enzimas proteolíticas solubles, se somete a un fraccionamiento por precipitación, seleccionando la fracción de interés y se llevan a cabo diferentes pasos de cromatografía de filtración en gel e intercambio aniónico y afinidad, en su mayoría (Winter y Neurath, 1970; Camacho y col., 1980; Haard y Simpson, 2000). A continuación se indican las principales enzimas proteolíticas aisladas a partir de organismos marinos.

### **Serín proteasas (EC 3.4.21).**

Las tres serín proteasas más importantes que se han purificado de las glándulas digestivas de los animales marinos y han sido caracterizadas son: tripsina, quimotripsina y elastasa.

#### **Tripsina (EC 3.4.21.4).**

La tripsina muestra su especificidad para romper el enlace peptídico por el lado del grupo carboxilo de los aminoácidos con cadenas laterales voluminosas y con carga positiva, como lisina y arginina. Poseen actividad a pH neutro a ligeramente alcalino.

Las tripsinas marinas han sido aisladas del ciego pilórico, tejido pancreático e intestino de varios organismos como boquerón (*Engraulis encrasicolus*), bacalao de Groenlandia (*Gadus ogac*), bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), lisa (*Mugil cephalus*), sardina (*Melanostica sardinos*), y estrellas de mar (Chen y col., 1978), entre otros (Haard y Simpson, 2000).

#### **Quimotripsina (EC 3.4.21.1).**

La quimotripsina tiene una especificidad mucho más amplia que la tripsina ya que rompe los enlaces peptídicos por el lado carboxilo de los aminoácidos con cadenas laterales voluminosas y aminoácidos no polares como la tirosina, fenilalanina, triptófano y leucina (Whitaker, 1994). En general, las quimotripsinas de organismos marinos son más activas en el intervalo de pH de 7.5 a 8.5, presentando mayor estabilidad en torno a pH 9 (Kristjansson y Nielson, 1992). Se han aislado y caracterizado a partir de especies marinas como anchoa (*Engraulis japonica*), bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), entre otros (Haard y Simpson, 2000).

#### **Elastasa (EC 3.4.21.11).**

La elastasa rompe específicamente el enlace peptídico por el lado carboxilo de aminoácidos pequeños e hidrofóbicos como alanina y valina (Whitaker, 1994). Son enzimas producidas por el páncreas que llevan a cabo la hidrólisis de elastina en las condiciones que prevalecen en el intestino, pH 7-9. Esta enzima se ha caracterizado en diferentes especies como: bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), atún rojo (*Thunnus thynnus*), carpa (*Cyprinus carpio*), lenguado de dover (*Solea solea*), anguila (*Anguila japonica*), entre otros (Haard y Simpson, 2000).

### **Cisteín proteasas (EC 3.4.22).**

Son enzimas digestivas que se han encontrado en el hepatopáncreas de calamares de aleta corta y otros animales marinos, en donde más del 90% de la actividad proteolítica es aportada por las cisteín proteasas. La catepsina B es la cisteín proteasa más reportada en organismos marinos (Haard y Simpson, 2000).

#### **Catepsina B (EC 3.4.22.1).**

Es activa a pH ácido, e inactiva a pH alcalino. Se ha aislado de las glándulas digestivas de animales marinos como almeja caballo (*Tresus capax*), mejillón (*Perna perna* L), almeja (*Spisula solidissima*), entre otros (Haard y Simpson, 2000).

### **Aspartil proteasas (EC 3.4.23).**

Hasta el momento, las aspartil proteasas que han sido aisladas de los estómagos de animales marinos y caracterizadas son: pepsina, gastricina y quimosina o renina (Haard y Simpson, 2000).

#### **Pepsina (EC 3.4.23.1).**

Tiene preferencial especificidad por los aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina y triptófano. Se caracterizan por poseer actividad a pH ácido. Se han obtenido pepsinas y proteasas con actividad similar a las pepsinas a partir de las glándulas digestivas de animales marinos como: bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), capelán (*Mallotus villosus*), bacalao de Groenlandia (*Gadus ogac*), bacalao polar (*Boreogadus saida*), sardina (*Sardinops melanostica*), entre otros (Haard y Simpson, 2000).

#### **Gastricina (EC 3.4.23.3).**

Se han descrito como proteasas ácidas con actividad enzimática parecida a la de las pepsinas, aunque se diferencian de estas en su estructura y algunas propiedades catalíticas. Se han aislado de los jugos gástricos de salmón y merluza (*Merluccius gayi*) (Haard y Simpson, 2000).

#### **Quimosina (EC 3.4.23.4).**

Tienen preferencial especificidad por los aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina y triptófano. Se han descrito como proteasas ácidas con algunas características diferentes. Estas enzimas son más activas y estables alrededor de pH 7.0, a diferencia de otras proteasas ácidas como la pepsina. Algunas proteasas digestivas con actividad similar a la quimosina fueron aisladas de la mucosa gástrica de focas arpa (*Pagophilus groenlandicus*) jóvenes y adultas como zimógenos (Haard y Simpson, 2000).

### **Metaloproteasas (EC 3.4.24).**

Las metaloproteasas han sido caracterizadas, en su mayoría, a partir de tejidos musculares de animales marinos (no en glándulas digestivas) como el pez roca, la carpa y el manto del calamar, aunque no están muy distribuidas entre los animales marinos (Haard y Simpson, 2000).

### **Colagenasa.**

Las colagenasas de animales marinos son similares a las de los mamíferos de tierra respecto a su acción sobre el colágeno nativo. Sin embargo, las colagenasas digestivas marinas presentan una actividad similar a la de las tripsinas y quimotripsinas. Las colagenasas se han purificado y caracterizado de glándulas digestivas de animales marinos tales como cangrejo, langosta y camarón (Haard y Simpson, 2000).

### 2.2.3 Aplicaciones de proteasas.

En el ámbito industrial, las proteasas son el grupo de enzimas más importante y utilizado (Chaplin, 1990; Whitaker, 1994). En particular, en la industria alimentaria las proteasas tienen diversas aplicaciones como: la mejora del producto final, las características de manejo y la textura de cereales y productos horneados; la mejora del secado, y de la calidad de los productos derivados del huevo y carne; la recuperación de proteínas y/o péptidos de huesos; la hidrólisis de proteínas de sangre; la producción de hidrolizados de proteínas; la reducción de la viscosidad en procesos de cuajado y maduración del queso, entre otros. Entre las aplicaciones biomédicas se pueden mencionar la reducción de la inflamación de tejidos; la disolución de coágulos de la sangre; la aceleración en la cicatrización de heridas; la activación de hormonas; el diagnóstico de candidiasis; y la mejora en los procesos digestivos (Godfrey y Reichelt, 1983; Haard y Simpson, 1994). En la industria de detergentes, las proteasas fueron las primeras en ser utilizadas ampliamente en el blanqueo. Además, son utilizadas en el tratamiento de la lana, en el desgomado de seda cruda y en el proceso de curtido del cuero o piel en el que se emplean proteasas con pH óptimo alrededor de 9 a 10 (Olsen, 2004).

Las ventajas en el uso de enzimas de origen marino incluyen una mayor actividad catalítica en reacciones a temperaturas bajas, lo que puede ser utilizado para procesar alimentos reduciendo los costos de energía y evitando el deterioro de componentes termolábiles (Simpson y Haard, 1987). Asimismo, estas enzimas son generalmente de baja termoestabilidad, lo que permite su inactivación por tratamientos térmicos más suaves (Simpson y Haard, 1985; Guizani y col., 1991).

Un ejemplo específico de la utilización de proteasas marinas es la tripsina del bacalao de Groenlandia en el curado de arenque y fermentación de calamar; esta tripsina posee alta actividad catalítica a baja temperatura. La suplementación de la maduración del arenque con extractos enzimáticos de vísceras del mismo pescado o con tripsina del ciego pilórico del bacalao de Groenlandia beneficia la formación de aminoácidos que mejoran el sabor (glutamato, alanina, leucina, serina, lisina, arginina, y prolina). La tasa inicial de solubilización de proteína con tripsina de bacalao es casi el doble de la observada con tripsina bovina. Para el calamar fermentado en procesos a 4°C, la adición de tripsina de bacalao aumenta la formación de aminoácidos libres y las puntuaciones sensoriales del producto final. Otra aplicación de proteasas marinas es la producción de queso (en Noruega) empleando pepsina de bacalao del Atlántico o enzimas gástricas de atún (*Thunnus obesus*). Asimismo, el queso tipo Cheddar se ha preparado con proteasas similares a la quimosina de la mucosa gástrica de foca arpa (*Pagophilus groenlandicus*), la cual tienen propiedades catalíticas similares a quimosina de ternera. El queso fabricado con proteasas de foca tiene un puntaje sensorial más alto que el obtenido con cuajo de ternera, además que las proteasas gástricas de foca son más estables que las pepsinas a pH neutro a alcalino, y son activas a pH más bajo (pH 6.6) que las proteasas del cuajo de ternero (pH 6.8-7) para coagular la leche. En el mismo contexto, la capacidad de las tripsinas de animales marinos para hidrolizar proteínas nativas es aprovechada en la inactivación de la pectin metil esterasa (PME) y polifenoloxidasas en la producción de jugos de cítricos y manzana, respectivamente (Haard y Simpson, 2000).

En acuicultura, es importante la accesibilidad de nutrientes de los recursos alimenticios, la cual está determinada por el perfil y actividad de enzimas digestivas de los organismos (Furne y col., 2005). Por lo que el estudio de la actividad de enzimas digestivas es un paso esencial para entender las necesidades digestivas y nutricionales de los animales acuáticos para su acuicultura (Le Moullac y col., 1997). La evaluación del coeficiente de digestibilidad aparente en alimentación de organismos marinos es un prerrequisito esencial para determinar los requerimientos de nutrientes de los organismos y desarrollar dietas nutricionalmente balanceadas y a bajo costo (Xia y col., 2013).

### **2.3 Hidrolizados de proteína.**

Los hidrolizados de proteína tienen una amplia gama de aplicaciones potenciales como: alimentos (Frokjaer, 1994; Lahl y Braun, 1994), ingredientes para la alimentación animal (Faid y col., 1997), ingredientes para medios de cultivo microbiano (Vecht-Lifshitz y col., 1990), y fertilizantes (Kurbanoglu y Algur, 2002). La hidrólisis de proteínas con enzimas es un método eficiente para mejorar las propiedades funcionales y nutricionales de las proteínas de origen animal, vegetal o de subproductos. En su estado natural las proteínas tienen poca o nula contribución a la formación de sabores en los alimentos; los productos de la hidrólisis, tales como péptidos y aminoácidos, son capaces de producir sabor, además de interactuar con otros componentes de los alimentos como azúcares y grasas, creando sabores específicos. Los extractos con sabor a carne producidos por hidrólisis proteica se utilizan en sopas, salsas y comidas preparadas; el material proteínico recuperado por la aplicación de proteasas puede obtenerse a partir de residuos de huesos de vaca, cerdo, pavo y pollo. Asimismo, los desperdicios de la industria pesquera pueden ser utilizados para la producción de hidrolizados de proteínas (Benjakul y Morrissey, 1997; Shahidi y col., 1995). La intensidad del sabor depende del contenido de aminoácidos libres, péptidos y sus productos de reacción (Klomklo, 2008).

Con respecto a la hidrólisis de proteínas de huevo y leche, el interés actual de este proceso se basa en reducir las propiedades alergénicas de estos alimentos (Benedé y col., 2014; Graszekiewicz y col., 2010) y obtener péptidos con diferentes propiedades biológicas (Madureira y col., 2010; Davalós y col., 2004). El huevo contiene alérgenos en la clara, como ovoalbúmina, ovomucoide, ovotransferrina y lizozima (Holen y Elsayed, 1990; Hoffman, 1983). La ovoalbúmina es una fosfoglicoproteína de 45 kDa y es la proteína más abundante de la clara de huevo, contando con 54% (p/p) del contenido proteico. La leche de vaca proporciona nutrientes esenciales como grasas (3-4% del contenido sólido), proteínas (aproximadamente 4% del contenido sólido) y lactosa (5% del contenido sólido), aunque la composición de este alimento varía según la raza de la vaca (Muehlhoff y col., 2013). Las proteínas de la leche son resistentes a muchos de los tratamientos a los que se somete este alimento. La  $\beta$ -lactoglobulina es la proteína que con mayor frecuencia induce alergia, seguida de las caseínas ( $\alpha_{S2}$ -caseína,  $\alpha_{S1}$ -caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína),  $\alpha$ -lactoalbúmina y con menos frecuencia la seroalbúmina bovina. Las caseínas constituyen alrededor del 79% del total de la proteína de la leche de vaca. La mayoría de los pacientes alérgicos a caseína están sensibilizados a los cuatro tipos de caseína (Restani y col., 1999).

### **2.4 Péptidos bioactivos (Actividad antioxidante).**

Los péptidos bioactivos se han definido como fragmentos específicos de proteínas, entre 3 y 20 aminoácidos de longitud, encriptados en la estructura primaria de las proteínas (Pérez-Vega y col., 2013), con un impacto positivo en las funciones o condiciones del metabolismo humano (Kitts y Weiler, 2003). Debido a sus aplicaciones potenciales en la salud humana, los péptidos bioactivos derivados de alimentos han atraído el interés de diferentes investigaciones (Kitts, 1994; Madureira y col., 2010), tal es el caso de los péptidos con actividad antioxidante (Mulero-Canovas y col., 2011). Varios estudios reportan que los péptidos bioactivos marinos pueden usarse como componentes antihipertensivos, anticoagulantes, antimicrobianos y antioxidantes en alimentos funcionales o nutraceuticos y farmaceuticos, debido a su potencial terapéutico en el tratamiento o prevención de enfermedades (Kim y col., 2010). El papel de los antioxidantes ha recibido cada vez más atención; los antioxidantes sintéticos poseen actividades antioxidantes más fuertes, sin embargo su uso conlleva riesgos potenciales para la salud (Ito y col., 1986). Por lo tanto, el interés se ha enfocado al estudio de antioxidantes naturales efectivos, como los péptidos bioactivos, los cuales pueden proteger al ser humano de radicales libres y retardar el progreso de varias enfermedades crónicas (Zhou y col., 2012).



Los péptidos antioxidantes actúan previniendo que otras moléculas se unan al oxígeno, reaccionando e interactuando más rápidamente con los radicales libres que otras moléculas presentes (Reitter y col., 1995). Es decir, los compuestos antioxidantes bloquean la producción de compuestos que pueden dañar a las proteínas, lípidos y ADN, y por tanto evitar el desarrollo de diversas patologías y envejecimiento. El daño oxidativo también tiene gran importancia en los alimentos pudiendo afectar su calidad nutricional y funcional.

Se ha reportado que los péptidos derivados de hidrolizados de proteínas marinas actúan como antioxidantes potenciales (Khantaphant y Benjakul, 2008; Kim y col., 2010). Entre las fuentes marinas estudiadas están diversos invertebrados como el calamar gigante (*Dosidicus gigas*) (Mendis y col., 2005a; Rajapakse y col., 2005a), las ostras (*Crassostrea gigas*) (Qian y col., 2008), los productos fermentados de mejillón (*Mytilus edulis*) (Jung y col., 2005; Rajapakse y col., 2005b), el mejillón azul (*Mytilus coruscus*) (Jung y col., 2007), y las gónadas de erizo de mar púrpura (*Strongylocentrotus nudus*) (Qin y col., 2011). Adicionalmente, numerosos péptidos bioactivos han sido aislados de subproductos marinos en diferentes procesos (Kim y col., 2000, 2001; Jun y col., 2004; Ravallec y col., 2001). Los péptidos bioactivos marinos pueden producirse por diversos métodos, los principales son por extracción con solventes, fermentación microbiana e hidrólisis enzimática, este último con proteasas como tripsinas, pepsinas y quimotripsinas (Su y col., 2012; Hong y col., 2008; Tauzin y col., 2003). Sin embargo, el método de hidrólisis enzimática es preferible en las industrias de alimentos y farmacéutica debido a que no generan compuestos dañinos para la salud (Kim y col., 2010).

Autores como: Zhong y col., 2007; Zheng y col., 2007; Chenghui y col., 2007; Althunibat y col., 2009; Su y col., 2009; Mamelona y col., 2010; Wang y col., 2010; Chen y col., 2010; y Hamaguchi y col., 2010, han reportado péptidos con actividad antioxidante en diferentes especies de pepino de mar. Pérez-Vega y col. (2013) estudiaron péptidos con actividad antioxidante del pepino de mar *Isostichopus badionotus*, especie existente en México.

### 3 ANTECEDENTES.

Algunas especies de pepino de mar como: *Holothuria forskali* (O'Donoghue y Johnson, 1986; DeMoor y col., 2003), *Holothuria glaberrima* (Quiñones y col., 2002), *Cucumaria frondosa* (Koob, 1999; Tipper y col., 2003), *Cucumaria elongata* (Fish, 1967), *Parastichopus californicus* (Liu y col., 2010) y principalmente *Stichopus japonicus*, han sido objeto de estudios bioquímicos. Sin embargo, hasta el momento no existen reportes sobre las proteasas de *Isostichopus fuscus*.

Se ha reportado que los pepinos de mar poseen mecanismos de autólisis activados por factores ambientales y mecánicos, generando pérdidas económicas durante su cultivo, procesamiento y conservación (Wu y col., 2013a). Debido a lo anterior, los holotúridos han sido sometidos a diferentes estudios para entender sus mecanismos de degradación. Diversos grupos de investigación han reportado en *S. japonicus*, colagenasas (Fu y col., 2005), catepsinas (Qi y col., 2007; Zhu y col., 2008b; Sun y col., 2011), fosfatasa acida (Zhu y col., 2009), metalo proteasas (Wu y col., 2013a), entre otras enzimas relacionadas con la digestión.

Las enzimas proteolíticas del tracto digestivo de *S. japonicus* fueron estudiadas por Fu y col. (2005), quienes encontraron alta actividad caseinolítica y ácida, sugiriendo la presencia de metalo proteasas, probables colagenasas con actividad similar a la tripsina y quimotripsina (serín proteasas); en este estudio se reportó también la alta estabilidad térmica de las metalo proteasas alcalinas caracterizadas. Por su parte, Qi y col. (2007) purificaron y caracterizaron proteasas de la pared del cuerpo de *S. japonicus*. Por medio de estudios de inhibición y activación concluyeron la existencia de enzimas similares a las cisteín proteasas con gran estabilidad a la temperatura y pH. Zhu y col. (2008b) purificaron una enzima de *S. japonicus* similar a la catepsina L, sugiriendo que esta proteasa se encuentra en forma de complejo enzima-inhibidor o precursor. Zhu y col. (2009) reportaron la presencia de fosfatasa acida de alto peso molecular en la pared del cuerpo de *S. japonicus*, purificadas por una combinación de métodos cromatográficos y asociadas con la digestión de proteínas. Estudiaron además, la estabilidad a diferente pH y temperatura, el efecto de diversos iones, y análisis por espectrometría de masas. Sun y col. (2011) purificaron una catepsina B del intestino de *S. japonicus* con buena estabilidad al pH y la temperatura. Con estudios de inhibición y la secuencia de aminoácidos por espectrometría de masas, demostraron que se trataba de cisteín proteasas con grupos sulfihidrilo, sugiriendo que podía tratarse de un nuevo miembro de esta familia de enzimas. Recientemente, Wu y col. (2013a) purificaron una metalo proteasa gelatinolítica (GMP) de la pared del cuerpo de *S. japonicus* y la caracterizaron para dilucidar la causa de la autólisis de este organismo marino. El estudio se enfocó en la participación de dichas enzimas en la degradación de colágeno y la purificación se realizó mediante una combinación de fraccionamiento con sulfato de amonio y cromatografía. En la Tabla 3, se muestran las características de las purificaciones de proteasas de *S. japonicus* reportadas en la literatura.

Por otra parte, el análisis de la composición del pepino de mar es esencial para entender el proceso de degradación por autólisis. Se ha determinado la composición química y estructura de las fibras de colágeno altamente insoluble que constituye la dermis (principal parte comestible) del pepino de mar *S. japonicus* (Cui y col., 2007). Así mismo, se ha analizado la proteólisis del colágeno y las proteínas no colágenas presentes (Wu y col., 2013a,b).



Tabla 4. Antecedentes de purificación de enzimas proteolíticas del pepino de mar *S. japonicus*.

| Órgano de estudio | Cantidad de muestra | Obtención de extracto crudo  | Métodos de purificación   | Enzima sugerida                        | Referencia         |
|-------------------|---------------------|--|---|--|--------------------|
| Tracto digestivo  | 20 organismos       | Amortiguador: Tris-HCl 50 mM (pH 7.5).<br>Centrifugación: 10 000 g, 30 min, 4°C.   | Cromatografía de intercambio iónico:<br>Q-Sepharose FF,<br>Cromatografía de filtración en gel: Sephacryl S-300.   | Serín proteasa<br>Metaloproteasa       | Fu y col., 2005.   |
|                   | 100 g               | Amortiguador: acetato de sodio 50 mM (pH 5.0) con L-cisteína 5 mM, EDTA 1 mM y Triton X-100 al 0.2%.<br>Centrifugación: 20 000 g, 20 min, 4°C.<br>Fraccionamiento: (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 80%.              | Cromatografía de intercambio iónico:<br>DEAE Sepharose CL-6B,<br>Cromatografía de filtración en gel: Sephadex G-75 y TSK-Gel 3000 SWxl.   | Catepsina B                            | Sun y col., 2011.  |
| Pared del cuerpo  | 50 g                | Amortiguador: ácido cítrico citrato de sodio 50 mM (pH 5.0).<br>Autólisis: radiación UV (30 W) por 30 min.<br>Centrifugación: 12 000 rpm, 10 min, 4°C.<br>Fraccionamiento: (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20 y 80%. | Cromatografía de intercambio iónico: DE-52 celulosa,<br>Cromatografía de filtración en gel: Sephadex G-100.   | Proteasa similar a cisteín proteasas   | Qi y col., 2007.   |
|                   | 100 g               | Amortiguador: acetato de sodio 50 mM (pH 5.0) con EDTA 1 mM y Triton X-100 al 0.2%.<br>Centrifugación: 10 000 g, 20 min, 4°C.  | Fraccionamiento: (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20-80%.<br>Cromatografía de intercambio iónico: DEAE Sepharose CL-6B, Cromatografía de filtración en gel: Sephadex G-75, TSK-Gel.  | Proteasa similar a catepsinas L        | Zhu y col., 2008b. |
|                   | 500 g               | Amortiguador: Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) con glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 5 mM, PMSF 5 mM y EDTA 5 mM.<br>Centrifugación: 13 680 g, 15 min, 4°C.<br>Fraccionamiento: (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 80%.             | Cromatografía de intercambio iónico:<br>DEAE Sepharose CL-6B,<br>Cromatografía de filtración en gel: Sephacryl S-100, HPLC con TSK-Gel 4000 PWxl.   | Fosfatasa ácida de alto peso molecular | Zhu y col., 2009.  |
|                   | 400 g               | Amortiguador: Tris-HCl 20 mM (pH 8) con 5mM CaCl <sub>2</sub> y 0.02% NaN <sub>3</sub> .<br>Centrifugación: 10 000 g, 15 min, 4°C.   | Fraccionamiento: (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 30-80%.<br>Cromatografía de intercambio iónico: DEAE-Sepharcel,<br>Cromatografía de filtración en gel: Sephacryl S-200 HR,<br>Cromatografía de intercambio iónico: Q-Sepharose,<br>Cromatografía de interacción hidrofóbica: Phenyl-Sepharose 6-Fast Flow. | Metaloproteasa                         | Wu y col., 2013a.  |

En el estudio que antecedió la presente tesis (Hernández-Sámamo, 2010) se reportaron las actividades proteolíticas de extractos de los tentáculos, el tracto digestivo, los túbulos internos, el árbol respiratorio y diferentes regiones de piel y músculo de *I. fuscus*, empleando técnicas enzimáticas e histológicas. La caracterización histológica mostró la presencia de gran cantidad de tejido conjuntivo, agregados de células con actividad digestiva, epitelios de regiones digestivas, inclusiones que sugieren la acción de defensa de hemocitos, túbulos intestinales, parásitos y residuos de alimentos. Los tejidos con evidente cantidad de células con actividad digestiva fueron los tentáculos, los túbulos internos, el árbol respiratorio y la piel dorsal. La caracterización enzimática mostró que la mayoría de las proteasas presentes en los órganos estudiados de *I. fuscus* poseen mayor actividad proteolítica en la región alcalina que a pH ácido. Se observó actividad proteolítica pronunciada a pH de 6 a 10. De igual forma se observó que en comparación a las otras regiones de piel y músculo estudiadas, la piel externa y la piel ventral presentaron la mayor actividad proteolítica a pH 10. Se sugirió que la causa de la alta actividad proteolítica a pH básico de los extractos de la piel de *I. fuscus* es debida al contacto de estas regiones anatómicas con el medio ya que son organismos adaptados a la reptación encontrándose en el fondo marino filtrando grandes cantidades de arena.

## 4 JUSTIFICACIÓN.

Los pepinos de mar poseen la capacidad de autolizarse en respuesta a diferentes factores ambientales y mecánicos debido a la presencia de enzimas proteolíticas endógenas, por lo que se requiere del estudio de dichas proteasas para entender los procesos de degradación. Adicionalmente, la caracterización de las proteasas del pepino de mar es de gran utilidad en la acuicultura de este organismo para identificar, mejorar la formulación y presentación de dietas. Por otra parte, de forma indirecta, el estudio básico de los pepinos de mar puede incentivar la producción, aprovechamiento y conservación de dichos organismos marinos.

## 5 HIPÓTESIS.

Las proteasas del pepino de mar *Isostichopus fuscus* presentan características fisicoquímicas particulares, tales como alta actividad proteolítica y estabilidad a la temperatura y el pH. Adicionalmente, dichas proteasas pueden proporcionar ventajas sobre las proteasas de animales terrestres y/o microbianas en aplicaciones biotecnológicas.

## 6 OBJETIVOS.

### 6.1 Objetivo general.

Purificar parcialmente y caracterizar extractos proteolíticos del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos del pepino de mar *Isostichopus fuscus* capturado en el Golfo de California (México), y estudiar la capacidad de sus proteasas para generar hidrolizados de proteínas.

### 6.2 Objetivos particulares.

1. Determinar el efecto del pH, la temperatura, el almacenamiento en refrigeración, inhibidores de proteasas e iones, sobre la actividad de extractos proteolíticos crudos del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos de *I. fuscus* e identificar en forma tentativa el tipo de enzimas proteolíticas presentes.
2. Purificar parcialmente los extractos proteolíticos crudos del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos de *I. fuscus*, determinar el efecto del pH y la temperatura sobre su actividad proteolítica, e identificar el tipo de enzimas proteolíticas presentes.
3. Purificar los extractos proteolíticos parcialmente purificados del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos de *I. fuscus*, estimar el peso molecular e identificar la proteasa mayoritaria en los extractos proteolíticos purificados.
4. Estudiar la capacidad del extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus* para generar hidrolizados de proteínas, a partir de proteínas de huevo, leche y músculo dorsal de *I. fuscus*.

## 7 MATERIALES Y MÉTODOS.

### 7.1 Obtención de especímenes.

Se extrajeron doce especímenes de *Isostichopus fuscus* de dos zonas del Golfo de California (México). La primera captura fue cerca de la Isla Tiburón (28° 42' 48.6" N, 112° 17' 22.8" W) en Sonora, gracias a la colaboración del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD). La segunda captura fue en el complejo insular Espíritu Santo (24° 36' N, 110° 18' W) en Baja California Sur, gracias a la colaboración del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR). La colecta se llevó a cabo a profundidades de 3 a 15 m, siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010), una vez obtenida la licencia de captura correspondiente (licencia: SGPA/DGVS/00616/11). Los organismos se mantuvieron en agua de mar a 10-15°C por 24 h antes de ser sacrificados y disectados.

### 7.2 Análisis de especímenes.

Se registraron las características morfológicas externas, los pesos y las longitudes de los pepinos de mar capturados antes de ser sacrificados. Posteriormente, se analizaron las espículas u osículos presentes en el músculo de *I. fuscus* (Solís-Marín y col., 2009). Se tomó una muestra del músculo de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup>, se colocó en un tubo de ensayo con 5 mL de hipoclorito de sodio y se agitó hasta desintegrar totalmente la materia orgánica. Se retiró el hipoclorito de sodio y se dejó el precipitado para posteriormente lavarlo con agua destilada y remover el exceso de cloro. Se tomó una muestra del precipitado y se observó en el microscopio óptico a 100x.

### 7.3 Análisis proximal.

#### Porcentaje de humedad y materia seca.

Se siguió el método descrito por la AOAC (1975). Se pesaron 0.5 g de cada órgano estudiado (músculo ventral, tracto digestivo y tentáculos) en cápsulas de porcelana previamente llevadas a peso constante por 2 h a 100°C en una estufa Riossa (D.F., México). Las muestras se secaron por 24 h a 100°C y posteriormente se pesaron (antes de la medición se colocaron por 15 min en un desecador a temperatura ambiente). Los cálculos de humedad y materia seca se obtuvieron de las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Humedad} = [\text{Pérdida de peso de la muestra (g)} / \text{Peso inicial de la muestra (g)}] \times 100$$

$$\% \text{ Materia seca} = 100 - \% \text{ Humedad}$$

#### Ceniza y materia orgánica.

Se siguió el método descrito por AOAC (1975). Se colocaron crisoles en una estufa Riossa (D.F., México) a 100°C por 2 h, se dejaron en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y posteriormente se pesaron. Las muestras de 0.5 g se pesaron en los crisoles y se calentaron en una mufla a 500°C por 12 h (la temperatura se incrementó gradualmente), se dejaron enfriar dentro de la mufla hasta 100°C, se colocaron en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesaron. Los porcentajes de cenizas y materia orgánica se calcularon con las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ ceniza} = [(\text{peso crisol} + \text{muestra}) - (\text{peso crisol} + \text{cenizas}) \times 100] / \text{peso de la muestra}$$

$$\% \text{ materia orgánica} = \% \text{ materia seca} - \% \text{ ceniza}$$

### Contenido de proteína.

El contenido de proteína se analizó por el método de Kjeldahl (AOAC, 1975). Se pesaron 0.2 g de cada órgano estudiado (músculo ventral, tracto digestivo y tentáculos) y se colocaron en matraces micro Kjeldahl; se adicionaron 0.8 g de catalizador (96 g de sulfato de sodio, 3.5 g de sulfato de cobre y 0.5 g de selenio negro) y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla fue digerida en un micro digestor Kjeldahl “DGMK-630” de FIGURSA (Estado de México, México) hasta que la solución se tornó transparente (aproximadamente 5 h), se enfrió a temperatura ambiente y se transfirió a un destilador, lavando el matraz con 5 mL de agua destilada.

Las mezclas fueron neutralizadas con 20 mL de hidróxido de sodio al 40%, se destilaron de 100 a 130 mL, recogiendo la muestra por burbujeo en 20 mL de ácido bórico 4% con 8 gotas de solución indicadora (20 mg de rojo de metilo + 100 mg de verde de bromocresol, aforado a 100 mL con alcohol etílico 96%). La solución obtenida se tituló con ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N hasta cambiar de color azul a naranja. El porcentaje de nitrógeno total en la muestra se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ N} = [V_{\text{HCl}} \times N_{\text{HCl}} \times 14 \times 100] / \text{peso de la muestra (mg)}$$

Donde:

$V_{\text{HCl}}$  = Volumen consumido de HCl en la titulación (mL).

$N_{\text{HCl}}$  = Normalidad del HCl (0.1 N).

El porcentaje de proteína cruda se estimó multiplicando el porcentaje de nitrógeno total por un factor de 6.25, establecido para carnes y pescado (MAFF, 1975).

### 7.4 Obtención de extracto proteolítico crudo de los órganos de estudio de *I. fuscus*.

Los pepinos de mar fueron disectados para separar el músculo ventral, el tracto digestivo y los tentáculos, los cuales se lavaron con agua destilada fría para eliminar impurezas. Cada órgano se homogeneizó con amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7, a 4°C (relación tejido:amortiguador, 1:2), con un homogeneizador “PRO 250” de PRO Scientific (Monroe, Connecticut, Estados Unidos). Los homogenizados se centrifugaron a 10 000 g durante 30 min a 4°C en una centrifuga “5810R” de Eppendorf (Hamburgo, Alemania) con rotor F-34-6-38. Se separó el extracto proteolítico crudo (sobrenadante) y se almacenó a 4°C hasta su análisis.

### 7.5 Caracterización del extracto proteolítico.

Se caracterizaron los extractos proteolíticos crudos del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos de *I. fuscus*. Se determinó el efecto de pH, temperatura, almacenamiento en refrigeración, inhibidores de proteasas e iones, sobre la actividad de las enzimas proteolíticas. Se estimó el peso molecular de las proteínas presentes y se identificó la actividad proteolítica por zimografía de acuerdo a los métodos que se describen a continuación.

### 7.5.1 Concentración de proteína.

Se determinó la concentración de proteína de los extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus* por el método de biuret (Gornall y col., 19; Robinson y Hogden, 1940), para los extractos proteolíticos parcialmente purificados y purificados se utilizó el método de Lowry y col. (1951), y para los hidrolizados de proteína del músculo dorsal de *I. fuscus* se usó el método del ácido bicinconínico (BCA) (Smith y col., 1985) con el equipo de Thermo Scientific Pierce (Rockford, Illinois, Estados Unidos). Se empleó albúmina sérica bovina (BSA) como estándar en todos los métodos; las curvas estándar se muestran en el Anexo 1.

### 7.5.2 Determinación de actividad proteolítica.

La actividad proteolítica se analizó por hidrólisis de hemoglobina al 1% (p/v) en solución ácida (ácido bórico 0.025 M, ácido fosfórico 0.025 M y ácido acético 0.25 M) (Anson, 1938), y por hidrólisis de caseína al 1% (p/v) en amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7, a 4°C (Kunitz, 1946). Se agregaron 250 µL de sustrato (al pH correspondiente) y 80 µL de extracto proteolítico, y se dejaron reaccionar durante 15 min a 37°C o a la temperatura óptima (condición previamente establecida). La reacción enzimática se detuvo con 175 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 25% (p/v) y se centrifugó a 10 000 g por 10 min en una microcentrífuga “14K” de Bio-Rad (Hercules, California, Estados Unidos). El sobrenadante (péptidos resultantes de la hidrólisis) se leyó a 280 nm en un espectrofotómetro “DU-650” de Beckman (Fullerton, California, Estados Unidos). Los resultados se expresaron como actividad específica (U/mg<sub>proteína</sub>), donde una unidad de actividad proteolítica (U) se define como la cantidad de enzima que produce un cambio de 0.001 en la absorbancia a 280 nm por min (Yamaguchi y col., 1982). Por lo tanto:

$$U = [\text{Abs}_{280\text{nm}} \times \text{Factor de dilución}] / [0.001 \times \text{tiempo de reacción (min)}]$$

### 7.5.3 Efecto del pH sobre la actividad proteolítica.

El pH óptimo de actividad de las enzimas proteolíticas se determinó en el intervalo de pH 2 a 5 con hemoglobina 1%, y en el intervalo de pH 6 a 10 con caseína 1%, como se indica en el método de determinación de actividad proteolítica descrito en el apartado 7.5.2. La estabilidad de las enzimas proteolíticas en estos intervalos de pH se analizó incubando previamente el extracto con los siguientes amortiguadores durante 1 h a temperatura ambiente: KCl-HCl 0.1 M (pH 2), Gly-HCl 0.2 M (pH 3-4), amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH 5-8), y Tris-HCl 0.1 M (pH 9-10) (Fu y col., 2005). Posteriormente, se determinaron las actividades proteolíticas de acuerdo al método de determinación de actividad proteolítica (apartado 7.5.2) en las condiciones óptimas de pH y temperatura (pH 6 y 60°C), reportando los resultados como actividad residual.

### 7.5.4 Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica.

La temperatura óptima de actividad de las proteasas se determinó midiendo las actividades proteolíticas como se describió en el apartado 7.5.2, a diferentes temperaturas de reacción en el intervalo de 0 a 80 °C, a pH óptimo de actividad proteolítica (pH 6). El efecto de la temperatura sobre la estabilidad proteolítica se evaluó incubando previamente el extracto a diferentes temperaturas en el intervalo de 0 a 80 °C durante 1 h y posteriormente se determinaron las actividades proteolíticas en las condiciones óptimas de pH y temperatura (pH 6 y 60°C), siguiendo el método de determinación de actividad proteolítica (apartado 7.5.2), reportando los resultados como actividad residual.

### 7.5.5 Cinética de inactivación térmica.

Una estrategia indirecta para estudiar la estabilidad termodinámica de las proteínas es mediante el estudio de cinéticas de inactivación o desnaturalización térmica, las cuales son generalmente expresadas en términos de tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) a cierta temperatura. Por lo tanto, se realizaron cinéticas de inactivación térmica incubando los extractos proteolíticos a 70°C por 1 h, tomando alícuotas cada 10 minutos para la medición de la actividad proteolítica (apartado 7.5.2) en las condiciones óptimas de pH y temperatura (pH 6 y 60°C), reportándose como actividad residual. Dado que la cinética de inactivación térmica de las enzimas sigue generalmente una cinética de primer orden, de la forma:

$$A = A_0 e^{-K_d t}$$

Donde:

A=Actividad proteolítica final.

$A_0$ =Actividad proteolítica inicial.

$K_d$ =constante de inactivación.

t=tiempo de reacción.

Se calculó la constante de inactivación enzimática aparente ( $K_d$ ) y el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) a partir del gráfico Ln (actividad final /actividad inicial) contra el tiempo de incubación (en minutos), donde la pendiente de la recta es el valor de  $K_d$  y  $t_{1/2} = \text{Ln}(2/K_d)$  (Hernández-Martínez y col., 2011).

### 7.5.6 Efecto de almacenamiento en refrigeración sobre la actividad proteolítica.

Los extractos proteolítico se mantuvieron en refrigeración a 4°C durante 22 días, cada dos días se midió la actividad proteolítica en las condiciones óptimas de pH y temperatura (pH 6 y 60°C) de acuerdo al método de determinación de actividad proteolítica descrito en el apartado 7.5.2, reportando los resultados como actividad residual.

### 7.5.7 Efecto de inhibidores de proteasas sobre la actividad proteolítica.

Se determinó el efecto de diferentes inhibidores de proteasas sobre la actividad enzimática de los extractos proteolíticos estudiados (Fu y col., 2005; García-Carreño, 1992; Sookkheo y col., 2000; Benyon y Bond, 2001). Los inhibidores utilizados fueron: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 5 mM y Na-tosil-L-lisin clorometilcetona (TLCK) 10 mM para serín proteasas, inhibidor de tripsina (TI) 0.6 g/mL para inhibición de tripsinas, ácido etilen diamino tetra acético (EDTA) 10 mM para metalo proteasas, pepstatina A 1  $\mu\text{M}$  para inhibición de aspartil proteasas, y  $\beta$ -mercaptoetanol 1 mM para cisteín proteasas. El extracto proteolítico se incubó con el inhibidor correspondiente (1:1, v/v) durante 1 h a 25°C, posteriormente se analizó la actividad proteolítica a las condiciones óptimas de pH y temperatura (pH 6 y 60°C), de acuerdo al método de determinación de actividad proteolítica indicado en el apartado 7.5.2, reportando los resultados como actividad residual.

### 7.5.8 Efecto de iones sobre la actividad proteolítica.

Se determinó el efecto de iones sobre la actividad de los extractos proteolíticos utilizando  $\text{MnSO}_4$  y  $\text{CuSO}_4$ , y en forma de sales de cloro:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , y  $\text{Ba}^{2+}$  (Qi y col., 2007; Zhu y col., 2008b; Sun y col., 2011; Wu y col., 2013a). Las soluciones salinas se ajustaron a una concentración de 10 mM. El extracto proteolítico y la solución salina correspondiente, relación 1:1 (v/v), se incubaron durante 1 h a 25°C.



La actividad proteolítica se evaluó a las condiciones óptimas de pH y temperatura (pH 6 y 60°C), por el método de determinación de actividad proteolítica indicado en el apartado 7.5.2, reportando los resultados como actividad residual.

## **7.5.9 Análisis electroforéticos.**

### **7.5.9.1 SDS-PAGE.**

Los extractos proteolíticos se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, “Dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”) de acuerdo al método de Laemmli (1970) en un sistema de electroforesis vertical “Mini-Protean Tetra Cell” de Bio-Rad (Hercules, California, Estados Unidos). Se emplearon geles discontinuos (0.75 mm) de 8 a 10 % de acrilamida para los geles de separación y de 4 a 5 % de acrilamida para los geles de concentración. Las muestras (extracto proteolítico en amortiguador) se calentaron a 95°C por 1 min antes de ser analizadas. Se utilizó un marcador de pesos moleculares de 45 a 200 kDa de Bio-Rad (ovoalbúmina, 45.00 kDa; albúmina, 66.22 kDa; fosforilasa, 97.40 kDa;  $\beta$ -galactosidasa, 116.25 kDa; miosina, 200 kDa). El análisis se llevó a cabo en las siguientes condiciones: voltaje constante de 150 V, 30 mA y 4°C. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 0.1% (en solución 40% metanol, 10% ácido acético y 50% agua destilada). Por otra parte, se hizo una tinción con plata con el conjunto de reactivos para tinción “Rapid-Ag-Stain” de Schwarz/Mann Biotech (Cleveland, Ohio, Estados Unidos). Los geles se destiñeron con una solución de 40% metanol, 10% ácido acético y 50% agua destilada. El análisis de imágenes se llevó a cabo en un equipo “Gel-Doc 2000” de Bio-Rad con el software Quantity One (versión 4).

### **7.5.9.2 Zimografía.**

Los extractos proteolíticos fueron sometidos a estudios de zimografía de acuerdo al método reportado por García-Carreño y Haard (1993) con algunas modificaciones. Se llevó a cabo una electroforesis (PAGE) en condiciones no desnaturalizantes (sin agregar SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol) a corriente constante de 15 mA por gel, 100 V y 4°C. Posteriormente, los geles se sumergieron en una solución de caseína 2% al pH óptimo de actividad (pH 6) por 1 h a 4°C, después se incubaron por 2 h a la temperatura óptima de actividad (60°C). Pasado el tiempo de incubación, los geles se lavaron con agua destilada varias veces. Finalmente, los geles se tiñeron durante 2 h con azul de Coomassie R-250 al 0.1% y se destiñeron en una solución de 40% metanol, 10% ácido acético y 50% agua destilada, hasta que las zonas bioactivas fueron visibles. Adicionalmente, se realizaron nuevamente zimografías (como se detalla anteriormente), únicamente con el extracto del músculo ventral, a pH de 6 a 10, y zimografías utilizando extractos proteolíticos preincubados por 1 h a 40, 50 y 60 °C.

## **7.6 Purificación parcial de proteasas.**

Se realizó un estudio preliminar con el extracto proteolítico crudo del músculo ventral de *I. fuscus* (debido a la cantidad de muestra disponible) donde se aplicó precipitación de proteínas con sulfato de amonio y ultrafiltración, para seleccionar la fracción con mayor actividad proteolítica.

Posteriormente, el método de purificación parcial de proteasas se dividió en tres etapas: En la primera etapa se aplicó cromatografía de intercambio aniónico en lote. En segunda etapa se aplicó precipitación de proteínas con sulfato de amonio y ultrafiltración bajo las condiciones seleccionadas en el estudio preliminar (mencionado en el párrafo anterior). Finalmente, en la tercera etapa se sometieron las fracciones proteolíticas de interés a cromatografía de intercambio aniónico por LPLC (“Low pressure liquid chromatography”).

En cada etapa de purificación se calcularon el porcentaje de recuperación y el factor de purificación a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Recuperación} = [\text{Actividad total}_{\text{Fracción purificada}} (\text{U}) / \text{Actividad total}_{\text{Extracto crudo}} (\text{U})] \times 100$$

$$\text{Factor de Purificación} = \text{Actividad específica total}_{\text{Fracción purificada}} / \text{Actividad específica total}_{\text{Extracto crudo}}$$

$$\text{Actividad específica total} = \text{Actividad total} (\text{U}) / \text{Proteína total} (\text{mg})$$

Por lo tanto, la purificación parcial del extracto proteolítico crudo del músculo ventral consto de los siguientes métodos: cromatografía de intercambio aniónico en lote (elución con NaCl 0.50 M), precipitación de proteínas con sulfato de amonio saturado al 60%, ultrafiltración con membranas de 100 kDa (recuperando las proteasas mayores a 100 kDa), y cromatografía de intercambio aniónico por LPLC (elución con NaCl 0.50 M). Para los extractos proteolíticos crudos del tracto digestivo y de los tentáculos, sólo se utilizaron cromatografías de intercambio aniónico en lote y por LPLC debido a los resultados obtenidos durante la segunda etapa del método de purificación parcial de proteasas. Los métodos de purificación de proteasas mencionados anteriormente se describen a continuación en los siguientes apartados.

### 7.6.1 Precipitación selectiva de proteínas.

El extracto proteolítico crudo del músculo ventral de *I. fuscus* obtenido como se describió en el apartado 7.4, se fraccionó mediante precipitación de proteínas con sulfato de amonio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  saturado al 60% y 80% de acuerdo a lo reportado por Scopes (1994) (Tabla 4).

Tabla 5. Cantidades de sulfato de amonio por litro para precipitación selectiva de proteínas (Scopes, 1994).

| % de Saturación | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L) |
|-----------------|------------------------------------|
| 60              | 390                                |
| 80              | 140                                |

Las sales residuales de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  presentes como resultado del fraccionamiento fueron eliminadas utilizando bolsas para diálisis con corte de peso molecular (MWCO, “Molecular weight cut off”) de 12 400 de Sigma-Aldrich (D-0405) (Milwaukee, Wisconsin, Estados Unidos), con agua Milli Q durante 12-24 h a 4°C con 4 recambios.

### 7.6.2 Ultrafiltración.

Los extractos proteolíticos precipitados con sulfato de amonio, obtenidos en el apartado 7.6.1, se sometieron a separación por tamaño molecular mediante el uso de tubos “Amicon Ultra-15” de Millipore (Cork, Irlanda) con membranas “Ultracel-50” y “Ultracel-100” (Millipore) de 50 y 100 kDa, respectivamente. Se centrifugaron a 10 000 g por 30 min a 4°C.

### 7.6.3 Cromatografía de intercambio iónico.

#### 7.6.3.1 Cromatografía de intercambio iónico en lote.

Los extractos proteolíticos crudos del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos de *I. fuscus* obtenidos como se describió en el apartado 7.4, se sometieron a cromatografía de intercambio aniónico en lote en una matriz “DEAE Sephadex A50” de Sigma-Aldrich (Milwaukee, Wisconsin, Estados Unidos). Se emplearon como eluyentes soluciones de NaCl de 0.25 y 0.50 M en amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7, a 4°C.

#### 7.6.3.2 Cromatografía de intercambio iónico por LPLC .

Se utilizaron el extracto proteolítico del músculo ventral obtenido por cromatografía de intercambio aniónico en lote (como se mencionó en el apartado 7.6.3.1) precipitado con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado al 60% y ultrafiltrado (fracción con peso molecular mayor a 100 kDa), y los extractos proteolíticos del tracto digestivo y de los tentáculos obtenidos sólo por cromatografía de intercambio aniónico en lote (apartado 7.6.3.1), para ser sometidos a cromatografía de intercambio aniónico por cromatografía líquida de baja presión (LPLC, “Low pressure liquid chromatography”) en el sistema automatizado “Econo system” de Bio-Rad (Hercules, California, Estados Unidos). Se utilizó un cartucho “Econo-Pac High Q” de Bio-Rad, equilibrado con Tris-HCl 25 mM, pH 8.1. Se empleó como eluyente Tris-HCl 25 mM (pH 8.1) + NaCl 0.50 M, leyendo la absorbancia a 280 nm, con un flujo de 0.5 mL/min. Se recolectaron las subfracciones con mayor concentración de proteína y con actividad proteolítica. Dichas subfracciones se desalinizaron en una columna “PD-10 Sephadex G-25” de Amersham Biosciences (Uppsala, Suecia) usando amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7, a 4°C, y se liofilizaron para su conservación.

### 7.7 Purificación e identificación de proteínas por espectrometría de masas (HPLC-MS).

Los extractos proteolíticos parcialmente purificados del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos (obtenidos como se describió en el apartado 7.6.3.2), fueron sometidos a cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC, “Reverse phase-High pressure liquid chromatography”) para purificar las proteasas con mayor actividad, las cuales fueron posteriormente analizadas por espectrometría de masas. Se utilizó el sistema “HPLC Agilent 1100” de Agilent (Waldbronn, Alemania) con una columna “300 Extend-C18-5µm” de Agilent de 4.6 x 250 mm. Las condiciones de operación fueron: flujo 0.5 mL/min, volumen de inyección 20 µL, solvente polar (A): ácido trifluoroacético (TFA) 0.04% en agua Milli-Q, solvente no polar (B): TFA 0.03% en acetonitrilo. Se utilizó un gradiente de solvente B en A de 0 a 60 % en 30 min, registrando la absorbancia a 214 nm con un detector de longitud de onda variable “VWD G1314A” de Agilent empleando el programa informático “Value Solution ChemStation” (Agilent Technologies).

Las proteínas purificadas por RP-HPLC se sometieron a hidrólisis con tripsina de acuerdo al procedimiento de digestión triptica indicado por Thermo Scientific Pierce (Rockford, Estados Unidos) con algunas modificaciones. La relación tripsina:proteína fue de 1:5. La digestión proteica consistió en dos partes: 1) Reducción y alquilación; y 2) Digestión. En la primera parte, se agregaron 15 µL de amortiguador de digestión (solución de bicarbonato de amonio 50 mM en agua ultrapura) y 1.5 µL de amortiguador de reducción (solución de ditiotreitól 100 mM en agua ultrapura).

Se agregaron 10 µL de solución de proteína (0.15 mg/mL) y se ajustó el volumen final a 27 µL con agua ultrapura. La muestra se incubó a 95°C por 5 min y se adicionaron 3 µL de amortiguador de alquilación (solución de iodoacetamida 100 mM en agua ultrapura, preparada en el momento en un tubo cubierto de la luz) y se incubó en obscuridad a temperatura ambiente por 20 min. En la segunda parte, se adicionó 1 µL de tripsina y se incubó a 37°C por 2 h. Posteriormente, se agregó nuevamente 1 µL de tripsina y se incubó a 37°C por 3 h. Terminada la digestión, se detuvo la reacción enzimática por congelamiento a -20°C. Una vez digeridas las proteínas se tomaron 10 µL de muestra (1.5 µg de proteína) y se resuspendieron en 10 µL de agua ultrapura, se filtraron y se analizaron por espectrometría de masas (LC-MS, “Liquid chromatography-Mass spectrometry”) en un equipo “1100 LC/MSD Trap” modelo G2445D de Agilent (Waldbronn, Alemania). Los espectros de MS/MS generados se sometieron a análisis de datos con el programa informático “LC/MSD Trap”, versión 4.1 (Agilent Technologies). Las secuencias se analizaron en las bases de datos “SwissProt” y “NCBIInr” utilizando el buscador “Mascot MS/MS Ions Search” (p < 0.05).

## **7.8 Hidrólisis de proteína y gelatina del músculo de *I. fuscus* con extracto proteolítico de los tentáculos de *I. fuscus*.**

El propósito de esta parte del trabajo fue evaluar la capacidad antioxidante de los péptidos obtenidos a partir de la hidrólisis de proteína y gelatina del músculo dorsal de *I. fuscus*, mediante hidrólisis enzimática con proteasas de los tentáculos de *I. fuscus*, como una alternativa para el aprovechamiento del músculo de pepinos de mar autolizados o de baja calidad, y para aplicar los extractos proteolíticos parcialmente purificados obtenidos de *I. fuscus*.

### **7.8.1 Obtención de proteína y gelatina del músculo de *I. fuscus*.**

Se homogeneizó el músculo dorsal de *I. fuscus* con agua destilada con una relación 1:2 (p/v). El homogenado se calentó a 95°C durante 60 min, cuidando la proporción de agua destilada durante el proceso. Posteriormente, debido al alto contenido de sal, el homogenado se dializó y liofilizó (Pérez-Vega y col., 2013). Se utilizó una solución de proteína al 1% (p/v) en amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7, para la producción de hidrolizados de proteína.

La extracción de gelatina se llevó a cabo por el método de Kim y col. (1994) con algunas modificaciones. Se homogeneizó el músculo dorsal de *I. fuscus* con agua destilada con una relación 1:1 (p/v) y se centrifugó a 10 000 g por 20 min a 4°C. El sedimento se mezcló lentamente con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0.05 M con una relación 1:10 (p/v) por 12 h a 4°C, posteriormente se centrifugó a 10 000 g por 20 min a 4°C. El precipitado se ajustó a pH 7 con agua destilada y HCl 0.1 N. La mezcla se solubilizó por 8 h a 40°C y nuevamente se centrifugó a 10 000 g por 20 min a 4°C. El sobrenadante se utilizó como gelatina para la obtención de hidrolizados.

### **7.8.2 Producción de hidrolizados de proteína y gelatina del músculo de *I. fuscus*.**

El extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus* (obtenido como se describió en el apartado 7.6.3.2) se mezcló separadamente con las soluciones de proteína y gelatina del músculo dorsal de *I. fuscus* (obtenidas como se mencionó en el apartado 7.8.1) a proporciones de enzima:sustrato 1:1, 1:2 y 2:1 (v/v). Se ajustó el pH a 6 en todas las muestras, y se calentó a 60°C por tiempos de hidrólisis de 2, 5, 8 y 24 h. La reacción se detuvo por inactivación térmica a 95°C por 20 min. Posteriormente, el hidrolizado se centrifugó a 10 000 g por 20 min a 4°C y se separó el sobrenadante.

### 7.8.3 Determinación de capacidad antioxidante (ORAC).

Se determinó la capacidad antioxidante por el método de ORAC-FL (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno-Fluoresceína) de acuerdo a las condiciones especificadas por Hernández-Ledesma y col. (2005), modificadas por dichos autores para hidrolizados de proteínas y péptidos. Se llevó a cabo a 40°C en amortiguador de fosfatos 75 mM (pH 7.4). La mezcla final contenía: 120 µL de fluoresceína (70 nM), 60 µL de 2,2'-azo-bis(2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH) (14 mM) y 20 µL de Trolox (0.2-1.6 nmol) o muestra a diferentes concentraciones. Se registró la fluorescencia durante 137 min (104 ciclos) en un lector de placas “Optima Fluostar” de BMG Labtech (Offenburg, Alemania) con 485 nm de excitación y 520 nm de emisión, empleando el programa informático “FLUOstar” versión 1.32 R2 (BMG Labtech) para la medición de fluorescencia. Se calculó el área bajo la curva neta (Net AUC) de las cinéticas de fluorescencia, donde:

$$\text{AUC} = 0.5 + f_1/f_0 + \dots f_i/f_0 + \dots f_{136}/f_0 + 0.5 (f_{137}/f_0)$$

$$\text{Net AUC} = \text{AUC}_{\text{muestra}} - \text{AUC}_{\text{blanco}}$$

Donde:

$f_0$  = fluorescencia al tiempo 0 (min).

$f_i$  = fluorescencia al tiempo i (min).

Posteriormente, se graficó Net AUC a diferentes concentraciones de la muestra o del estándar (Trolox) y las pendientes resultantes se utilizaron para el cálculo del valor de ORAC, expresado como  $\mu\text{mol}_{\text{Trolox}}/\text{mg}_{\text{proteína}}$ , donde:  $\mu\text{mol}_{\text{Trolox}}/\text{mg}_{\text{proteína}} = \text{Pendiente curva muestra}/\text{Pendiente curva estándar (Trolox)}$ .

La técnica, se basa en la capacidad de generación de radicales peroxilo por descomposición térmica del AAPH. Los radicales generados quedan disponibles en el seno de la reacción para oxidar la fluoresceína. Conforme la fluoresceína se degrada, la intensidad de la señal de emisión de fluorescencia va disminuyendo. Compuestos con actividad antioxidante evitan o retrasan este proceso, viéndose que la caída de la señal de fluorescencia se disminuye o se retrasa en el tiempo (Dávalos y col., 2004).

### 7.8.4 Purificación de péptidos con actividad antioxidante (RP-HPLC).

El hidrolizado de proteína del músculo dorsal de *I. fuscus* con mayor valor numérico de ORAC (determinado como se describió en el apartado 7.8.3) se ultrafiltró en tubos “Amicon Ultra-4” con membranas “Ultracel-3” de 3 kDa de Merck-Millipore (Darmstadt, Alemania) a 7 500 g por 30 min a 4°C. Se determinó la actividad antioxidante del filtrado y el retenido por el método de ORAC-FL (apartado 7.8.3). Posteriormente, se aislaron los péptidos de la fracción con mayor capacidad antioxidante por cromatografía preparativa en un equipo de “HPLC Waters 600” de Waters (Milford, Massachusetts, Estados Unidos) con una columna “Hi-Pore Reversed Phase” de 80 x 10 mm de Bio-Rad (Hercules, California, Estados Unidos) para separación de péptidos. Se utilizó solvente polar (A): ácido trifluoroacético (TFA) 0.04% en agua Milli-Q, y solvente no polar (B): TFA 0.03% en acetonitrilo. Se empleó un gradiente de solvente B en A de 0 a 40 % en 60 min, y se registró la absorbancia a 220 nm con un detector “Waters 996”, utilizando el programa informático “Empower 2000” (Waters).

## **7.9 Hidrólisis de proteínas de huevo y leche con extracto proteolítico de los tentáculos de *I. fuscus*.**

Se utilizaron como sustratos las proteínas de huevo: ovoalbúmina (OVA) y lisozima (LYS); y las proteínas de leche: caseína (CN) y  $\beta$ -lactoglobulina (LG). Los sustratos se prepararon a una concentración de 2.5 mg/mL en amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7, 4°C. El extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus* (obtenido de acuerdo al apartado 7.6.3.2), se agregó al sustrato en proporción enzima:sustrato 1:2 (v/v), y se ajustó el pH de reacción a 6. Las hidrólisis se llevaron a cabo a 60°C durante 5 y 24 h. La reacción se detuvo por inactivación térmica a 95°C por 20 min. Posteriormente, se seleccionaron los sustratos que presentaron mayor hidrólisis aparente (OVA y CN) y se realizaron nuevamente ensayos de hidrólisis a 60°C por 24 h, e hidrólisis a 7°C por 24 y 48 h. Por otra parte, se llevó a cabo la hidrólisis de caseína (2.5 mg/mL) con extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus*, con una relación enzima:sustrato 1:4 (v/v), a 60°C por 24 h, e hidrólisis a 7°C por 24 y 48 h. La reacción se detuvo por inactivación térmica a 95°C por 20 min.

### **7.9.1 Análisis electroforético (SDS-PAGE).**

Se analizaron los hidrolizados de proteínas de leche y huevo por SDS-PAGE con geles “Criterion Precast (Criterion XT Bis-Tris-12%)” de Bio-Rad (Richmon, California, Estados Unidos), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las proteínas de leche y huevo utilizadas, y sus hidrolizados fueron diluidos a 1 mg/mL en Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8 (conteniendo: 2% (p/v) de SDS, 5% (v/v) de 2- $\beta$ -mercaptoetanol, 25% (v/v) de glicerol y 0.01% (p/v) de bromofenol azul). Posteriormente, las muestras se calentaron a 95°C por 5 min. La separación electroforética se llevó a cabo a voltaje constante de 150 V en una celda “Criterion” de Bio-Rad. Los geles se tiñeron con “Bio-Safe Coomassie G-250” de Bio-Rad.

### **7.9.2 Análisis por RP-HPLC.**

Se analizaron los hidrolizados de proteínas de leche y huevo por cromatografía de fase reversa en un equipo “HPLC Waters 600” de Waters (Milford, Massachussets, Estados Unidos) con una columna “C18 Widedpore” de 4.6 x 250 mm de Bio-Rad (Richmond, California, Estados Unidos) para separación de péptidos. Las condiciones de operación fueron: flujo de 1 mL/min, volumen de inyección de 50  $\mu$ L, solvente polar (A): ácido trifluoroacético (TFA) 0.037% en agua Milli-Q, solvente no polar (B): TFA 0.027% en acetonitrilo. Se utilizó un gradiente de solvente B en A, de 0 a 40% en 60 min, y se registró la absorbancia a 220 nm con un detector dual “Waters 2487  $\lambda$ ” de Waters empleando el programa informático “Empower 2000” (Waters).

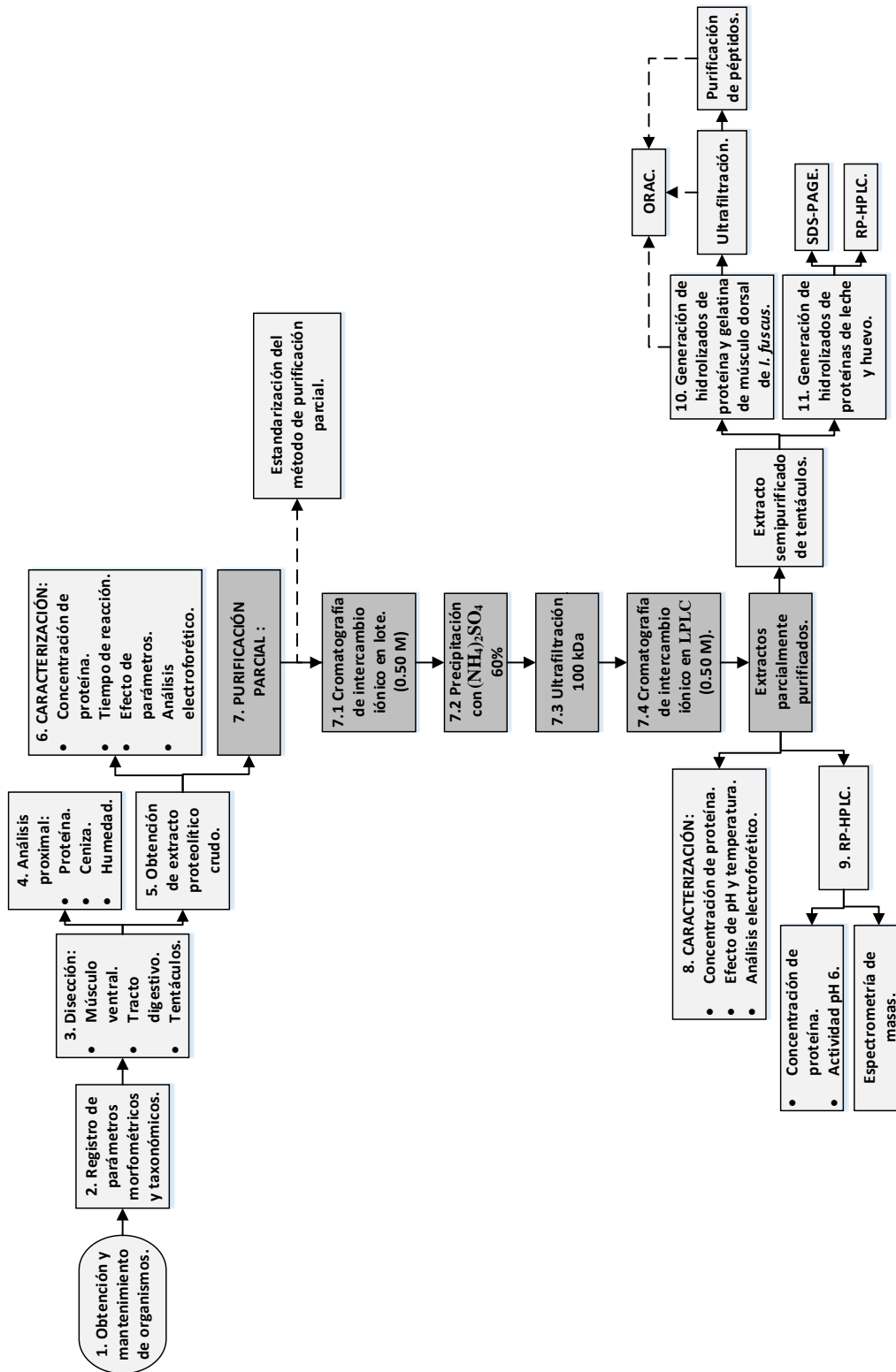
## **7.10 Análisis estadístico.**

Las muestras analizadas se asignaron en un diseño totalmente al azar. Los resultados se sujetaron a análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de Tukey empleando el paquete estadístico SPSS (“Statistical package for the social sciences”) versión 15 para Windows. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado, los resultados fueron expresados como la media de los resultados con su desviación estándar.



## 7.11 Estrategia experimental.

A continuación se indica la estrategia experimental seguida en la presente tesis.

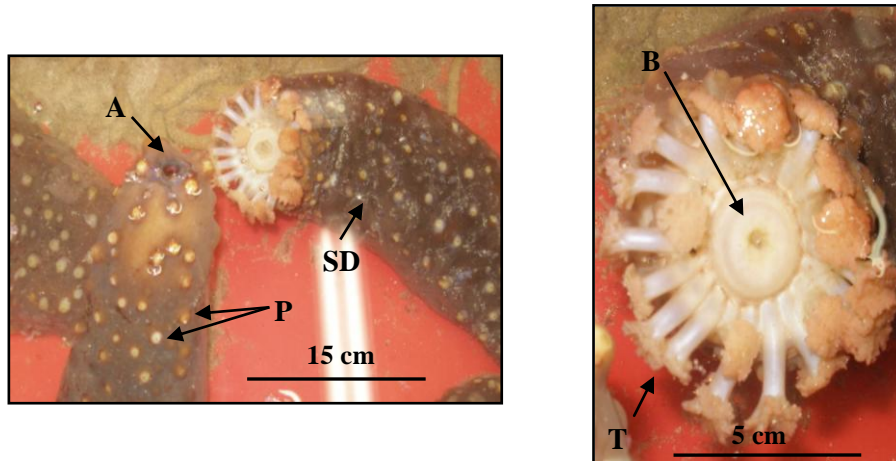




## 8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

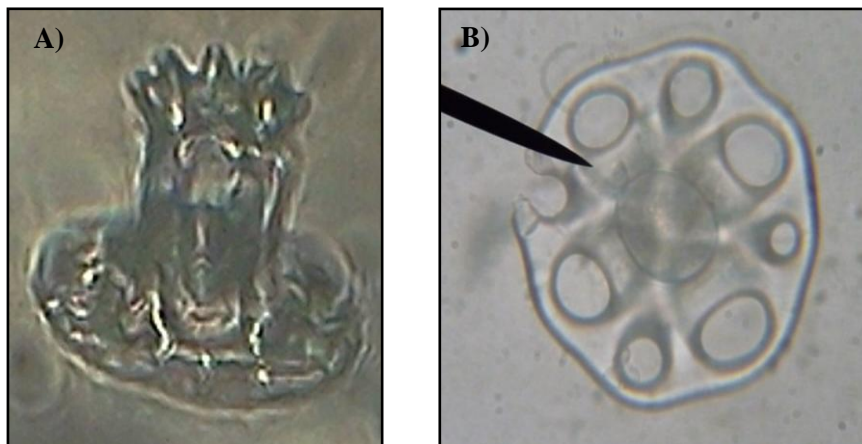
### 8.1 Análisis de especímenes.

Los especímenes capturados presentaron un peso promedio de  $380.0 \pm 39.1$  g y una longitud promedio de  $23.3 \pm 1.4$  cm (Anexo 2), coincidiendo con lo reportado para pepinos de mar adultos de entre 5 y 7 años de edad (Reyes-Bonilla, 1997). Los organismos presentaron las características morfológicas externas (Figura 7) reportadas para *I. fuscus* por Solís-Marín y col. (2009). El análisis de espículas confirmó la especie, presentándose principalmente espículas en forma de tablas (Figura 8), ya que se ha reportado que la familia *Stichopodidae*, a la que pertenece *I. fuscus*, presenta principalmente dichas espículas (Solís-Marín y col., 2009).



Fotos: Hernández-Sámano A.C.

Figura 7. Morfología externa de pepinos de mar *I. fuscus* capturados en el Golfo de California (México). A = Ano; P = Podios; B = Boca; T = Tentáculos peltados.



Fotos: Hernández-Sámano A.C.

Figura 8. Espículas de *I. fuscus* (100x). A) Tabla o mesa; B) Vista superior de una tabla.

## 8.2 Análisis proximal.

El análisis proximal de las muestras de los órganos estudiados se reporta en la Tabla 5. El mayor contenido de proteína se presentó en el tracto digestivo con 32%, seguido del músculo ventral con 21% y finalmente en los tentáculos con 15%. El porcentaje de proteína reportado para otros holotúridos va de 1 a 4 %, 8 a 24 %, hasta 40 a 63 %, es muy variable debido a que la composición proximal del pepino de mar fresco está en función de la especie, las variaciones estacionales y los regímenes alimenticios (Wen y col., 2010; Mehmet y col., 2011; Salarzadeh y col., 2012; Lee y col., 2012; Omran, 2013).

Tabla 6. Análisis proximal del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos de *I. fuscus*.

| Muestra          | Proteína cruda (%) | Humedad (%)  | Ceniza (%)  |
|------------------|--------------------|--------------|-------------|
| Músculo ventral  | 21.02 ± 0.02       | 42.05 ± 1.10 | 5.43 ± 0.42 |
| Tracto digestivo | 31.59 ± 0.44       | 42.04 ± 1.25 | 6.06 ± 1.60 |
| Tentáculos       | 14.99 ± 0.52       | 35.15 ± 5.17 | 5.93 ± 1.05 |

Sin embargo, el contenido de proteína de *I. fuscus* fue similar a lo obtenido por Pérez-Vega y col. (2013), quienes reportaron un contenido de proteína de 37% en *Isostichopus badionotus*, especie distribuida en la península de Yucatán en México, la cual pertenece al mismo género que *I. fuscus*. El alto contenido de proteína en el tracto digestivo puede deberse a la presencia de mayor cantidad de enzimas proteolíticas y a la proteína utilizada como alimento por el animal. Los contenidos de humedad (35-42%) y ceniza (5-6%) en los tres órganos analizados (Tabla 5) también fueron similares a lo reportado para *I. badionotus* (60% de humedad y 5% de ceniza) (Pérez-Vega y col., 2013).

## 8.3 Caracterización de los extractos proteolíticos crudos.

### 8.3.1 Determinación del tiempo de reacción con el extracto del músculo ventral.

La actividad enzimática del extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus* tuvo un decremento significativo ( $p < 0.001$ ) con respecto al tiempo hasta los 15 minutos de reacción donde la actividad proteolítica se mantuvo constante (sin diferencia significativa  $p > 0.05$ ) hasta los 18 minutos de reacción (Figura 9), el análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey se reportan en el Anexo 3.

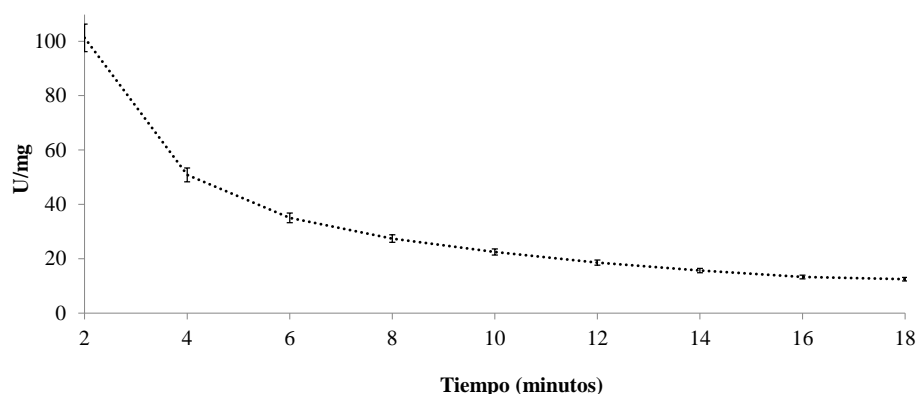


Figura 9. Actividad específica del extracto proteolítico crudo del músculo ventral de *I. fuscus* en función del tiempo de reacción.

Es decir, que 15 min fue el tiempo estimado que necesitaron las proteasas presentes para hidrolizar la mayoría del sustrato. Por tanto, se decidió utilizar 15 min de reacción como una variable de control para todos los análisis de actividad proteolítica posteriores. En la bibliografía, los estudios sobre la actividad proteolítica de las enzimas del pepino de mar *S. japonicus* se realizaron a tiempos de reacción entre 10 y 20 minutos (Fu y col., 2005; Zhu y col., 2008b; Sun y col., 2011).

### 8.3.2 Determinación de concentración de proteína.

El extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus* tuvo la menor concentración de proteína (6.03 mg/mL), seguido de los extractos de los tentáculos (6.17 mg/mL) y el tracto digestivo (6.27 mg/mL) (Tabla 6). Fu y col. (2005) reportaron una concentración de proteína de 6.91 mg/mL en el tracto digestivo de *Stichopus japonicus*, similar a los resultados obtenidos en este estudio.

Tabla 7. Concentración de proteína de extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus*.

| Muestras         | mg/mL*      |
|------------------|-------------|
| Músculo ventral  | 6.03 ± 0.14 |
| Tracto digestivo | 6.27 ± 0.19 |
| Tentáculos       | 6.17 ± 0.01 |

\*Valor medio (o media).

### 8.3.3 Efecto del pH sobre la actividad proteolítica.

La actividad proteolítica en función de pH, de los extractos proteolíticos crudos del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos de *I. fuscus* se presenta en la Figura 10. El análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey se reportan en el Anexo 4. El extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus* tuvo actividad proteolítica significativa ( $p < 0.001$ ) a pH 2, 6 y 8, a 37°C. Los extractos proteolíticos del tracto digestivo y de los tentáculos tuvieron actividades proteolíticas significativas ( $p < 0.001$ ) a pH 6 y 8 (37°C). Los tres órganos estudiados tuvieron perfiles de actividad proteolítica similares, por lo tanto, los resultados presuponen la presencia de proteasas ácidas y alcalinas, posiblemente similares, en los extractos obtenidos. Cabe destacar que el extracto proteolítico de los tentáculos presentó la mayor actividad específica (comparada con la actividad proteolítica del músculo ventral y el tracto digestivo) en el rango de pH estudiado (pH 2-10), lo cual sugiere que los tentáculos podrían funcionar como un sistema de digestión alternativo utilizado por el pepino de mar cuando ha expulsado sus órganos internos como método de defensa (Dolmatov y col., 2009). Se ha reportado que el pepino de mar es capaz de regenerar su tracto digestivo aproximadamente en 3 a 4 semanas, dependiendo de la especie (García-Arrarás y col., 2001).

Los resultados de actividad óptima a pH 6 de las proteasas del músculo ventral coincidieron con los de Wu y col. (2013b), quienes reportaron un pH óptimo de 6.1 (46°C) para cisteín proteasas de la pared del cuerpo de *S. japonicus*. La actividad óptima (a pH 6 y 8) de las proteasas identificadas en el tracto digestivo de *I. fuscus* fue similar a la descrita por Fu y col. (2005) quienes obtuvieron valores máximos de actividad a pH 5 y 8 (37°C) en extracto crudo del tracto digestivo de *S. japonicus*. En cuanto al extracto proteolítico de los tentáculos, no se encontraron reportes en la bibliografía sobre actividad de proteasas presentes en los tentáculos de alguna especie de pepino de mar, por lo que se sugirió que estas estructuras anatómicas poseen el mismo tipo de enzimas proteolíticas que el tracto digestivo, dado a que posiblemente esta región anatómica participa en la degradación del alimento desde el área oral del organismo.

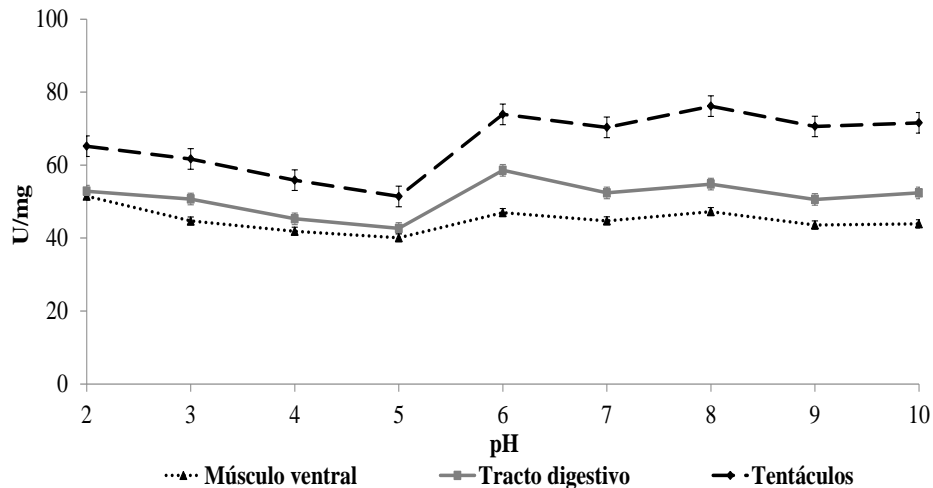


Figura 10. Efecto del pH sobre la actividad de extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus*.

La Figura 11 muestra la estabilidad al pH de los extractos proteolíticos del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos de *I. fuscus*. El análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey se reportan en el Anexo 5.

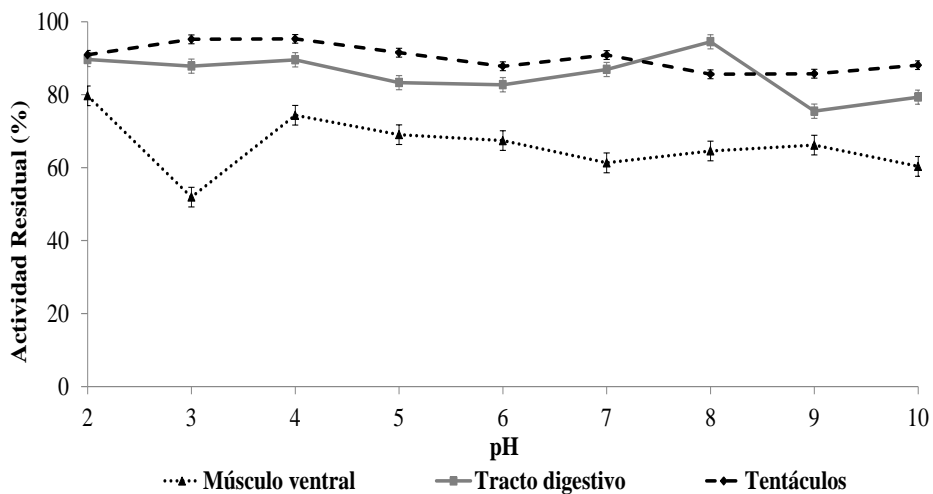


Figura 11. Estabilidad al pH de extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus*.

Las proteasas ácidas del músculo ventral fueron estables a los cambios de pH (Figura 11), reteniendo de 67 a 80 % de su actividad inicial a pH de 2 a 6, excepto a pH 3, donde perdieron 48% de actividad proteolítica. Las proteasas neutras y alcalinas retuvieron de 61 a 66 % de actividad inicial a pH de 7 a 10. La estabilidad proteolítica fue similar a lo obtenido por Qi y col. (2007) para cisteín proteasas de *S. japonicus*, estables a pH de 4 a 7. Sin embargo, nuestros resultados difirieron a lo reportado por dichos autores (Qi y col., 2007) en la región alcalina, ya que ellos mencionaron un decremento significativo de la actividad proteolítica mientras que las proteasas de *I. fuscus* mostraron actividad a pH básico (entre 60 y 66 % de actividad residual).

De igual forma, nuestros resultados coincidieron con lo descrito para *S. japonicus* por Zhu y col. (2008b) para catepsinas L estables a pH de 5 a 6, y por Wu y col. (2013a) para metalo proteasas gelatinolíticas, estables a pH de 6 a 9.

El extracto proteolítico del tracto digestivo fue más estable a pH de 2 a 4 (88-90% de actividad residual) y pH 8 (95% de actividad residual) (Figura 11). Los resultados coincidieron con lo reportado por Fu y col. (2005) para metalo proteasas de *S. japonicus*, estables a pH de 5 a 13.5, y con lo indicado por Sun y col. (2011) para cisteín proteasas (catepsinas B) de *S. japonicus*, estables a pH de 4.5 a 6. Sin embargo, nuestros resultados difirieron nuevamente en la región alcalina con lo reportado por dichos autores (Sun y col., 2011), ya que a partir de pH 6.5 ellos describen la pérdida de más de 60% de actividad proteolítica, es decir el 40% de actividad residual, y en nuestro estudio se perdió aproximadamente de 13 a 24 % de la actividad proteolítica (de 76 a 87 % de actividad residual).

Las proteasas de los tentáculos de *I. fuscus* fueron estables a pH de 3 a 5 (92-95% de actividad residual) y pH 7 (91% de actividad residual) (Figura 11), estos resultados fueron similares a los obtenidos con el extracto proteolítico del tracto digestivo, descrito en el párrafo anterior.

Cabe destacar que los extractos proteolíticos del tracto digestivo y de los tentáculos presentaron mayor estabilidad al pH (pH 2-10) que el extracto del músculo ventral, debido a que posiblemente las proteasas de estos órganos participan en el proceso de digestión.

#### **8.3.4 Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica.**

La Figura 12 muestra la actividad enzimática de los extractos proteolíticos crudos del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos de *I. fuscus* en función a la temperatura. El análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey se reportan en el Anexo 6.

El intervalo de temperatura óptima para las proteasas del músculo ventral fue de 40 a 60°C ( $p < 0.001$ ), lo que coincide con los resultados obtenidos por Wu y col. (2013b) para cisteín proteasas de la pared del cuerpo de *S. japonicus* con actividad óptima a 46°C. La actividad específica del extracto proteolítico del tracto digestivo fue significativa ( $p < 0.001$ ) a 40 y 70 °C, lo que coincidió con lo reportado por Fu y col. (2005) para metalo proteasas del tracto digestivo de *S. japonicus* con mayor actividad a 37°C. El extracto proteolítico de los tentáculos mostró actividad proteolítica significativa a 60°C ( $p < 0.001$ ). Benjakul y col. (2003) informaron que las proteasas alcalinas activadas por calor en el pargo o huachinango (*Lutjanus lutjanus*) y lagarto tumbil (*Saurida tumbil*) juegan un papel importante en la degradación de las proteínas musculares, especialmente a 60-65°C, similar a lo obtenido en el presente estudio.

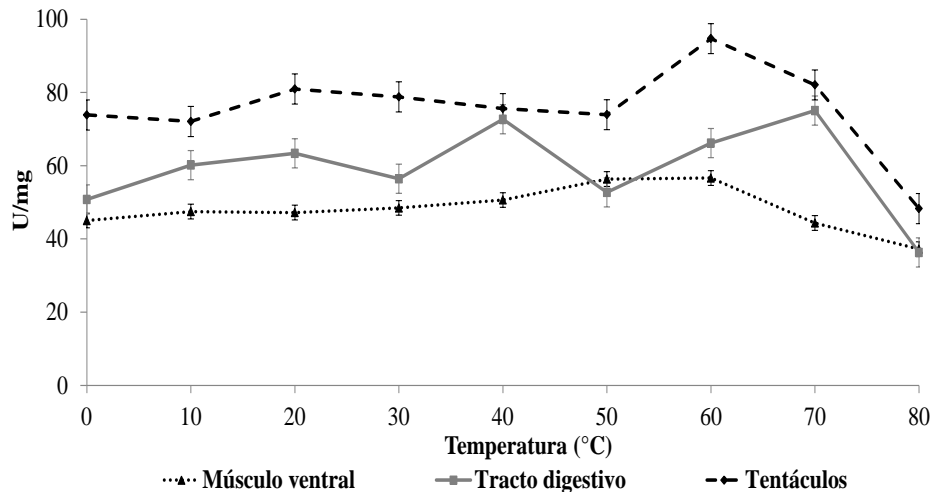


Figura 12. Efecto de la temperatura sobre la actividad de extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus*.

La Figura 13 muestra la estabilidad a la temperatura de los extractos proteolíticos del músculo ventral, el tracto digestivo y los tentáculos de *I. fuscus*. El análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey se reportan en el Anexo 7. Los tres extractos proteolíticos estudiados presentaron estabilidad a la temperatura hasta 70°C, presentando actividades residuales de 72 a 79 %.

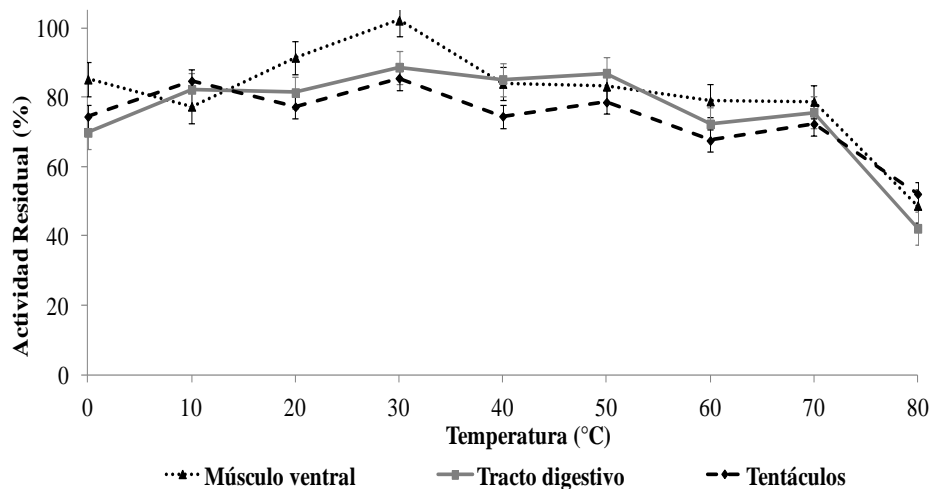


Figura 13. Estabilidad térmica de extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus*.

El extracto proteolítico crudo del músculo ventral mostró mayor estabilidad de 20 a 30 °C, reteniendo de 91 a 100 % de la actividad proteolítica inicial. Estos resultados concordaron con Zhu y col. (2008b) quienes reportaron estabilidad de 20 a 40 °C para catepsinas L de *S. japonicus*. Además, nuestros resultados fueron similares a lo descrito por Qi y col. (2007) para cisteín proteasas de *S. japonicus*, estables de 30 a 50 °C. Sin embargo, los autores citados mencionaron un decremento significativo en la estabilidad a temperaturas mayores a 50°C, lo que difirió con nuestros resultados, ya que el extracto del músculo ventral de *I. fuscus* mostró actividad residual de 79% a 70°C.



El extracto proteolítico del tracto digestivo fue estable de 30 a 50 °C, reteniendo de 85 a 89 % de la actividad proteolítica inicial. Los resultados coincidieron con lo descrito para proteasas ácidas y alcalinas del extracto crudo del intestino de *S. japonicus* (Fu y col., 2005), y fueron similares a las catepsinas B, reportadas para la misma especie, estables de 20 a 45 °C (Sun y col., 2011). Las proteasas de *I. fuscus* fueron resistentes a la desnaturalización por calor hasta 70°C (76% de actividad residual), mientras que la actividad proteolítica de los extractos de *S. japonicus* tuvieron un decremento significativo a temperaturas mayores a 45°C (Fu y col., 2005; Sun y col., 2011).

Las proteasas del extracto proteolítico crudo de los tentáculos presentaron mayor estabilidad térmica a 10 y 30 °C con 85-86% de actividad residual. Estas enzimas conservaron el 72% de su actividad proteolítica inicial al ser incubadas a 70°C por una hora. La estabilidad de las proteasas a 30°C, coincidió con los resultados obtenidos para los extractos del músculo ventral y del tracto digestivo de *I. fuscus*, descritos en los párrafos anteriores.

Las proteasas de todos los extractos crudos analizados presentaron actividad proteolítica de 0 a 10 °C, estos resultados no pudieron ser comparados con los reportes en la literatura sobre actividad proteolítica en el pepino de mar, ya que los estudios publicados se han llevado a cabo a partir de 20 a 30 °C. Sin embargo, se sabe que la mayor parte de los organismos acuáticos viven en entornos fríos y son animales poiquilotermos, es decir, que su temperatura corporal es similar a la del medio ambiente ya que carecen de mecanismos reguladores de temperatura (Haard y Simpson, 2000) por lo que sus proteínas tienen propiedades distintas a las de especies de sangre caliente (Foegeding y col., 2000). Muchas especies marinas presentan proteasas activas a bajas temperaturas, lo que podría suceder también en el pepino de mar ya que generalmente es un organismo bentónico, es decir, que habita en el fondo marino donde la temperatura es baja. Asimismo, se ha reportado ampliamente que algunas proteasas digestivas de animales marinos son catalizadores muy eficientes a baja temperatura de reacción. Una ventaja del uso de enzimas proteolíticas activas a bajas temperaturas, principalmente en la industria, es que permitirían un menor gasto de energía en los procesos de producción debido a que no sería necesario elevar la temperatura para alcanzar alta actividad proteolítica (Haard y Simpson, 2000).

### **8.3.5 Cinética de inactivación térmica.**

Los extractos proteolíticos crudos del músculo ventral, el tracto digestivo y los tentáculos de *I. fuscus* presentaron más de 78% de actividad residual al ser incubados por una hora a 70°C (Figura 14). El extracto proteolítico del músculo ventral presentó mayor resistencia a la desnaturalización por calor, seguido del extracto del tracto digestivo y posteriormente el extracto de los tentáculos. No obstante, este análisis no proporcionó evidencia suficiente para establecer si alguna de las proteasas en los diferentes órganos estudiados presenta mayor resistencia a la desnaturalización térmica, debido a que se analizaron extractos proteolíticos crudos, donde hay presencia de diversos tipos de enzimas proteolíticas. Sin embargo, los resultados dan información preliminar sobre el comportamiento de los extractos crudos proteolíticos ante la temperatura.

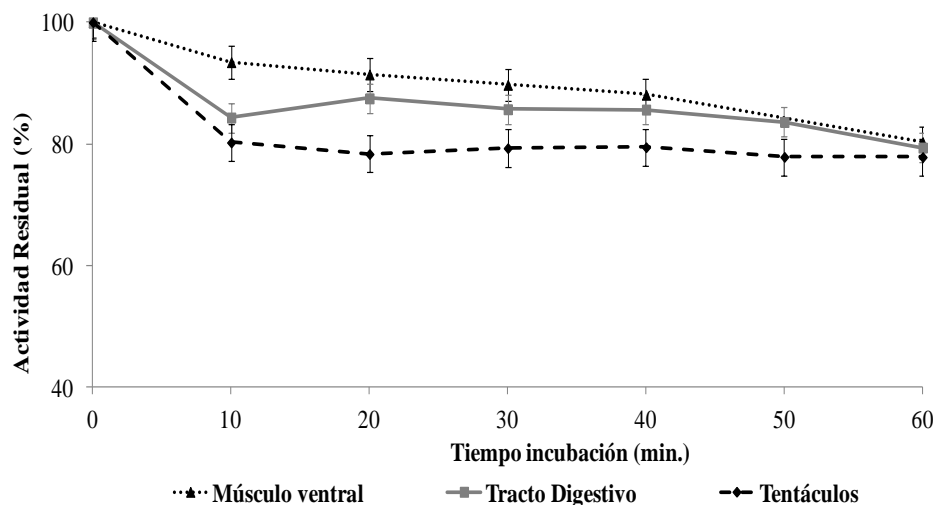


Figura 14. Cinética de inactivación térmica a 70°C de extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus*.

Fu y col. (2005) reportaron 60 y 19 % de actividad residual de proteasas de *S. japonicus* después de ser incubadas por una hora a 50 y 60 °C, respectivamente. Sun y col. (2011) indicaron que las catepsinas B de *S. japonicus* retuvieron cerca de 50% de la actividad inicial posteriormente a la incubación por una hora a 45°C, mientras que Wu y col. (2013a) demostraron la presencia de actividad proteolítica de una metalo proteasa gelatinolítica de *S. japonicus* por medio de zimografía al incubarla por 18 h a 60°C. De los datos de estos autores se concluye que las proteasas de *I. fuscus* posiblemente tengan mayor resistencia a la desnaturalización térmica, coincidiendo con los resultados del apartado 8.3.4, sugiriendo que el comportamiento de las proteasas ante la temperatura está ligado a las diferencias entre especies, es decir, las diferencias que existen entre los géneros a los que pertenecen, y hábitats en los que se desarrollan. Gao y col. (2009) estudiaron el efecto de la temperatura de cultivo sobre la actividad de las enzimas digestivas y encontraron que la actividad proteolítica es afectada por la temperatura del agua en la que crecen los pepinos de mar *Apostichopus japonicus*. Asimismo, se ha reportado que la estabilidad térmica de tripsinas de peces varía entre especies (Shahidi y col., 2001).

La Tabla 7 muestra las constantes de inactivación aparente ( $K_d$ ) y los tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) de los extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus* (Anexo 8). Los tiempos de vida media de las proteasas en el músculo ventral, el tracto digestivo y los tentáculos de *I. fuscus* fueron 3.5, 3.1 y 2.6 h, respectivamente. Se ha reportado la presencia de proteasas alcalinas estables al calor (HAP, “Heat-stable alkaline proteinase”) en el músculo de organismos marinos como sardina, cangrejo, salmón del Atlántico, carpa, bacalao, trucha arcoíris, corvina, jurel común y arenque (Haard y Simpson, 2000). Por otro lado, se ha reportado una catepsina D (aspartil proteasa) en el hígado del pez *Chionodraco hamatus* que tiene estabilidad a altas temperaturas con tiempo de vida media de aproximadamente 1 h a 50°C a pesar de que es una especie que vive en regiones que alcanzan temperaturas bajas de 1°C (Capasso y col., 1999). Las aspartil proteasas más comunes que han sido aisladas y caracterizadas del estómago de animales marinos son pepsinas, quimosinas y gastrinas (Haard y Simpson, 2000).

Tabla 8. Tiempo de vida media a 70°C de extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus*.

| Muestras         | Kd      | t <sub>1/2</sub> (min) | t <sub>1/2</sub> (h) | R <sup>2</sup> |
|------------------|---------|------------------------|----------------------|----------------|
| Músculo ventral  | -0.0033 | 210.00                 | 3.50                 | 0.9556         |
| Tracto digestivo | -0.0037 | 187.30                 | 3.12                 | 0.9507         |
| Tentáculos       | -0.0045 | 154.00                 | 2.57                 | 0.9389         |

Los tiempos de vida media sugieren que los extractos proteolíticos de los diferentes órganos estudiados de *I. fuscus* poseen proteasas con posibles características particulares (alto nivel de glicosilación; alto contenido de enlaces disulfuro, puentes de hidrógeno y enlaces iónicos; alto contenido de prolina, arginina o residuos aromáticos) que incrementen la estabilidad de la conformación de las proteínas haciéndolas menos flexibles (Capasso y col., 1999).

### 8.3.6 Efecto de almacenamiento en refrigeración sobre la actividad proteolítica.

Los extractos proteolíticos del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos de *I. fuscus*, retuvieron 52, 41 y 66 % de la actividad proteolítica original, respectivamente, al ser almacenados a 4°C durante 22 días (Figura 15). El análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey se reportan en el Anexo 9.

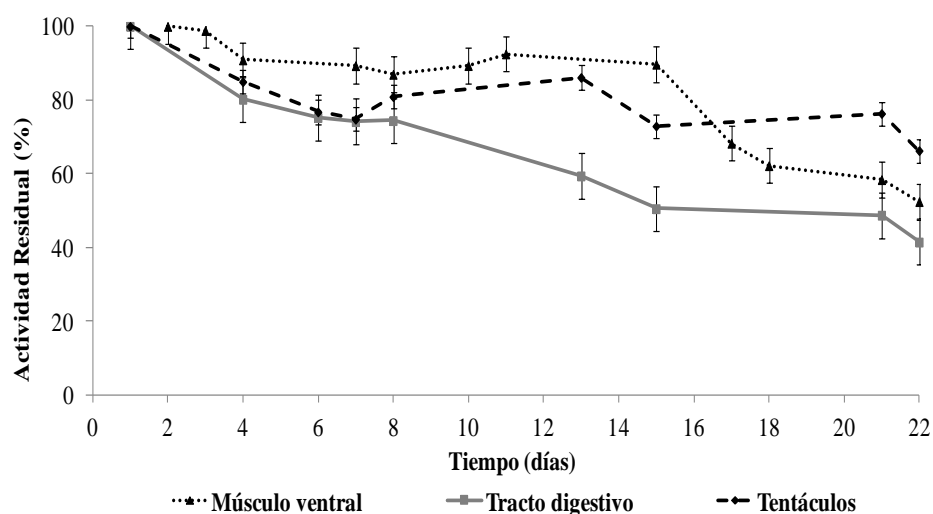


Figura 15. Efecto de almacenamiento en refrigeración (4°C) sobre la actividad enzimática de extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus*.

La estabilidad de las proteasas de los tres órganos analizados en almacenamiento a 4°C, coincidió con lo reportado por Wu y col. (2013a) quienes describieron la actividad de metalo proteasas gelatinolíticas de *S. japonicus* almacenadas por 18 días a 4°C. Éste comportamiento puede estar relacionado con el hecho de que la mayor parte de los organismos acuáticos son poiquiloterms (Haard y Simpson, 2000). Por tanto, las proteínas de estos animales sufren modificaciones estructurales para prevenir los efectos de la temperatura, lo que no sucede en especies de sangre caliente (Foegeding y col., 2000). La conservación de la actividad enzimática de las proteasas al ser almacenadas a baja temperatura por largo tiempo, favorece en que dichas enzimas tienen la capacidad de estar en refrigeración evitándose la necesidad de congelación y por ende el efecto de desnaturalización al descongelarlas.

### 8.3.7 Efecto de inhibidores de proteasas sobre la actividad proteolítica.

La Tabla 8 muestra el efecto de diferentes inhibidores de proteasas sobre la actividad proteolítica de los extractos crudos del músculo ventral, el tracto digestivo y los tentáculos de *I. fuscus* (el análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey se reportan en el Anexo 10). Para los extractos proteolíticos del músculo ventral, a pH 6, se observó que el pepstatina A (inhibidor de aspartil proteasas) tuvo efecto significativo de inhibición ( $p < 0.001$ ) reteniendo 68% de la actividad proteolítica inicial, seguido de  $\beta$ -mercaptoetanol (inhibidor de cisteín proteasas) con 76% de actividad residual, EDTA (inhibidor de metalo proteasas) y PMSF (inhibidor de serín proteasas) con 77% de actividad residual, y TI (inhibidor de tripsina) con 80% de actividad residual. El TLCK (inhibidor de serín proteasas) no tuvo efecto significativo ( $p > 0.05$ ) sobre la actividad proteolítica (97% de actividad residual). Se ha reportado que algunos inhibidores de serín proteasas interactúan sobre enzimas que poseen residuos de histidina cercanos al sitio activo (Aranishi y col., 1997), lo que explicaría la diferencia entre la inhibición con TLCK y PMSF (inhibidores de serín proteasas). Por otro lado, se observó alta inhibición de la actividad proteolítica ( $p < 0.001$ ) a pH 8 con EDTA reteniendo 41% de la actividad proteolítica inicial y con el inhibidor TI con 54% de actividad residual. Por lo tanto, se concluyó que existe la posible presencia predominante de aspartil, cisteín y metalo proteasas en el extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus*.

El extracto proteolítico crudo del tracto digestivo, a pH 6, fue inhibido parcialmente ( $p < 0.001$ ) por PMSF con 79% de actividad residual y pepstatina A con 81% de actividad residual, seguido de TLCK con 86% de actividad residual. A pH 8, se observó inhibición parcial significativa ( $p < 0.001$ ) con el inhibidor TI con 71% de actividad residual y con EDTA reteniendo 75% de la actividad proteolítica original. Estos resultados sugirieron la posible predominancia de serín, aspartil y metalo proteasas en el tracto digestivo de *I. fuscus*.

Las enzimas proteolíticas de los tentáculos, a pH 6, se inhibieron significativamente ( $p < 0.001$ ) con TLCK reteniendo 79% de la actividad proteolítica inicial, y con pepstatina A con 83% de actividad residual. El estudio a pH 8 mostró inhibición significativa ( $p < 0.001$ ) con EDTA, reteniendo 81% de la actividad proteolítica original y con el inhibidor TI con 82% de actividad residual. Por lo tanto, se concluyó la posible presencia mayoritaria de serín, aspartil y metalo proteasas en los tentáculos de *I. fuscus*, de igual forma que lo obtenido para el extracto proteolítico del tracto digestivo.

Los resultados de inhibición de las proteasas del músculo ventral de *I. fuscus*, coincidieron con lo reportado por Qi y col. (2007) para cisteín proteasas de *S. japonicus*. Asimismo, Zhu y col. (2008b) reportaron la presencia de catepsina L (cisteín proteasa) en *S. japonicus*. Paralelamente, Wu y col. (2013a) encontraron la presencia de metalo proteasas gelatinolíticas en *S. japonicus* inhibidas significativamente por EDTA, en forma análoga a nuestros resultados a pH 8, por lo que existe la posibilidad de que estas enzimas también estén presentes en *I. fuscus*. Con respecto a la presencia de aspartil proteasas en *I. fuscus*, Wu y col. (2013b) reportaron que la proteólisis de las proteínas MYP (“Major yolk protein”) y actina (proteínas no colágenas) de *S. japonicus* no depende sólo de cisteín proteasas, sino que existen además otro tipo de enzimas proteolíticas implicadas, sin embargo no especificaron el tipo de proteasas. Por lo tanto, no se descarta la existencia de aspartil proteasas en *I. fuscus*, además, la mayoría de los autores mencionados no estudiaron el efecto de inhibidores de aspartil proteasas. También, se ha encontrado que a nivel fisiológico, la degradación de proteínas en el desarrollo embrionario es mediada por una aspartil proteasa, la catepsina D (Fialho y col., 2005), y una cisteín proteasa, la catepsina B (Raldúa y col., 2006), por lo que es posible la presencia de aspartil proteasas en el músculo ventral de *I. fuscus*.

Tabla 9. Efecto de inhibidores de proteasas sobre la actividad de extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus*.

| Actividad residual (%)* |                           |                 |                  |              |
|-------------------------|---------------------------|-----------------|------------------|--------------|
| Inhibidor               | Concentración (Inhibidor) | Músculo ventral | Tracto digestivo | Tentáculos   |
| Control                 |                           | 100.00          | 100.00           | 100.00       |
| PMSF                    | 5 mM                      | 77.18 ± 2.34    | 79.41 ± 1.11     | 95.52 ± 0.49 |
| TLCK                    | 10 mM                     | 96.74 ± 0.01    | 86.15 ± 1.91     | 79.35 ± 0.93 |
| TI                      | 0.6 g/L                   | 80.32 ± 0.35    | 92.02 ± 1.98     | 93.10 ± 1.15 |
| TI (pH 8)               | 0.6 g/L                   | 54.41 ± 2.10    | 71.16 ± 1.96     | 81.96 ± 1.58 |
| EDTA                    | 10 mM                     | 76.79 ± 0.71    | 98.78 ± 2.30     | 95.64 ± 0.74 |
| EDTA (pH 8)             | 10 mM                     | 40.55 ± 1.70    | 74.93 ± 1.81     | 81.14 ± 2.25 |
| Pepstatina A            | 1 µM                      | 68.02 ± 0.58    | 80.49 ± 1.91     | 83.27 ± 1.18 |
| β-Mercaptoetanol        | 1 mM                      | 75.90 ± 1.42    | 96.19 ± 1.93     | 99.75 ± 0.12 |

\*Reacción a pH 6 y 60°C.

En el mismo contexto, se ha considerado que las catepsinas en el pepino de mar pertenecen a varias clases. Como ejemplo existen los estudios de Zhu y col. (2008b) que además de catepsina L de *S. japonicus*, también encontraron actividad de catepsina B en la pared del cuerpo del pepino de mar *Chopus japonicus*. Por lo tanto, se sugiere que las posibles aspartil proteasas identificadas en este estudio pueden ser catepsinas D, las cuales se sabe que son lisosomales (Balti y col., 2010) y que están involucradas en la regulación de la muerte celular programada y en la digestión de proteínas de alimentos en invertebrados (Blanco-Labra y col., 1996; Williamson y col., 2002; Padilha y col., 2009; Rojo y col., 2010).

Los resultados de inhibición de las proteasas del tracto digestivo y los tentáculos de *I. fuscus*, concordaron con los reportes de Fu y col. (2005) quienes describen la presencia de serín y metalo proteasas en el tracto digestivo de *S. japonicus*. Estos autores sugirieron que las serín proteasas eran colagenasas (metalo proteasas) debido a que se ha reportado que las colagenasas en el tracto digestivo de organismos marinos tienen ambas actividades, de serín y metalo proteasas (Yoshinaka y col., 1986; Roy y col., 1996; Aoki y col., 2003). Por otro lado, nuestros resultados difirieron con los reportados por Sun y col., 2011, quienes mencionaron la presencia de catepsinas B (cisteín proteasas) en el intestino de *S. japonicus*. Sin embargo, dichos autores, no estudiaron el efecto de inhibidores de aspartil proteasas, por lo que no es posible descartar la presencia de esta clase de proteasas en el tracto digestivo y los tentáculos de *I. fuscus*. Estos hechos permiten sugerir la posible presencia de catepsina D en *I. fuscus*, similar a lo discutido en el párrafo anterior. Se ha reportado que la catepsina D tiene un papel importante en la degradación del músculo de salmón (Mommssen 2004) y bacalao del Atlántico (Wang et al., 2007), lo que puede ser similar para *I. fuscus*.

### 8.3.8 Efecto de iones sobre la actividad proteolítica.

La Tabla 9 muestra el efecto de diferentes iones sobre la actividad proteolítica de los extractos crudos del músculo ventral, el tracto digestivo y los tentáculos de *I. fuscus* (el análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey se reportan en el Anexo 11).

El extracto proteolítico del músculo ventral presentó la menor actividad residual ( $p < 0.001$ ) al ser incubado con  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  con 42 y 59 % de actividad residual, respectivamente, los iones  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{+}$  y  $\text{Cl}^{-}$  tuvieron un efecto parcial en las actividades proteolíticas con actividades residuales de 80% a 89%. Por el contrario, los iones  $\text{Hg}^{2+}$  aumentaron 16% la actividad proteolítica. Los iones  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Na}^{+}$  no presentaron efectos significativos ( $p > 0.05$ ) sobre la actividad proteolítica (95% y 98% de actividad residual, respectivamente).

El extracto proteolítico del tracto digestivo al incubarse con  $\text{Ba}^{2+}$  presentó la menor actividad residual ( $p < 0.001$ ) con 75%, mientras que la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentó 1% la actividad proteolítica. Los iones restantes ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{Cl}^{-}$ ) no tuvieron un efecto significativo ( $p > 0.05$ ) sobre la actividad proteolítica de este extracto (de 90% a 95 % de actividad residual).

El extracto proteolítico de los tentáculos retuvo el 71% de la actividad proteolítica inicial ( $p < 0.001$ ) al incubarse con el ión  $\text{Ba}^{2+}$ , mientras que los iones  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{+}$ , y  $\text{Ca}^{2+}$  inhibieron parcialmente la actividad proteolítica de este extracto con actividades residuales de 81% a 89%. Los iones  $\text{Na}^{+}$  y  $\text{Cl}^{-}$  no tuvieron efectos significativos ( $p > 0.05$ ) sobre la actividad proteolítica de dicho extracto (91% de actividad residual para ambos).

Tabla 10. Efecto de iones (10 mM) sobre la actividad de extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus*.

| Actividad residual (%)* |                 |                  |              |
|-------------------------|-----------------|------------------|--------------|
| Ión                     | Músculo ventral | Tracto digestivo | Tentáculos   |
| Control                 | 100.00          | 100.00           | 100.00       |
| $\text{Cl}^{-}$         | 80.12 ± 5.51    | 91.75 ± 0.92     | 91.45 ± 0.58 |
| $\text{Na}^{+}$         | 97.99 ± 7.76    | 95.33 ± 1.21     | 90.52 ± 0.23 |
| $\text{Zn}^{+}$         | 84.09 ± 0.12    | 90.82 ± 0.40     | 85.50 ± 0.51 |
| $\text{Mn}^{2+}$        | 59.01 ± 0.47    | 92.65 ± 0.41     | 84.36 ± 0.50 |
| $\text{Cu}^{2+}$        | 41.93 ± 3.40    | 91.40 ± 0.77     | 82.07 ± 0.50 |
| $\text{Ca}^{2+}$        | 89.39 ± 2.92    | 100.49 ± 0.36    | 88.48 ± 0.21 |
| $\text{Mg}^{2+}$        | 95.09 ± 7.01    | 89.59 ± 0.10     | 81.32 ± 0.29 |
| $\text{Ba}^{2+}$        | 88.53 ± 0.26    | 74.85 ± 0.43     | 70.80 ± 0.09 |
| $\text{Hg}^{2+}$        | 115.74 ± 1.97   | 93.68 ± 0.92     | 86.35 ± 0.58 |

\*Reacción a pH 6 y 60°C.

En la Tabla 10 se muestra una interpretación del efecto que tuvieron los iones utilizados en el presente estudio sobre la actividad de los extractos proteolíticos del músculo ventral, el tracto digestivo y los tentáculos de *I. fuscus*, para la subsecuente discusión de los resultados.



Tabla 11. Interpretación del efecto de iones sobre la actividad de extractos proteolíticos de *I. fuscus*.

| Efecto del ión                  | Extracto proteolítico del músculo ventral                               | Extracto proteolítico del tracto digestivo  | Extracto proteolítico de los tentáculos  |
|---------------------------------|---|---|--|
| <b>Inhibición significativa</b> | $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$                                     | $\text{Ba}^{2+}$  | $\text{Ba}^{2+}$   |
| <b>Inhibición parcial</b>       | $\text{Ba}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Zn}^{+}$ , $\text{Cl}^{-}$ | -----   | $\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Zn}^{+}$ |
| <b>Aumento de actividad</b>     | $\text{Hg}^{2+}$  | $\text{Ca}^{2+}$  | -----  |
| <b>Sin efecto significativo</b> | $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Na}^{+}$                                      | $\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Zn}^{+}$ , $\text{Na}^{+}$ , $\text{Cl}^{-}$ | $\text{Na}^{+}$ , $\text{Cl}^{-}$  |

En el extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus* el efecto inhibitorio del ión  $\text{Cu}^{2+}$  sobre la actividad proteolítica se explica debido a que se ha reportado que algunos iones como el  $\text{Cu}^{2+}$  pueden tener afinidad por los grupos sulfhidrilo por lo que inactivan específicamente algunas proteínas funcionales, las cuales poseen residuos de cisteína en sus sitios activos o como soporte conformacional de sus dominios (Aranishi y col., 1997), como es el caso de las cisteín proteasas. Al respecto, el efecto inhibitorio del  $\text{Cu}^{2+}$  (42% de actividad residual) y  $\text{Mn}^{2+}$  (59% de actividad residual) sobre la actividad proteolítica observada en nuestro trabajo fue similar a lo obtenido por Qi y col., (2007) (48% de actividad residual) y Zhu y col. (2008b) (79-84% de actividad residual) para cisteín proteasas de la pared del cuerpo de *S. japonicus*.

Asimismo, el efecto de inhibición parcial de los iones  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la actividad del extracto proteolítico del músculo ventral (89% de actividad residual para ambos iones) coincidió con lo reportado por Qi y col., (2007) para cisteín proteasas de *S. japonicus* (92-95% de actividad residual), y fue ligeramente similar a lo reportado por Wu y col. (2013a) ya que reportaron un incremento significativo de la actividad de metalo proteasas gelatinolíticas de *S. japonicus* en presencia de  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , y en nuestro estudio se obtuvieron valores altos pero no mayores al control. Cabe destacar que nuestro ensayo se llevó a cabo a pH 6, por lo que se esperaba que a pH 8 (óptimo de las metalo proteasas), la actividad residual en presencia de  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  sea mayor a 100%. Adicionalmente, la alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (10 mM) en el agua de mar podría explicar que éste catión divalente funcione como especie activante de metalo proteasas localizadas en la superficie celular (Mayne y Robinson, 1996), lo que explicaría el alto valor de actividad residual obtenido en éste estudio. Por otra parte, nuestros resultados con respecto al efecto inhibitorio parcial del ión  $\text{Zn}^{+}$  (84% de actividad residual) sobre la actividad del extracto proteolítico del músculo ventral, difirieron de los reportados por Zhu y col. (2008b) para cisteín proteasas de *S. japonicus*, ya que estos autores encontraron una inhibición total de la actividad en presencia de dicho ión (0% de actividad residual). Sin embargo, el efecto del ión  $\text{Zn}^{+}$  sobre la actividad proteolítica fue semejante a lo descrito por Wu y col. (2013a) para metalo proteasas gelatinolíticas de la pared del cuerpo de *S. japonicus*.

Con respecto al aumento de actividad del extracto proteolítico del músculo ventral en presencia del ión  $\text{Hg}^{2+}$  (16% de actividad proteolítica), se sugirió que el efecto de dicho ión puede estar relacionado con el mecanismo de activación de la matriz metaloproteinasas (MMP), la cual es una familia de enzimas peptidasas (colágenasas, gelatinasas, entre otras) que en presencia de iones  $\text{Zn}^{+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , contribuyen a regular el comportamiento celular mediante la degradación de componentes de la matriz extracelular (colágeno, gelatina) (Nagase y col., 1999). Se ha reportado que la MMP puede ser activada por proteasas o *in vitro* por agentes químicos como el  $\text{HgCl}_2$  (Visse y Nagase, 2003). Además se ha reportado que la MMP podría tener un papel importante en la autólisis de *S. japonicus* (Sun y col., 2013).

El efecto no significativo del ión  $Mg^{2+}$  (95% de actividad residual) sobre la actividad del extracto proteolítico del músculo ventral coincidió con lo reportado por Zhu y col. (2008b) para cisteín proteasas de la pared del cuerpo de *S. japonicus* (96.5% de actividad residual).

En resumen, de acuerdo a los resultados obtenidos del efecto de los iones  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , sobre la actividad del extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus*, se concluyó que es probable la presencia de cisteín y metalo proteasas en dicho extracto proteolítico.

En el extracto proteolítico del tracto digestivo de *I. fuscus*, el efecto inhibitorio del ión  $Ba^{2+}$  sobre la actividad proteolítica (75% de actividad residual), se puede explicar sugiriendo la presencia de la matriz metaloproteínasa (MMP), debido a que el cloruro de bario ejerce una inhibición selectiva desplazando el ión  $Ca^{2+}$  del centro catalítico en la matriz metaloproteínasa 2 (MMP-2) (Ziouti y col., 2006). Adicionalmente, se sabe que el cloruro de bario puede precipitar algunas proteínas (Ziouti y col., 2006).

Por otro lado, el aumento de actividad del extracto proteolítico del tracto digestivo en presencia del ión  $Ca^{2+}$  (101% de actividad residual) fue similar a lo reportado por Sun y col. (2011) para cisteín proteasas (104% de actividad residual) y por Fu y col. (2005) para metalo proteasas (129% de actividad residual) del tracto digestivo de *S. japonicus*.

Con respecto al efecto no significativo de los iones  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  sobre la actividad del extracto proteolítico del tracto digestivo (90-93% de actividad residual), fue similar a lo reportado para cisteín proteasas (Sun y col., 2011) y metalo proteasas (Fu y col., 2005) del tracto digestivo de *S. japonicus*. Mientras que el efecto no significativo del ión  $Zn^{2+}$  (91% de actividad residual) sobre la actividad proteolítica, difirió con lo reportado por Fu y col. (2005) y Sun y col. (2011), ya que ellos describieron una reducción significativa de la actividad proteolítica en presencia de  $Zn^{2+}$  (6% y 16% de actividad residual, respectivamente). En el mismo contexto, la presencia de iones endógenos en la muestra puede activar a las proteasas y no permitir observar el efecto neto del  $Zn^{2+}$  sobre la actividad proteolítica, por lo que se recomienda realizar un ensayo con proteasas inhibidas con EDTA 5mM. En contraste, se ha demostrado la existencia de metalo proteasas dependientes de  $Zn^{2+}$  en la matriz metaloproteínasa 2 (MMP-2) (Ziouti y col., 2006), lo que explicaría la alta actividad residual en presencia del ión  $Zn^{2+}$ .

En resumen, el comportamiento proteolítico del extracto del tracto digestivo de *I. fuscus* en presencia de los iones  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  sugirió la presencia de cisteín y metalo proteasas en este extracto proteolítico.

En el extracto proteolítico de los tentáculos de *I. fuscus*, el efecto inhibitorio del ión  $Ba^{2+}$  (71% de actividad residual) y el efecto no significativo de los iones  $Na^{+}$  y  $Cl^{-}$  (91-92% de actividad residual) sobre la actividad proteolítica, coincidieron con lo obtenido en este estudio para el extracto proteolítico del tracto digestivo de *I. fuscus*. Hasta el momento, se desconoce la existencia de reportes acerca del efecto de iones sobre la actividad de proteasas de los tentáculos de algún pepino de mar, sin embargo, el que los resultados hayan sido muy similares a los obtenidos para el extracto proteolítico del tracto digestivo sugirió, de igual forma, la posible presencia de cisteín y metalo proteasas en el extracto proteolítico de los tentáculos de *I. fuscus*.

### 8.3.9 Análisis electroforético (SDS-PAGE y Zimografía).

La Figura 16 muestra que en el extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus* existe una proteína predominante con peso molecular estimado de 180 kDa, mientras que los estudios de zimografía, basada en hidrólisis de caseína (2%, p/v, a pH 6 y 60°C), confirmaron la presencia de enzimas proteolíticas en dicho extracto, presentando fuerte actividad enzimática (Figura 16). Los resultados fueron similares a lo reportado por Fu y col. (2005) quienes identificaron una proteína de 114 kDa en el tracto digestivo de *S. japonicus*. Se sugiere que el alto peso molecular aparente de la proteína presente puede deberse a la presencia de proteínas de colágeno ya que poseen pesos moleculares estimados de 138 kDa (Liu y col., 2010).

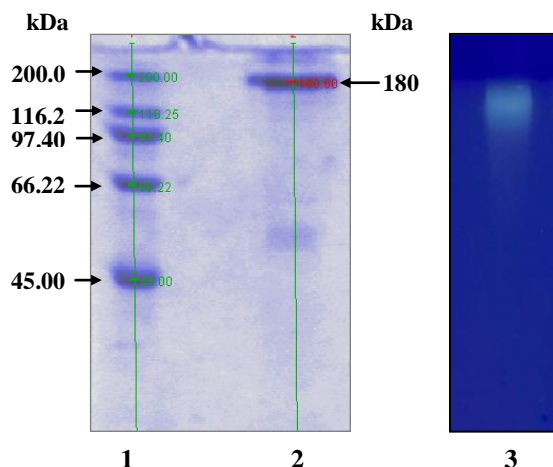


Figura 16. SDS-PAGE y zimografía del extracto proteolítico crudo del músculo ventral de *I. fuscus*. Líneas: 1, Marcador molecular; 2, Extracto crudo; 3, Zimografía del extracto crudo.

En el extracto proteolítico del tracto digestivo de *I. fuscus*, se identificaron dos proteínas con pesos moleculares estimados de 109 y 39-42 kDa, mientras que la zimografía basada en hidrólisis de caseína (2%, p/v, a pH 6 y 60°C) demostró la presencia de enzimas proteolíticas en dicho extracto (Figura 17). Los resultados fueron similares a lo reportado por Fu y col. (2005), Qi y col. (2007), y Wu y col. (2013a) quienes identificaron proteínas de 39 (probable colagenasa), 36 (cisteín proteasa) y 45 (metalo proteasa) kDa, respectivamente, en el tracto digestivo y pared del cuerpo de *S. japonicus*. Por lo tanto se sugirió la presencia de cisteín y metalo proteasas en el extracto proteolítico del tracto digestivo de *I. fuscus*.

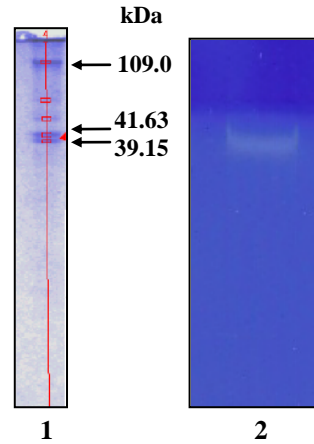


Figura 17. SDS-PAGE y zimografía del extracto proteolítico crudo del tracto digestivo de *I. fuscus*.  
Líneas: 1, Extracto crudo; 2, Zimografía del extracto crudo.

En el extracto proteolítico de los tentáculos de *I. fuscus* se observaron tres proteínas de aproximadamente 106, 68 y 39 kDa (Figura 18). El estudio de zimografía basado en hidrólisis de caseína (2%, p/v, a pH 6 y 60°C) demostró la presencia de enzimas proteolíticas en el extracto estudiado (Figura 18). Los resultados fueron similares a lo reportado por Fu y col. (2005) quienes mencionaron la presencia de metalo proteasas de 39 kDa en el tracto digestivo de *S. japonicus*. Asimismo, nuestros resultados fueron semejantes a lo descrito por Qi y col. (2007) y Zhu y col. (2008b) quienes reportaron cisteín proteasas de 36 y 63 kDa en la pared del cuerpo de *S. japonicus*, respectivamente. Por lo tanto, se sugirió la presencia de cisteín y metalo proteasas en el extracto proteolítico de los tentáculos de *I. fuscus*.

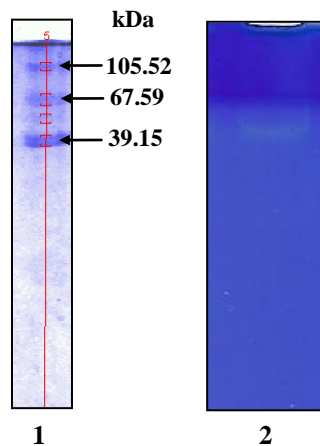


Figura 18. SDS-PAGE y zimografía del extracto proteolítico crudo de los tentáculos de *I. fuscus*.  
Líneas: 1, Extracto crudo; 2, Zimografía del extracto crudo.

## 8.4 Purificación parcial de proteasas de los órganos de estudio de *I. fuscus*.

### 8.4.1 Estudio preliminar con extracto proteolítico del músculo ventral.

#### 8.4.1.1 Precipitación selectiva de proteínas.

##### Concentración de proteína.

El extracto proteolítico crudo del músculo ventral de *I. fuscus* y la fracción proteolítica precipitada con sulfato de amonio saturado al 60%, tuvieron concentraciones de proteína de 6.0 mg/mL, mientras que el extracto proteolítico crudo sometido a precipitación con sulfato de amonio saturado al 80% tuvo la menor concentración de proteína con 0.3 mg/mL (Tabla 11). Lo anterior indica que la minoría de las proteínas presentes en el extracto proteolítico estudiado necesitan una fuerte fuerza iónica en el medio para precipitar. Dicha precipitación se debe a que se disminuye el grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de la proteína, ya que las sales del sulfato de amonio compiten por el agua y rompen las interacciones electrostáticas, de forma que las moléculas proteicas se agregan y precipitan.

Tabla 12. Concentración de proteína de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus* obtenidas por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

| Condiciones de precipitación<br>[% sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ] | mg/mL*          |
|--|-----------------|
| Extracto crudo   | $6.03 \pm 1.53$ |
| 60   | $5.93 \pm 0.37$ |
| 80   | $0.26 \pm 0.01$ |

\*Valor medio (o media).

##### Determinación de actividad proteolítica.

La fracción proteolítica precipitada con sulfato de amonio saturado al 80% del extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus* presentó la mayor actividad proteolítica en el intervalo de pH 2-10 comparada con la fracción proteolítica precipitada con sulfato de amonio saturado al 60% y el extracto proteolítico crudo (Figura 19). Cabe destacar que dicha fracción proteolítica tuvo mayor actividad proteolítica en el intervalo de pH 2-5.

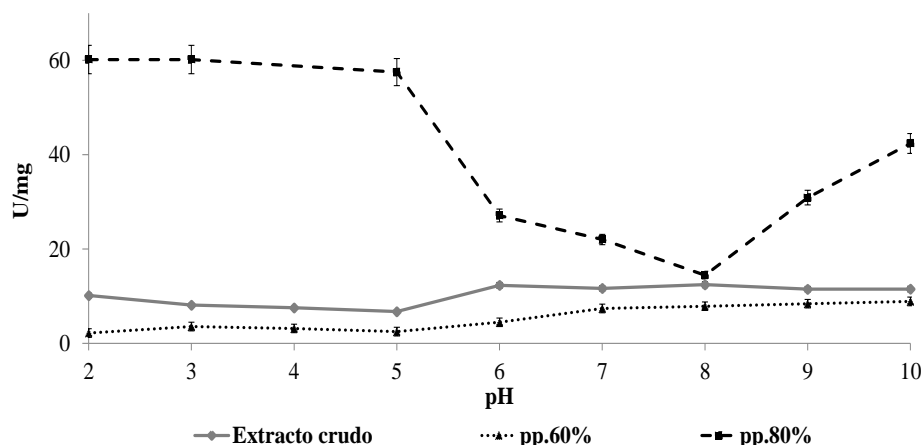


Figura 19. Actividad específica de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus* obtenidas por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

El mayor porcentaje de recuperación de proteína se obtuvo en la fracción proteolítica precipitada con sulfato de amonio saturado al 60% con 38.5% y un factor de purificación de 0.6 (Tabla 12).

Tabla 13. Parámetros de recuperación de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus* obtenidas por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

| Condiciones de precipitación [% sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ] | Actividad total* (U, pH 8) | Proteína total* (mg) | Actividad específica (U/mg, pH 8) | Factor de purificación | % Recuperación |
|---|----------------------------|----------------------|-----------------------------------|------------------------|----------------|
| Extracto crudo  | 14983.10                   | 1205.70              | 12.40                             | 1.00                   | 100.00         |
| 60  | 5775.10                    | 735.10               | 7.90                              | 0.60                   | 38.50          |
| 80  | 442.10                     | 30.60                | 14.40                             | 1.20                   | 3.00           |

\*Valor medio (o media).

Por lo tanto, se seleccionó la fracción proteolítica precipitada con sulfato de amonio saturado al 60% para la purificación parcial, con base en la actividad proteolítica, el factor de purificación y principalmente por el porcentaje de recuperación obtenido. El porcentaje de recuperación fue la variable decisiva para la selección de la fracción proteolítica ya que permitirá continuar con los siguientes pasos de purificación y aumentar el factor de purificación.

#### 8.4.1.2 Ultrafiltración.

##### Concentración de proteína.

La fracción proteolítica precipitada con sulfato de amonio saturado al 60% con peso molecular mayor a 100 kDa del extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus* fue la que tuvo mayor concentración de proteína con 5.7 mg/mL (Tabla 13).

Tabla 14. Concentración de proteína de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus* obtenidas por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y ultrafiltración.

| Condiciones de precipitación [% sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ](peso molecular en kDa) | mg/mL*      |
|--|-------------|
| 60 (> 100)   | 5.73 ± 0.04 |
| 60 (50-100)  | 3.50 ± 0.04 |
| 60 (< 50)  | 1.12 ± 0.03 |
| 80 (> 100)   | 1.81 ± 0.06 |
| 80 (50-100)  | 0.91 ± 0.06 |
| 80 (< 50)  | 1.11 ± 0.08 |

\*Valor medio (o media).

##### Determinación de actividad proteolítica.

Se presentó la mayor actividad proteolítica en la fracción precipitada con sulfato de amonio saturado al 80% con peso molecular mayor a 100 kDa del extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus* (Figura 20). Dicha fracción mostró actividad proteolítica predominante en el intervalo de pH 2-7 (Figura 20). Subsiguientemente, la fracción precipitada con sulfato de amonio saturado al 60% con peso molecular mayor a 100 kDa tuvo alta actividad proteolítica.



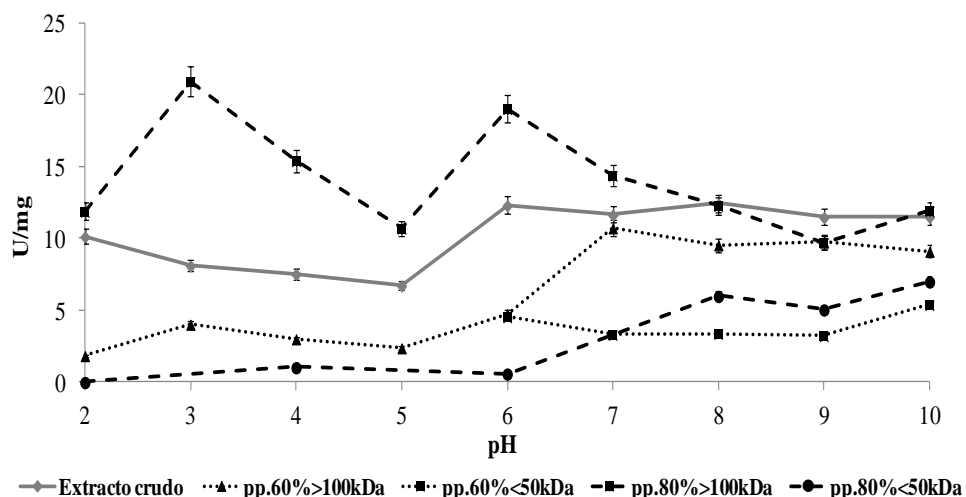


Figura 20. Actividad específica de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus* obtenidas por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y ultrafiltración.

Las fracciones proteolíticas con pesos moleculares menores a 50 kDa presentaron las menores actividades proteolíticas en el rango de pH 2-10 (Figura 20), los menores valores de porcentaje de recuperación y factor de purificación (Tabla 14).

Tabla 15. Parámetros de recuperación de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus* obtenidas por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y ultrafiltración.

| Condiciones de precipitación [% sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ](peso molecular en kDa) | Actividad total* (U, pH 8) | Proteína total* (mg) | Actividad específica (U/mg) | Factor de purificación | % Recuperación |
|--|----------------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------|----------------|
| Extracto crudo   | 14983.10                   | 1205.70              | 12.40                       | 1.00                   | 100.00         |
| 60 (> 100)   | 2542.00                    | 266.30               | 9.50                        | 0.80                   | 17.00          |
| 60 (50-100)  | 83.70                      | 27.10                | 3.10                        | 0.20                   | 0.60           |
| 60 (< 50)  | 264.10                     | 78.30                | 3.40                        | 0.30                   | 1.80           |
| 80 (> 100)   | 656.90                     | 53.50                | 12.30                       | 1.00                   | 4.40           |
| 80 (50-100)  | 131.70                     | 8.00                 | 16.40                       | 1.30                   | 0.90           |
| 80 (< 50)  | 528.90                     | 88.30                | 6.00                        | 0.50                   | 3.50           |

\*Valor medio (o media).

La fracción proteolítica precipitada con sulfato de amonio saturado al 60% con peso molecular mayor a 100 kDa, tuvo el mayor porcentaje de recuperación con 17% y un factor de purificación de 0.8 (Tabla 14), lo cual definió a dicha fracción como la óptima para continuar con la purificación parcial, ya que el porcentaje de recuperación permitió ejecutar más pasos de purificación y por lo tanto incrementar el factor de purificación.

## 8.4.2 Cromatografía de intercambio aniónico en lote.

### 8.4.2.1 Extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus*.

#### Concentración de proteína.

La mayor concentración de proteína se obtuvo en la fracción proteolítica eluida con NaCl 0.25 M precipitada con sulfato de amonio al 60% y con peso molecular mayor a 100 kDa (F2 pp.60% >100 kDa) del extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus* con 0.4 mg/mL (Tabla 15).

Tabla 16. Concentración de proteína de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus* obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y ultrafiltración.

| Fracción (condiciones elución)/precipitación<br>% sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /peso molecular (kDa) | mg/mL*      |
|---|-------------|
| Extracto crudo  | 1.16 ± 0.80 |
| F2 (Eluido 0.25 M)  | 0.32 ± 0.01 |
| F3 (Eluido 0.50 M)  | 0.04 ± 0.03 |
| F2 pp.60% >100 kDa  | 0.37 ± 0.01 |
| F3 pp.60% >100 kDa  | 0.08 ± 0.04 |

\*Valor medio (o media).

#### Determinación de actividad proteolítica.

La mayor actividad proteolítica a pH 8 ( $p < 0.001$ ) se encontró en la fracción proteolítica eluida con NaCl 0.50 M precipitada con sulfato de amonio saturado al 60% y con peso molecular mayor a 100 kDa del extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus* (F3 pp.60% >100 kDa) (Figura 21) (el análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey se reportan en el Anexo 12), tuvo un porcentaje de recuperación de 15.9% y un factor de purificación de 2.2 (Tabla 16).

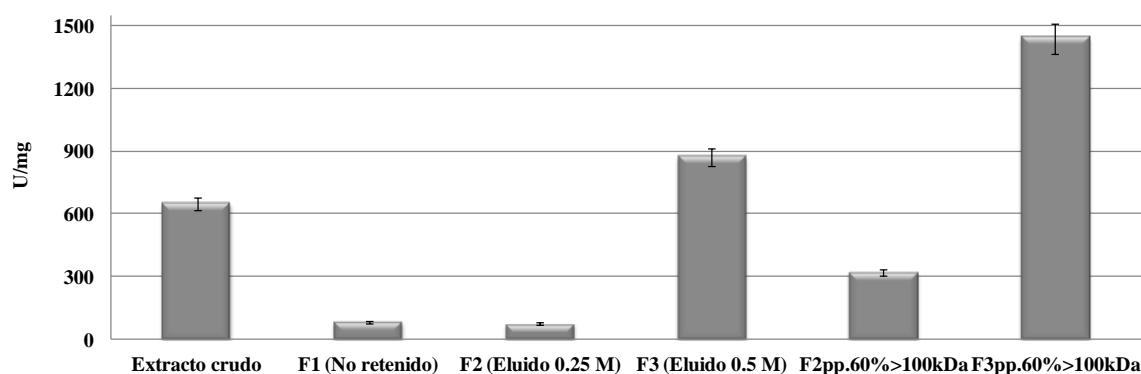


Figura 21. Actividad específica (pH 8) de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus* obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y ultrafiltración.

Tabla 17. Parámetros de recuperación de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus* obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y ultrafiltración.

| Fracción, condiciones elución/precipitación<br>% sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /peso molecular (kDa) | Actividad total*<br>(U, pH 8) | Proteína total*<br>(mg) | Actividad específica<br>(U/mg) | Factor de purificación | % Recuperación |
|--|-------------------------------|-------------------------|--------------------------------|------------------------|----------------|
| Extracto crudo   | 37737.50                      | 58.20                   | 648.70                         | 1.00                   | 100.00         |
| F2 (Eluido 0.25 M)   | 1080.00                       | 15.80                   | 68.50                          | 0.10                   | 2.90           |
| F2 pp.60% >100 kDa   | 930.10                        | 2.90                    | 317.50                         | 0.50                   | 2.50           |
| F3 (Eluido 0.50 M)   | 19400.00                      | 24.00                   | 808.30                         | 1.20                   | 51.40          |
| F3 pp.60% >100 kDa   | 6000.00                       | 4.20                    | 1438.60                        | 2.20                   | 15.90          |

\*Valor medio (o media).

La Figura 22 muestra el efecto del pH sobre la actividad proteolítica de las fracciones del extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus*. La fracción eluida con NaCl 0.50 M precipitada con sulfato de amonio saturado al 60% y con peso molecular mayor a 100 kDa (F3 pp.60% >100 kDa) tuvo la mayor actividad proteolítica en el rango de pH 6-10, por lo tanto dicha fracción fue seleccionada (nombrada “extracto proteolítico parcialmente purificado del músculo ventral”) y con base en los resultados reportados en la Tabla 16.

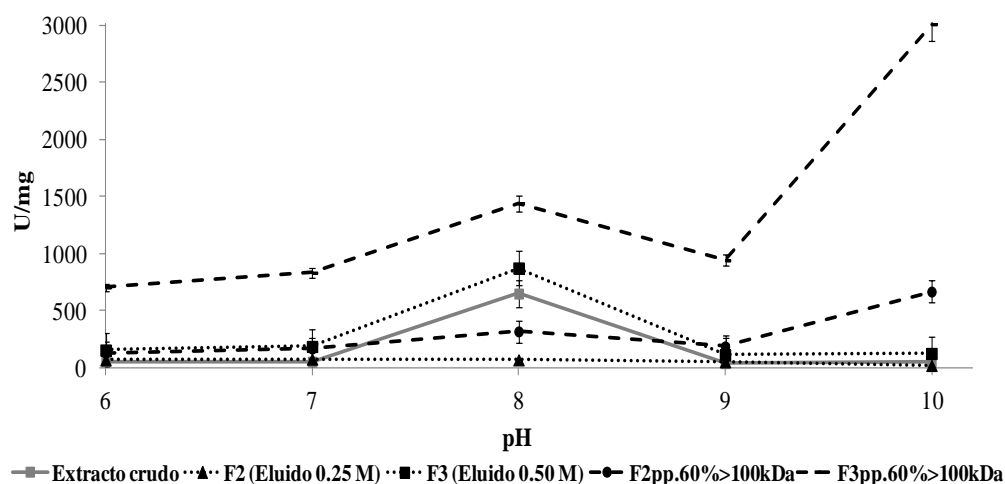


Figura 22. Actividad específica (pH 6-10) de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del músculo ventral de *I. fuscus* obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y ultrafiltración.

### 8.4.2.2 Extracto proteolítico del tracto digestivo de *I. fuscus*.

#### Concentración de proteína.

La mayor concentración de proteína se obtuvo en la fracción proteolítica eluida con NaCl 0.25 M del extracto proteolítico del tracto digestivo de *I. fuscus* (F2 Eluido 0.25 M) con 0.3 mg/mL (Tabla 17).

Tabla 18. Concentración de proteína de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del tracto digestivo de *I. fuscus* obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y ultrafiltración.

| Fracción, condiciones elución/precipitación<br>% sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /peso molecular (kDa) | mg/mL*      |
|--|-------------|
| Extracto crudo   | 0.88 ± 0.01 |
| F2 (Eluido 0.25 M)   | 0.30 ± 0.03 |
| F3 (Eluido 0.50 M)   | 0.14 ± 0.01 |
| F2 pp.60% >100 kDa   | 0.18 ± 0.02 |
| F3 pp.60% >100 kDa   | 0.17 ± 0.02 |

\*Valor medio (o media).

#### Determinación de actividad proteolítica.

La mayor actividad proteolítica a pH 8 ( $p > 0.001$ ) se encontró en la fracción proteolítica eluida con NaCl 0.50 M del extracto proteolítico del tracto digestivo de *I. fuscus* (F3 Eluido 0.50 M) (Figura 23) (el análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey se reportan en el Anexo 12), con un porcentaje de recuperación de 58.3% y un factor de purificación de 1.9 (Tabla 18).

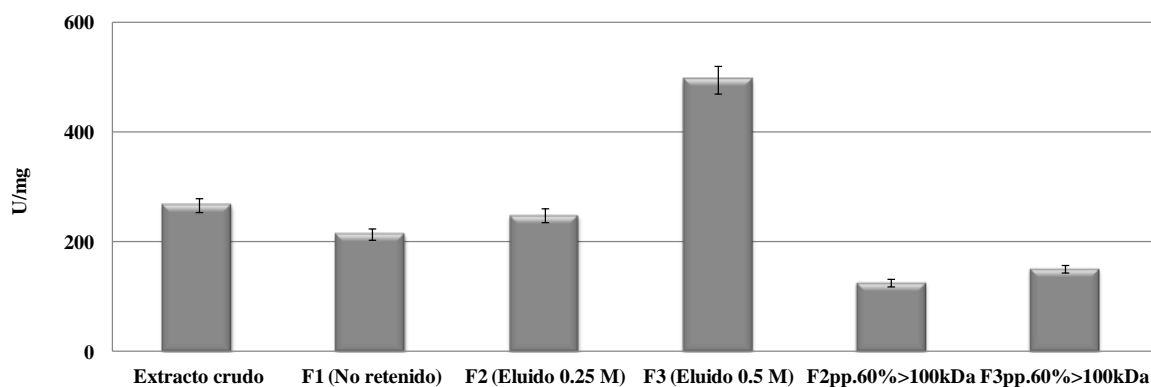


Figura 23. Actividad específica (pH 8) de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del tracto digestivo de *I. fuscus* obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y ultrafiltración.

Tabla 19. Parámetros de recuperación de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del tracto digestivo de *I. fuscus* obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y ultrafiltración.

| Fracción, condiciones elución/precipitación % sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /peso molecular (kDa) | Actividad total* (U, pH 8) | Proteína total* (mg) | Actividad específica (U/mg) | Factor de purificación | % Recuperación |
|---|----------------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------|----------------|
| Extracto crudo  | 23519.40                   | 88.30                | 266.20                      | 1.00                   | 100.00         |
| F2 (Eluido 0.25 M)  | 14986.70                   | 60.70                | 247.00                      | 0.90                   | 63.70          |
| F2 pp.60% >100 kDa  | 272.00                     | 2.20                 | 124.80                      | 0.50                   | 1.20           |
| F3 (Eluido 0.50 M)  | 13706.70                   | 27.70                | 495.20                      | 1.90                   | 58.30          |
| F3 pp.60% >100 kDa  | 302.90                     | 2.00                 | 150.10                      | 0.60                   | 1.30           |

\*Valor medio (o media).

La Figura 24 muestra el efecto del pH sobre la actividad proteolítica de las fracciones del extracto proteolítico del tracto digestivo de *I. fuscus*. La fracción proteolítica eluida con NaCl 0.50 M (F3 Eluido 0.50 M) tuvo la mayor actividad a pH de 6 a 10, por lo que se seleccionó esta fracción (nombrada “extracto proteolítico parcialmente purificado del tracto digestivo”) apoyado de los resultados reportados en la Tabla 18.

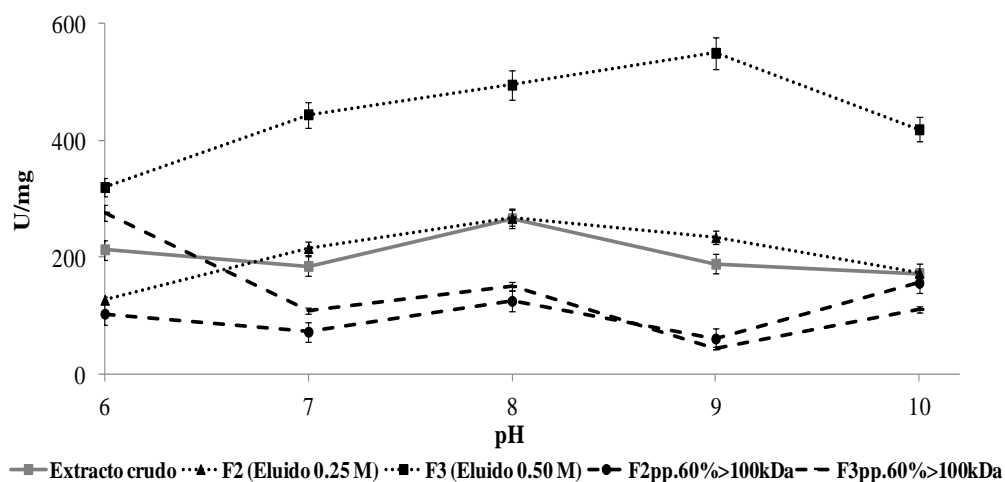


Figura 24. Actividad específica (pH 6-10) de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico del tracto digestivo de *I. fuscus* obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y ultrafiltración.

### 8.4.2.3 Extracto proteolítico de los tentáculos de *I. fuscus*.

#### Concentración de proteína.

La mayor concentración de proteína se obtuvo en la fracción proteolítica eluida con NaCl 0.50 M precipitada con sulfato de amonio saturado al 60% y con peso molecular mayor a 100 kDa del extracto proteolítico de los tentáculos de *I. fuscus* (F3 pp.60% >100 kDa) con 0.28 mg/mL (Tabla 19).

Tabla 20. Concentración de proteína de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico de los tentáculos de *I. fuscus* obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y ultrafiltración.

| Fracción, condiciones elución/precipitación<br>% sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /peso molecular (kDa) | mg/mL *     |
|--|-------------|
| Extracto crudo   | 1.03 ± 0.11 |
| F2 (Eluido 0.25 M)   | 0.14 ± 0.01 |
| F3 (Eluido 0.50 M)   | 0.09 ± 0.02 |
| F2 pp.60% >100 kDa   | 0.37 ± 0.01 |
| F3 pp.60% >100 kDa   | 0.28 ± 0.01 |

\*Valor medio (o media).

#### Determinación de actividad proteolítica.

La mayor actividad proteolítica a pH 8 ( $p < 0.001$ ) se encontró en la fracción proteolítica eluida con NaCl 0.50 M del extracto proteolítico de los tentáculos de *I. fuscus* (F3 eluido 0.50 M) (Figura 25) (el análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey se reportan en el Anexo 12), el porcentaje de recuperación de dicha fracción fue de 58.8% y el factor de purificación de 1.6 (Tabla 20).

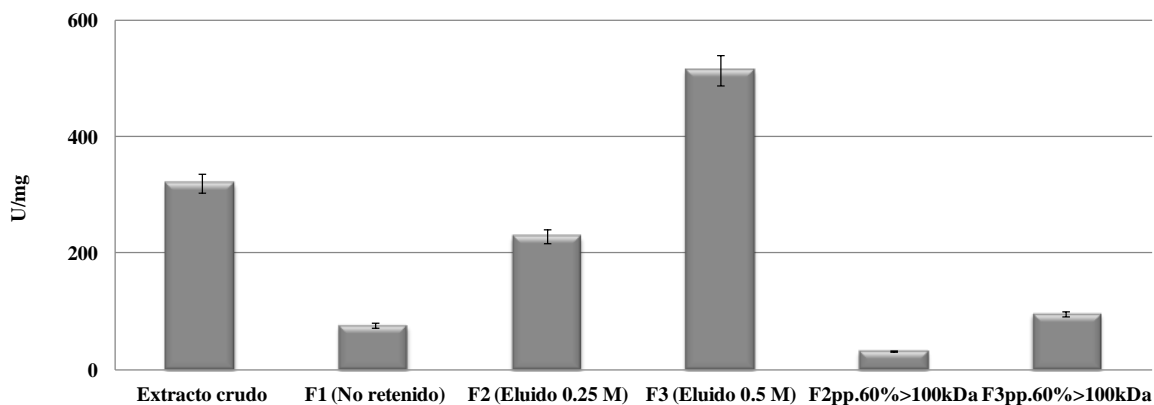


Figura 25. Actividad específica (pH 8) de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico de los tentáculos de *I. fuscus* obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y ultrafiltración.



Tabla 21. Parámetros de recuperación de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico de los tentáculos de *I. fuscus* obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y ultrafiltración.

| Fracción, condiciones elución/precipitación % sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /peso molecular (kDa) | Actividad total* (U, pH 8) | Proteína total* (mg) | Actividad específica (U/mg) | Factor de purificación | % Recuperación |
|---|----------------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------|----------------|
| Extracto crudo  | 16406.90                   | 51.30                | 319.80                      | 1.00                   | 100.00         |
| F2 (Eluido 0.25 M)  | 7182.20                    | 28.08                | 255.70                      | 0.80                   | 43.80          |
| F2 pp.60% >100 kDa  | 232.90                     | 7.35                 | 31.70                       | 0.10                   | 1.40           |
| F3 (Eluido 0.50 M)  | 9650.00                    | 18.78                | 513.80                      | 1.60                   | 58.80          |
| F3 pp.60% >100 kDa  | 666.70                     | 6.96                 | 95.70                       | 0.30                   | 4.10           |

\*Valor medio (o media).

La Figura 26 muestra el efecto del pH sobre la actividad proteolítica de las fracciones del extracto proteolítico de los tentáculos de *I. fuscus*. La fracción proteolítica eluida con NaCl 0.50 M (F3 eluido 0.50 M) tuvo la mayor actividad a pH 6-8, por lo que se seleccionó dicha fracción para los estudios posteriores (nombrada “extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos”), apoyado de los resultados reportados en la Tabla 20.

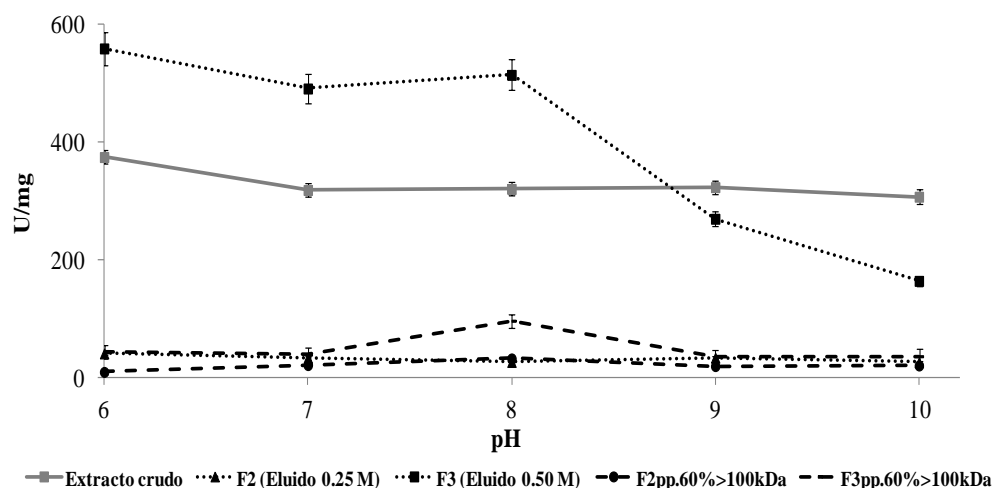


Figura 26. Actividad específica (pH 6-10) de fracciones proteolíticas del extracto proteolítico de los tentáculos de *I. fuscus* obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en lote, precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y ultrafiltración.

### 8.4.3 Cromatografía de intercambio aniónico por LPLC.

Los extractos proteolíticos parcialmente purificados fueron sometidos nuevamente a cromatografía de intercambio aniónico pero empleando cromatografía líquida a baja presión (LPLC), recolectando las fracciones eluidas con NaCl 0.50 M y posteriormente se determinó su actividad proteolítica en las condiciones óptimas predeterminadas (pH 6, 60°C). Las Figuras 27, 28 y 29 muestran los perfiles cromatográficos por LPLC de los extractos proteolíticos parcialmente purificados del músculo ventral, el tracto digestivo y los tentáculos de *I. fuscus*, respectivamente. La fracción del extracto proteolítico del músculo ventral presentó una actividad específica de 6 827 U/mg (Figura 27).

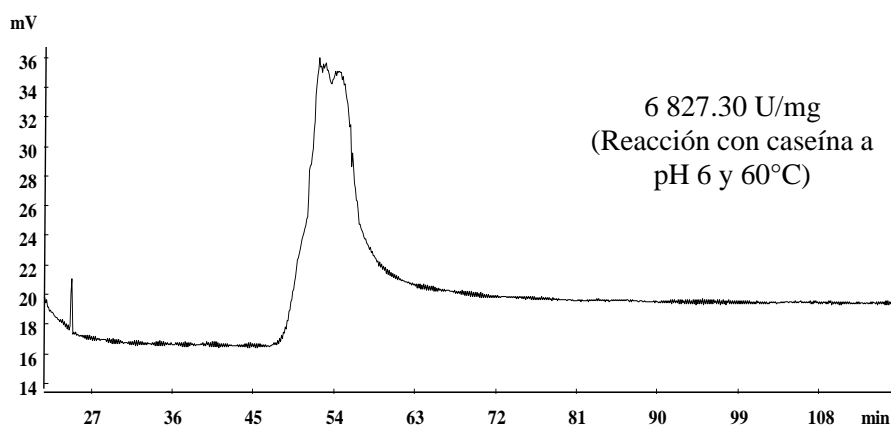


Figura 27. Perfil cromatográfico (LPLC) del extracto proteolítico parcialmente purificado del músculo ventral de *I. fuscus*.

La fracción del extracto proteolítico del tracto digestivo tuvo una actividad proteolítica de 7 697 U/mg (Figura 28), y la fracción del extracto proteolítico de los tentáculos tuvo una actividad proteolítica de 3 724 U/mg (Figura 29).

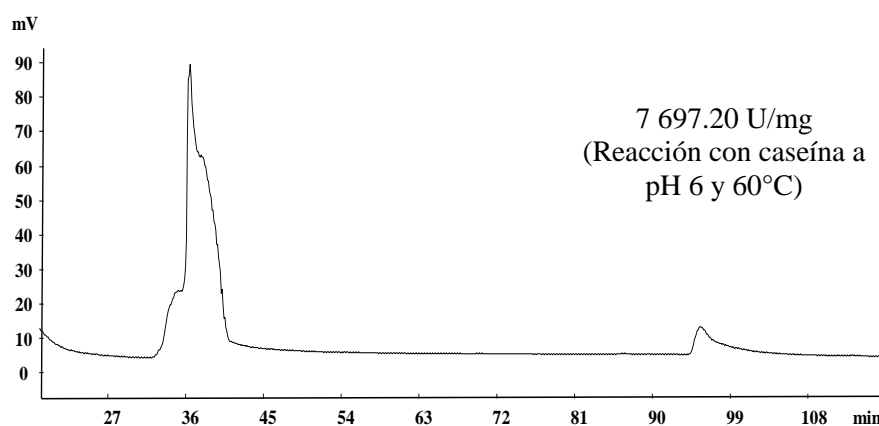


Figura 28. Perfil cromatográfico (LPLC) del extracto proteolítico parcialmente purificado del tracto digestivo de *I. fuscus*.

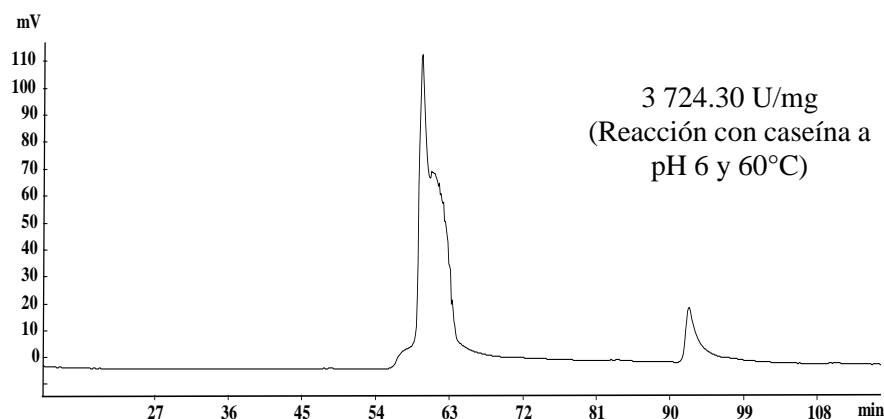


Figura 29. Perfil cromatográfico (LPLC) del extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus*.

Diferentes autores han reportado purificaciones de proteasas del pepino de mar *S. japonicus* empleando cromatografía de intercambio aniónico utilizando un gradiente lineal de NaCl 0.1 a 1.5 M en amortiguador para eluir las fracciones de interés (Qi y col., 2007; Zhu y col., 2008b; Sun y col., 20011), adicionalmente, se obtuvo un incremento significativo de la actividad enzimática de los extractos proteolíticos del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos de *I. fuscus* comparada a la obtenida sólo por cromatografía de intercambio aniónico en lote (apartado 8.4.2).

## 8.5 Caracterización de extractos proteolíticos parcialmente purificados.

### 8.5.1 Determinación de concentración de proteína.

El extracto proteolítico parcialmente purificado del tracto digestivo de *I. fuscus* obtenido por LPLC (como se mostró en el apartado 8.4.3) tuvo la mayor concentración de proteína (0.14 mg/mL), seguido de los extractos proteolíticos del músculo ventral (0.08 mg/mL) y de los tentáculos (0.01mg/mL) (Tabla 21).

Tabla 22. Concentración de proteína de extractos parcialmente purificados de *I. fuscus* por LPLC.

| Muestras         | mg/mL*      |
|------------------|-------------|
| Músculo ventral  | 0.08 ± 0.04 |
| Tracto digestivo | 0.14 ± 0.02 |
| Tentáculos       | 0.01 ± 0.02 |

\*Valor medio (o media).

### 8.5.2 Efecto del pH sobre la actividad proteolítica.

La Figura 30 muestra el efecto del pH sobre la actividad proteolítica de extractos parcialmente purificados del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos de *I. fuscus*, a 60°C (el análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey se reportan en el Anexo 13). El extracto proteolítico del músculo ventral mostró actividad proteolítica significativamente mayor ( $p < 0.001$ ) a pH 10, seguido de pH 8 y pH 6-7. Asimismo, el extracto proteolítico del tracto digestivo tuvo mayor actividad ( $p < 0.001$ ) a pH 6, seguido de pH 8-9, mientras que el extracto parcialmente purificado de los tentáculos fue más activo ( $p < 0.001$ ) a pH 7, seguido de pH 6 y 8. Esto llevó a concluir la presencia de proteasas ácidas y alcalinas en todos los extractos, por lo que sería necesaria una mayor purificación para obtener los óptimos de actividad proteolítica de proteasas específicas.

Cabe destacar que el extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos presentó mayor actividad específica que el extracto proteolítico del tracto digestivo (obtenidos con el mismo procedimiento de purificación parcial) en el rango de pH estudiado (pH 2-10), recordando lo discutido en el apartado 8.3.3 (efecto del pH sobre la actividad de extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus*), donde se sugirió que los tentáculos podrían funcionar como un sistema de digestión alternativo cuando el pepino de mar ha expulsado sus órganos internos como método de defensa.

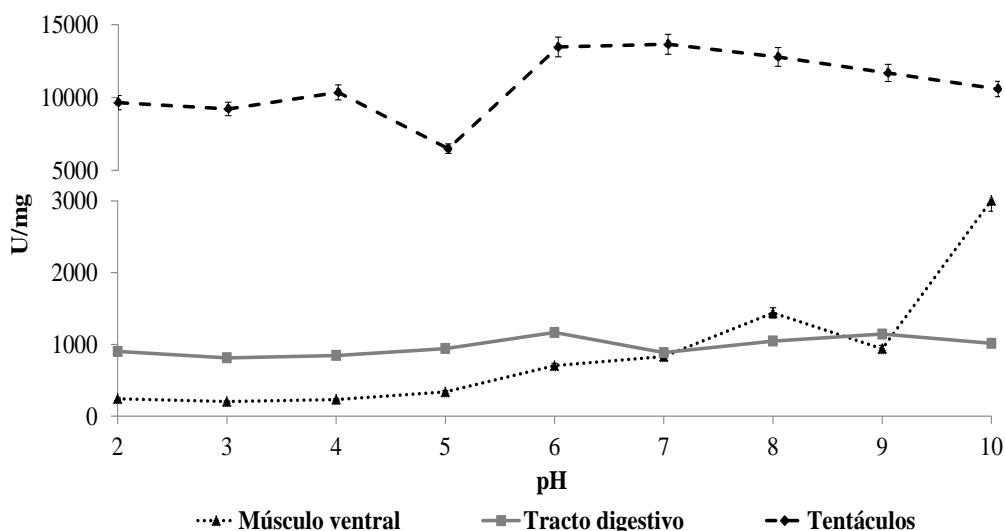


Figura 30. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica de extractos parcialmente purificados de *I. fuscus*.

Las proteasas del músculo ventral con actividad óptima a pH 6-7 tuvieron un comportamiento ante el pH similar a lo reportado por Zhu y col. (2008b) y Qi y col. (2007), quienes determinaron óptimos de actividad a pH 5 (37°C) y pH 7 (50°C), respectivamente, para cisteín proteasas purificadas de la pared del cuerpo de *S. japonicus*. Asimismo, los resultados concordaron con el pH óptimo (pH 6.1) de cisteín proteasas implicadas en la proteólisis de proteínas no colágenas de *S. japonicus*, reportado por Wu y col. (2013b). En cuanto a las proteasas con máxima actividad a pH 8, coincidieron con lo obtenido por Wu y col. (2013a) para metalo proteasas gelatinolíticas de *S. japonicus* con actividad a pH 8-9 (37°C).

Por otro lado, los óptimos de actividad de las proteasas ácidas de los extractos parcialmente purificados del tracto digestivo (pH 6) y de los tentáculos (pH 6-7) fueron similares a lo descrito por Sun y col. (2011), quienes purificaron catepsinas B del intestino de *S. japonicus* con actividades máximas a pH 5.5 (40°C). Mientras que los óptimos de actividad en la región alcalina de las proteasas del tracto digestivo (pH 8-9) y de los tentáculos (pH 8) coincidieron con Fu y col. (2005), quienes reportan colagenasas (metalo proteasas) con actividad similar a serín proteasas en el tracto digestivo de *S. japonicus*.

Se ha demostrado actividad proteolítica en una variedad de equinodermos (Lawrence, 1982), así como la presencia de serín proteasas de tipo tripsina y quimotripsina (proteasas alcalinas) en holotúridos (Fish, 1967). Además, existen reportes de que las colagenasas en el tracto digestivo muestran al mismo tiempo actividades similares a la tripsina y quimotripsina con una actividad máxima a pH 6.5-8.0 (Yoshinaka y col., 1987; Kristjansson y col., 1995; Zefirova y col., 1996), de forma similar a los resultados observados en nuestro estudio. De igual forma, Aleander y col. (2002), Alarcón y col. (1998), Hidalgo y col. (1999), Essed y col. (2002) han detectado en otros organismos marinos proteasas con actividades óptimas a pH alcalino, sugiriendo la presencia de serín proteasas. En general, se ha reportado que las tripsinas marinas (serín proteasas) son más activas a pH alcalino, con un intervalo de pH óptimo de 7.5-10.5 (Klomklao y col., 2006).

Por lo tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos y reportes en la literatura, se sugirió que las proteasas alcalinas identificadas en los tres órganos estudiados, con óptimos de actividad alrededor de pH 8, pueden ser serín y/o metalo proteasas, mientras que las proteasas ácidas, con actividades significativas cerca de pH 6, son posibles cisteín proteasas.

Factores tales como características fisiológicas, temperatura, clima, régimen nutricional y requerimientos de componentes bioquímicos específicos, pueden explicar los cambios de las actividades de proteasas digestivas (Fu y col., 2006). Por lo que el pH del agua en el que se encuentran estas especies podría influir en el comportamiento de sus enzimas digestivas. Se ha reportado para el cultivo óptimo de *S. japonicus* pH 7.8, y tolerancia a pH 7.5-8.4 (Wang y Cheng, 2004; Liu y col., 2004) y para la crianza de *I. fuscus* pH de 8.4-8.5 (Mercier y col., 2004). Asimismo, el pepino de mar se alimenta de forma constante y por tanto ingiere grandes cantidades de agua de mar la cual se encuentra a pH neutro (Guillaume y Choubert, 1999). Lo anterior explicaría la tendencia de la actividad proteolítica hacia pH alcalino.

En el mismo contexto, los hábitos alimenticios de peces podrían afectar la actividad proteolítica (Chakrabarti y col., 1995; Hidalgo y col., 1999). Las especies carnívoras poseen mayores niveles de proteasas ácidas en comparación con las especies omnívoras o herbívoras (Jonas y col., 1983). El pepino de mar es un organismo detritívoro lo que explicaría la presencia de proteasas con mayor actividad a pH alcalino, sin embargo, también se alimenta de plancton, algas, microalgas y algunos invertebrados, lo que explicaría la necesidad de la actividad de proteasas ácidas.

### 8.5.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica.

La Figuras 31 muestra el efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica de los extractos proteolíticos parcialmente purificados del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos de *I. fuscus*, a pH 6 (el análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey se reportan en el Anexo 14). Los óptimos de actividad ( $p < 0.001$ ) para los extractos parcialmente purificados del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos fueron 50°C, 60°C, y 10 y 50 °C, respectivamente. Los resultados obtenidos a pH 6 coincidieron con lo reportado por Qi y col. (2007) y Zhu y col. (2008b), quienes mencionaron actividad proteolítica óptima a 50°C para cisteín proteasas de la pared del cuerpo de *S. japonicus*. Asimismo, fueron similares con lo descrito por Wu y col. (2013a) para metalo proteasas gelatinolíticas de *S. japonicus* con mayor actividad proteolítica a 40-45°C.

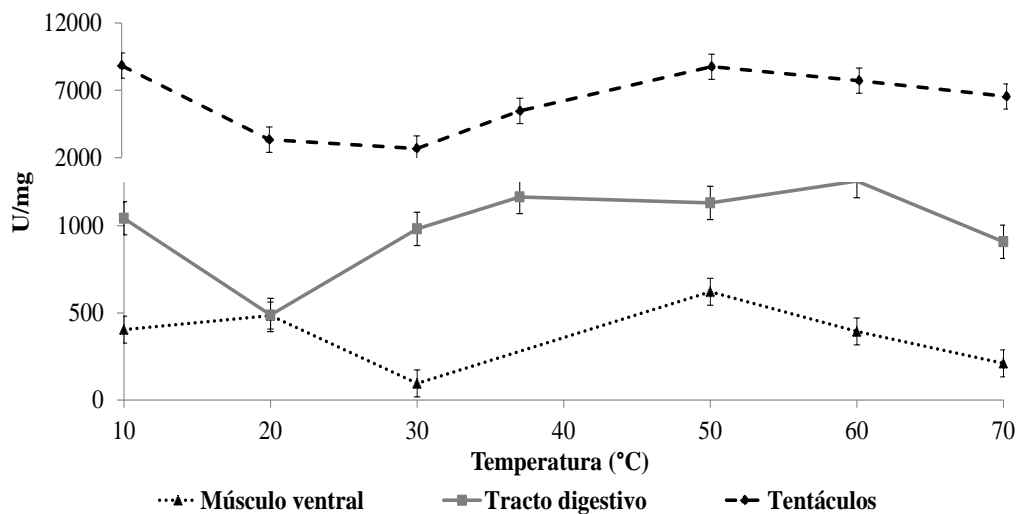


Figura 31. Efecto de la temperatura, a pH 6, sobre la actividad proteolítica de extractos parcialmente purificados de *I. fuscus*.

La Figuras 32 muestra el efecto de la temperatura, a pH 8, sobre la actividad proteolítica de los extractos proteolíticos parcialmente purificados del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos de *I. fuscus* (el análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey se reportan en el Anexo 14). Los óptimos de actividad ( $p < 0.001$ ) para los extractos parcialmente purificados del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos fueron 10-37°C, 50°C, 30 y 50 °C, respectivamente. Los resultados obtenidos a pH 8 fueron similares a lo reportado por Sun y col. (2011) quienes mencionaron una temperatura óptima de 45°C para catepsinas B del tracto digestivo de *S. japonicus*. Asimismo, coincidieron con los resultados publicados por Fu y col. (2005) para proteasas de *S. japonicus* con actividad máxima a 37°C.



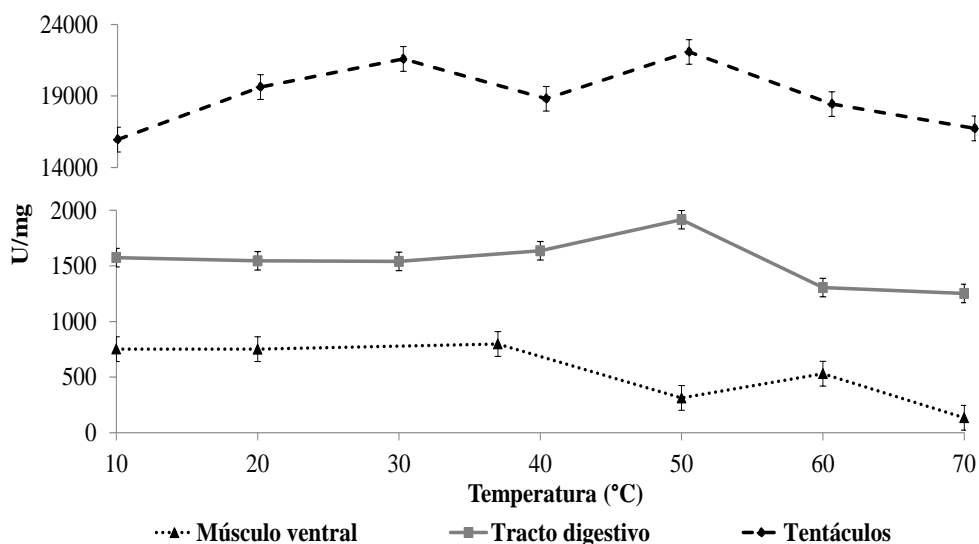


Figura 32. Efecto de la temperatura, a pH 8, sobre la actividad proteolítica de extractos parcialmente purificados de *I. fuscus*.

Es importante mencionar que el extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus* mostró mayor actividad proteolítica en los dos estudios de temperatura, a pH 6 y pH 8, que el extracto proteolítico del tracto digestivo, lo que sugirió nuevamente que los tentáculos podrían funcionar como un sistema de digestión alternativo mientras el pepino de mar regenera sus órganos internos, como se discutió en el apartado 8.5.2.

En general, las proteasas de *I. fuscus* mostraron mayor termoestabilidad que lo reportado para las proteasas de *S. japonicus*, posiblemente por las características fisicoquímicas del medio ambiente en el que se desarrolla *I. fuscus*, ya que los organismos *S. japonicus* que se han reportado provienen del mar de Bohai y mar Amarillo de China donde las masas de agua superficial costera en invierno alcanzan valores menores a 3-4°C y en verano entre 24-26°C (Chen, 2009), mientras que las zonas de extracción para este estudio (Golfo de California, México) presentan aguas superficiales de 8-12°C en invierno y más de 30°C en verano (Lluch-Cota y col., 2007; Bernal y col., 2001).

En el mismo contexto, algunos estudios similares realizados con peces reportaron óptimos de actividad proteolítica a temperaturas cercanas a 60°C, similar a lo obtenido en el presente estudio. Además, se ha demostrado que las temperaturas óptimas de las proteasas extraídas de los órganos internos de peces, muestran variaciones entre los diferentes órganos y las especies (Khantaphant y col., 2008), como es el caso de las proteasas del ciego pilórico de especies como: pargo (*Lutjanus vitta*) que muestran una actividad proteolítica óptima a 65°C (Khantaphant y col., 2008); sardina Monterrey (*Sardinops sagax caerulea*) con máxima actividad a 50°C (Castillo-Yañez y col., 2005); salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*) con óptima actividad a 60°C (Kurtovic y col., 2006); y pescado azul (*Pomatomus saltatrix*) con temperatura óptima de 55°C (Klomklao y col., 2007), lo que explicaría la diferencia entre las temperaturas óptimas de actividad proteolítica obtenidas en el presente estudio para *I. fuscus* y lo reportado para *S. japonicus*. En general, se ha reportado que las tripsinas marinas son más activas a temperaturas entre 40 y 60 °C (Klomklao y col., 2006).

#### 8.5.4 Análisis electroforético (SDS-PAGE y Zimografía).

El extracto proteolítico parcialmente purificado del músculo ventral de *I. fuscus* presentó una proteasa con peso molecular estimado de 49 kDa (Figuras 33 y 34) con actividad proteolítica basada en hidrólisis de caseína (2%, p/v, a pH 6 y 60°C) (Figuras 35 y 36). Los resultados coincidieron con lo reportado por Wu y col. (2013a), quienes identificaron una metalo proteasa de 45 kDa en la pared del cuerpo de *S. japonicus*. Asimismo, nuestros resultados fueron similares a lo descrito por Qi y col. (2007) quienes reportaron una cisteín proteasa de 36 kDa en la pared del cuerpo de *S. japonicus*. Por lo tanto, se sugirió la posible presencia de cisteín y/o metalo proteasas en el extracto proteolítico estudiado.

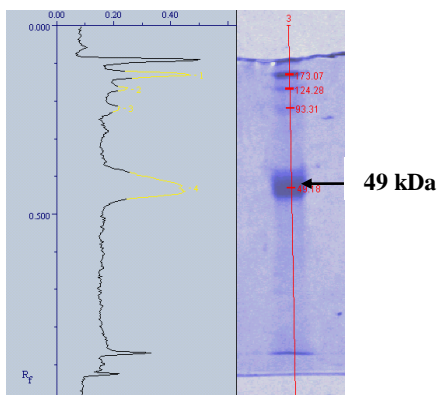


Figura 33. SDS-PAGE del extracto proteolítico parcialmente purificado del músculo ventral de *I. fuscus*. Tinción con azul de Coomassie.

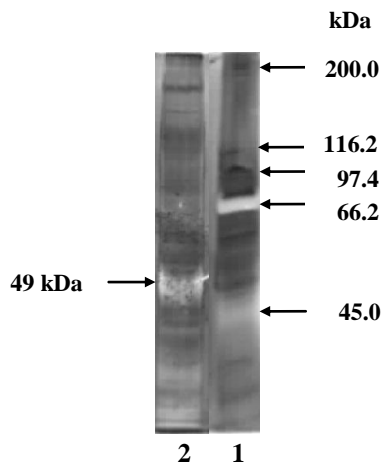


Figura 34. SDS-PAGE del extracto proteolítico parcialmente purificado del músculo ventral de *I. fuscus*. Tinción con plata. Líneas: 1. Marcador molecular; 2. Extracto parcialmente purificado.

Los estudios de zimografía a diferente pH (pH 6 a 10) (Figura 35) y estabilidad a la temperatura (40, 50 y 60 °C) (Figuras 36) mostraron que las proteasas del músculo ventral de *I. fuscus* tienen mayor actividad a pH 6, 8 y 10 y permanecen estables al ser incubadas por una hora a 60°C, reafirmando los resultados obtenidos en los estudios del efecto del pH y la temperatura sobre la actividad proteolítica del extracto proteolítico parcialmente purificado reportados en los apartados 8.5.2 y 8.5.3, respectivamente.

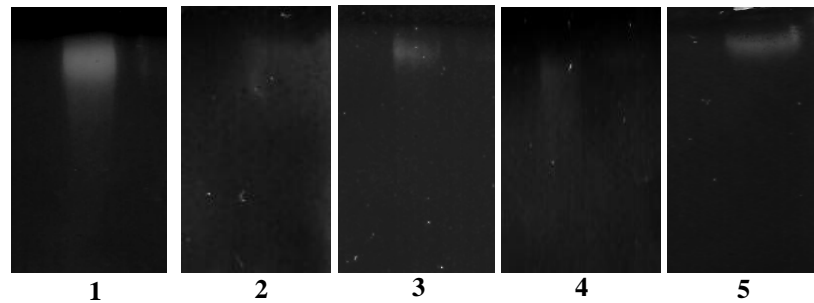


Figura 35. Zimografía del efecto del pH sobre la actividad del extracto proteolítico parcialmente purificado del músculo ventral de *I. fuscus* (hidrólisis de caseína, 60°C). Líneas: 1, pH 6; 2, pH 7; 3, pH 8; 4, pH 9; 5, pH 10.

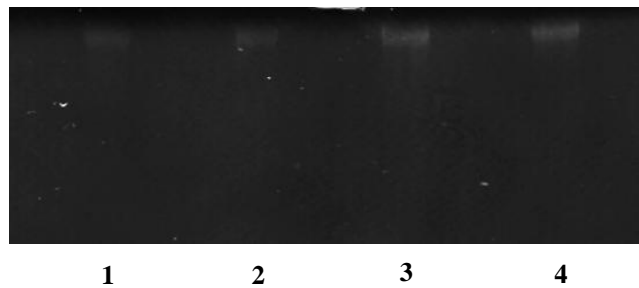


Figura 36. Zimografía de la estabilidad térmica del extracto proteolítico parcialmente purificado del músculo ventral de *I. fuscus* (hidrólisis de caseína, pH 6, 60°C). Preincubación 1 h. Líneas: 1, 60°C; 2, 50°C; 3, 40°C; 4, Sin incubación.

El extracto proteolítico parcialmente purificado del tracto digestivo de *I. fuscus* presentó una proteasa con peso molecular estimado de 47 kDa (Figura 37), mientras que el extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos tuvo una proteasa similar de 46 kDa (Figura 37), dichas proteasas tuvieron actividad caseinolítica (2%, p/v, a pH 6 y 60°C) (Figura 38). Los resultados fueron similares a lo reportado por Qi y col. (2007) para cisteín proteasas de 36 kDa y a lo descrito por Wu y col. (2013a) quienes identificaron metalo proteasas de 45 kDa, en ambos casos, en la pared del cuerpo de *S. japonicus*. Por lo tanto se sugirió la presencia de cisteín y/o metalo proteasas en los extractos proteolíticos del tracto digestivo y de los tentáculos de *I. fuscus*.

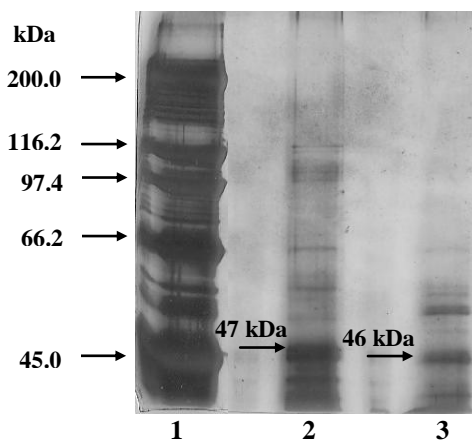


Figura 37. SDS-PAGE de los extractos proteolíticos parcialmente purificados del tracto digestivo y de los tentáculos de *I. fuscus*. Tinción en plata. Líneas: 1, Marcador molecular; 2, Extracto proteolítico del tracto digestivo; 3, Extracto proteolítico de los tentáculos.

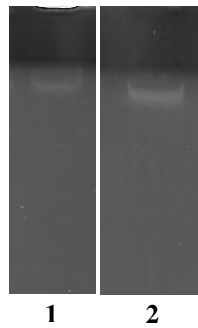


Figura 38. Zimografía de los extractos proteolíticos parcialmente purificados del tracto digestivo y de los tentáculos de *I. fuscus* (hidrólisis de caseína, pH 6, 60°C). Líneas: 1, Extracto proteolítico del tracto digestivo; 2, Extracto proteolítico de los tentáculos.

### 8.6 Purificación de proteínas por HPLC.

La Figura 39 muestra las seis fracciones purificadas del extracto proteolítico parcialmente purificado del músculo ventral de *I. fuscus* por HPLC. La fracción “IV” mostró la mayor actividad proteolítica ( $p < 0.001$ ) con respecto a las otras fracciones, con una actividad específica de 15 498 U/mg (el análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey se reportan en el Anexo 15). Por lo tanto, la fracción “IV” se sometió nuevamente a HPLC obteniéndose tres subfracciones (Figura 40), de las cuales la subfracción “IVc” presentó la mayor actividad específica con 17 252 U/mg, por lo que se seleccionó dicha subfracción para su posterior identificación por espectrometría de masas.

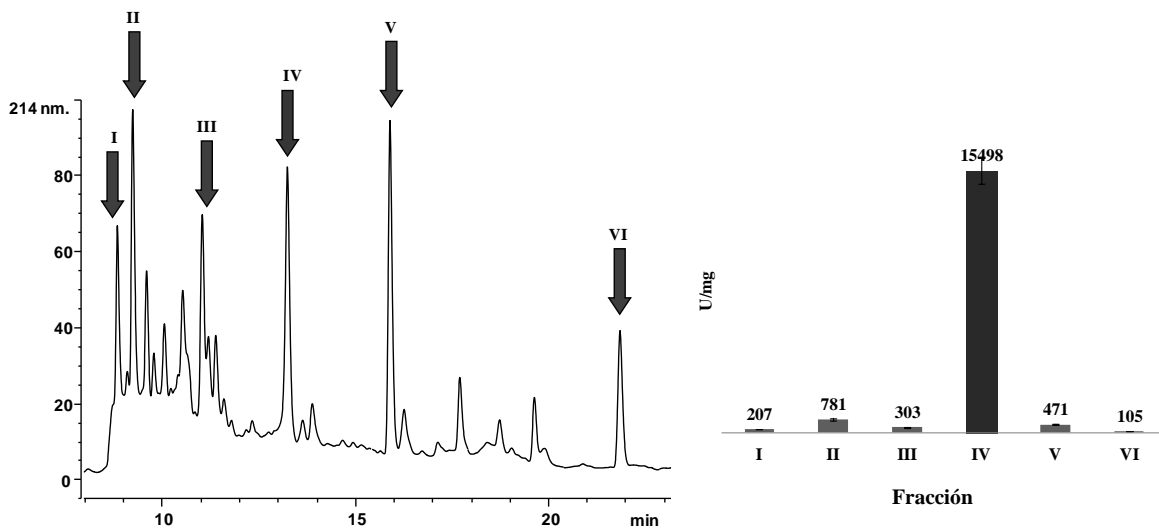


Figura 39. Perfil cromatográfico (RP-HPLC) del extracto proteolítico parcialmente purificado del músculo ventral de *I. fuscus* y actividad específica de las fracciones purificadas.

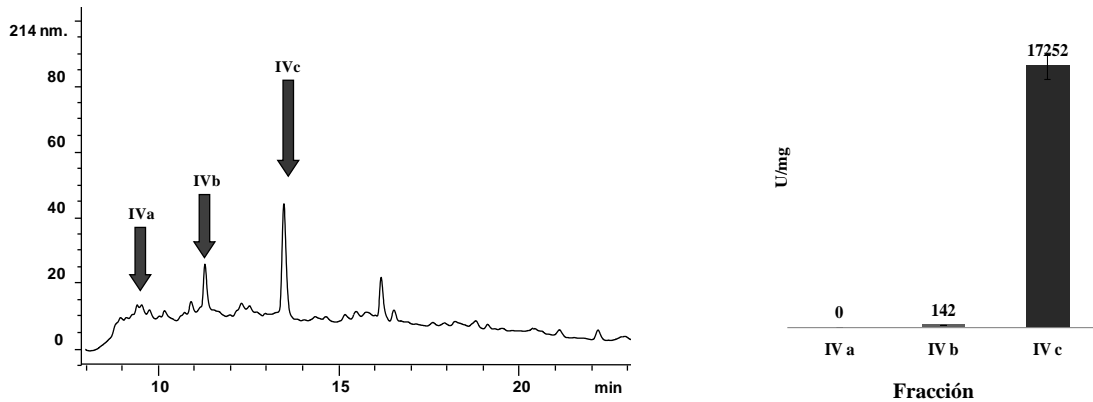


Figura 40. Perfil cromatográfico (RP-HPLC) de la fracción purificada “IV” del extracto proteolítico parcialmente purificado del músculo ventral de *I. fuscus* y actividad específica de las subfracciones purificadas.

Del extracto proteolítico parcialmente purificado del tracto digestivo de *I. fuscus* se obtuvieron diez fracciones por HPLC (Figura 41). La fracción “9” mostró la mayor actividad proteolítica ( $p < 0.001$ ) con respecto a las otras fracciones, con una actividad específica de 1 767 U/mg (el análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey se reportan en el Anexo 15). Dicha fracción se recolectó y se sometió nuevamente a HPLC para obtener su perfil cromatográfico y determinar nuevamente su actividad específica (Figura 42). Sólo se presentó una subfracción, nombrada fracción “9a”, con actividad específica de 7 831 U/mg, la cual fue recolectada para el análisis de espectrometría de masas.

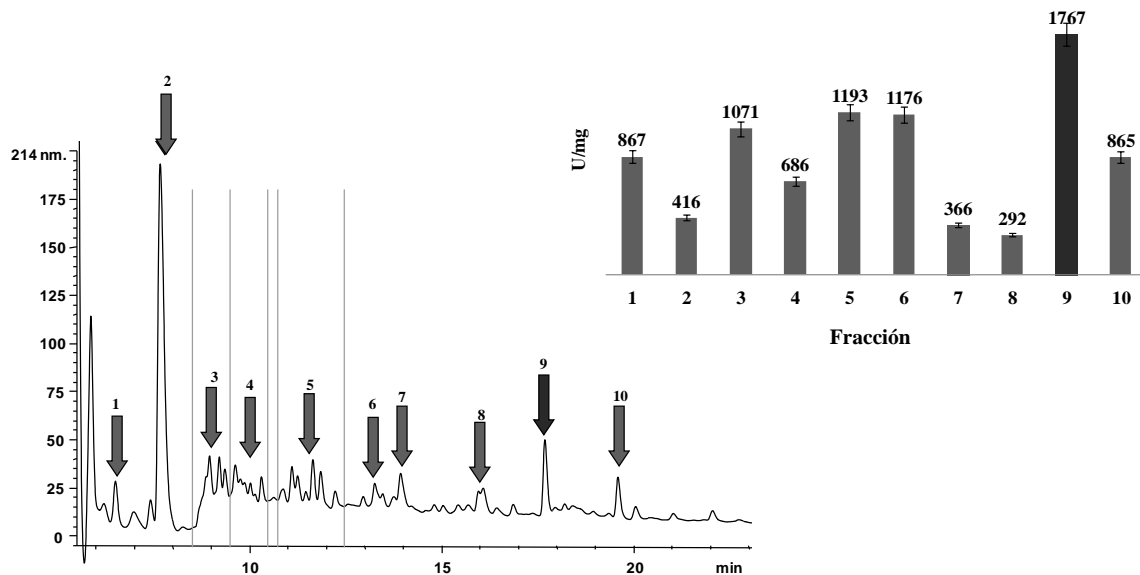


Figura 41. Perfil cromatográfico (RP-HPLC) del extracto proteolítico parcialmente purificado del tracto digestivo de *I. fuscus* y actividad específica de las fracciones purificadas.

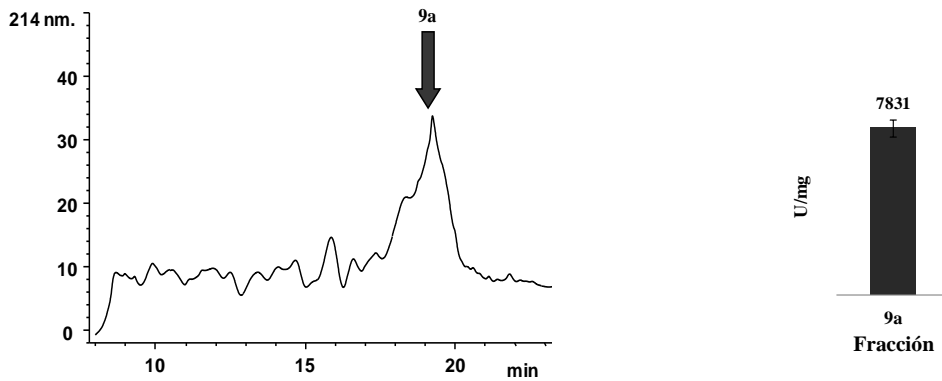


Figura 42. Perfil cromatográfico (RP-HPLC) de la fracción purificada “9” del extracto proteolítico parcialmente purificado del tracto digestivo de *I. fuscus* y actividad específica de la subfracción purificada.

Finalmente, del extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus* se obtuvieron diez fracciones por HPLC (Figura 43), donde las fracciones “E” e “I” tuvieron la mayor actividad proteolítica ( $p < 0.001$ ) con respecto a las otras fracciones, con actividades específicas de 2 341 y 4 293 U/mg, respectivamente (el análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey se reportan en el Anexo 15). Por lo tanto, se recolectaron las fracciones “E” e “I” y se sometieron nuevamente a HPLC para obtener sus perfiles cromatográficos y determinar sus actividades específicas (Figura 44 y 45). La subfracción “Ea” tuvo mayor ( $p < 0.001$ ) actividad proteolítica que la subfracción “Ia”, con actividad específica de 3 907 U/mg, por lo que fue seleccionada y recolectada para el análisis de espectrometría de masas.

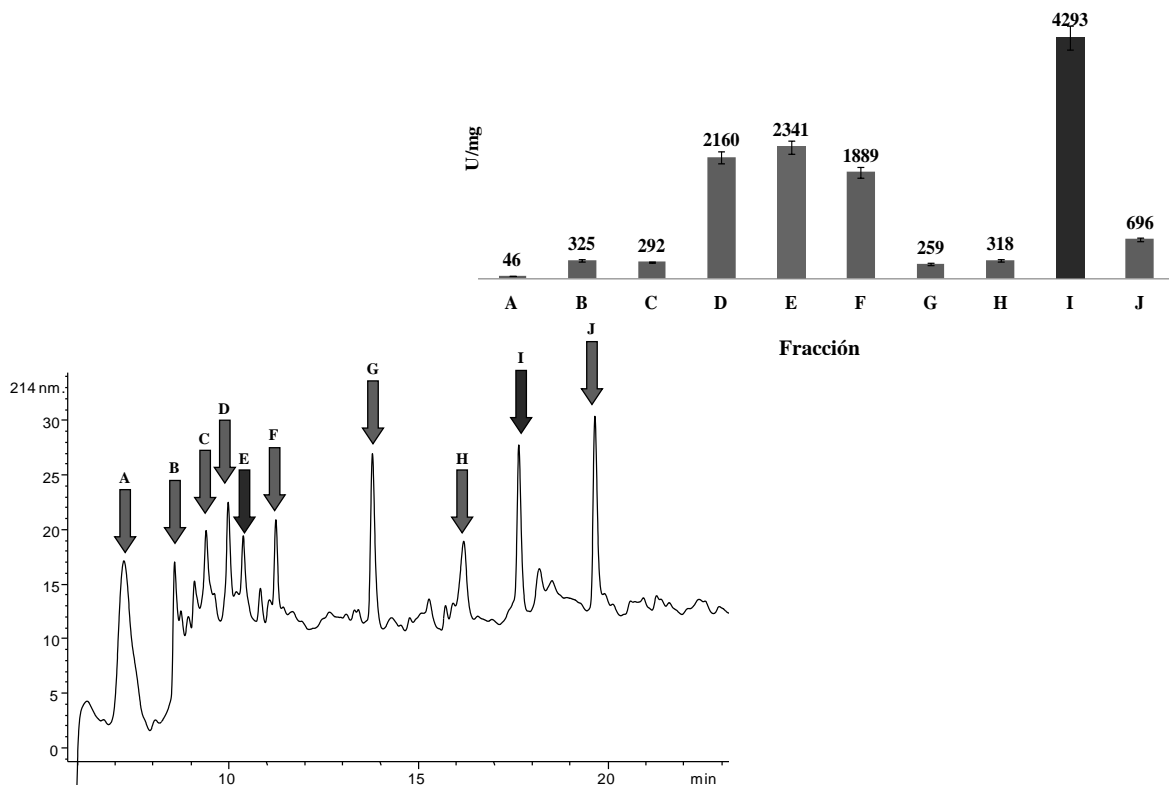


Figura 43. Perfil cromatográfico (RP-HPLC) del extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus* y actividad específica de las fracciones purificadas.



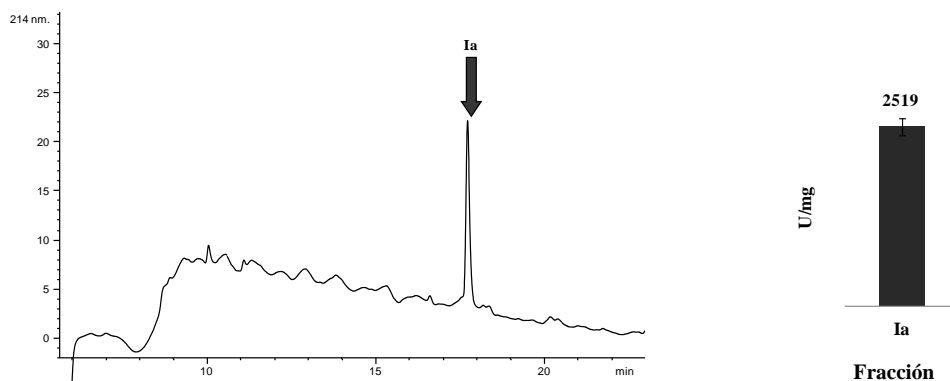


Figura 44. Perfil cromatográfico (RP-HPLC) de la fracción purificada “I” del extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus* y actividad específica de la subfracción purificada.



Figura 45. Perfil cromatográfico (RP-HPLC) de la fracción purificada “E” del extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus* y actividad específica de la subfracción purificada.

La Tabla 22 muestra los factores de purificación y porcentajes de recuperación obtenidos durante la purificación de los extractos proteolíticos del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos de *I. fuscus*. El extracto proteolítico purificado del músculo ventral tuvo un factor de purificación final de 26.6 con un porcentaje de recuperación de 0.9%, mientras que el extracto proteolítico purificado del tracto digestivo presentó un factor de purificación de 29.4 con un porcentaje de recuperación de 1.3%, y el extracto proteolítico purificado de los tentáculos incrementó su actividad proteolítica 11.2 veces con respecto a la actividad proteolítica del extracto crudo (factor de purificación de 12.2) con 1.7% de recuperación. Los resultados obtenidos fueron similares a lo reportado por Qi y col. para cisteín proteasas de *S. japonicus*, quienes mencionaron un factor de purificación de 17 con 5.3% de recuperación. Sin embargo, Zhu y col. (2008b) reportaron más del doble de purificación con un factor de 42.8 con un porcentaje de recuperación de 6.4%. De igual forma, Sun y col. (2011) obtuvieron un factor de purificación de 81.3 con recuperación del 3.3%. Sin embargo, dichos autores utilizaron más pasos de purificación que los utilizados en el presente estudio, como cromatografía de exclusión molecular en una columna “TSK gel”.

Tabla 23. Esquema de purificación de proteasas de *I. fuscus*.

| Paso de purificación  | Actividad total (U) | Proteína total (mg) | Actividad específica (U/mg) | Factor de purificación | % Recuperación |
|---|---------------------|---------------------|-----------------------------|------------------------|----------------|
| <b>MÚSCULO VENTRAL</b>  |                     |                     |                             |                        |                |
| Extracto crudo  | 37737.5             | 58.17               | 648.7                       | 1.0                    | 100.0          |
| Intercambio anionico en lote - DEAE A-50                                  | 19400.0             | 24.00               | 808.3                       | 1.2                    | 51.4           |
| Fraccionamiento (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> > 100 kDa | 6000.0              | 4.17                | 1438.6                      | 2.2                    | 15.9           |
| Intercambio anionico LPLC - High Q  | 2024.4              | 0.30                | 6827.3                      | 10.5                   | 5.4            |
| HPLC - C18 (Fracción IVc)   | 342.7               | 0.02                | 17251.7                     | 26.6                   | 0.9            |
| <b>TRACTO DIGESTIVO</b>   |                     |                     |                             |                        |                |
| Extracto crudo  | 23519.4             | 88.34               | 266.2                       | 1.0                    | 100.0          |
| Intercambio anionico en lote - DEAE A-50                                  | 13706.7             | 27.68               | 495.2                       | 1.9                    | 58.3           |
| Intercambio anionico LPLC - High Q  | 2581.3              | 0.34                | 7697.2                      | 28.9                   | 11.0           |
| HPLC - C18 (Fracción 9a)  | 300.0               | 0.04                | 7830.6                      | 29.4                   | 1.3            |
| <b>TENTÁCULOS</b>   |                     |                     |                             |                        |                |
| Extracto crudo  | 16406.9             | 51.30               | 319.8                       | 1.0                    | 100.0          |
| Intercambio anionico en lote - DEAE A-50                                  | 9650.0              | 18.78               | 513.8                       | 1.6                    | 58.8           |
| Intercambio anionico LPLC - High Q  | 1520.6              | 0.41                | 3724.3                      | 11.6                   | 9.3            |
| HPLC - C18 (Fracción Ea)  | 286.5               | 0.07                | 3907.4                      | 12.2                   | 1.7            |

### 8.7 Identificación de proteínas por espectrometría de masas (LC-MS).

En la Tabla 23 se muestran las proteínas de *I. fuscus* identificadas por espectrometría de masas. Las enzimas proteolíticas purificadas del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos fueron ligeramente homólogas a tripsina y complejo tripsina-inhibidor de triptasa (LDTI, “Leech derived tryptase inhibitor”). El LDTI es una pequeña proteína que se ha descrito como inhibidora de la estructura tetramérica de la triptasa al actuar de manera directa sobre el centro activo (Mühlhahn y col., 1994). La triptasa es una proteína perteneciente a la familia de las serín proteasas y constituye la mayor parte de las endopeptidasas almacenadas en los gránulos de secreción de los mastocitos. Los estudios *in vitro* sugieren que la enzima participa en el catabolismo de las proteínas de la matriz extracelular (Mühlhahn y col., 1994). El LDTI también inhibe a la tripsina y quimotripsina (Di Marco y col., 1997).

Los resultados obtenidos fueron muy similares a lo descrito por Sun y col. (2011) quienes purificaron una catepsina B del intestino de *S. japonicus*. Dichos autores concluyen que no hubo homología con catepsinas previamente descritas sugiriendo que puede tratarse de un nuevo miembro de la familia de cisteín proteasas lisosomales, debido a que en sus análisis obtuvieron homología con Cadena E, complejo tripsina-inhibidor de proteasa.

La cobertura de secuencia (“Protein sequence coverage”) para tripsina y complejo tripsina-inhibidor de triptasa de los extractos proteolíticos purificados estudiados fue de 7 a 8 % (Tabla 23), esto significa el porcentaje de la secuencia de la proteína representada por los péptidos identificados, por lo que podemos decir que la homología entre las proteínas es muy baja.

Tabla 24. Proteasas de *I. fuscus* identificadas por espectrometría de masas (LC-MS).

| Proteína identificada                           | Base de datos        | Taxonomía                        | Puntuación | Masa nominal / pI calculado | Cobertura de secuencia (%) |
|---|----------------------|----------------------------------|------------|-----------------------------|----------------------------|
| <b>Músculo ventral “Fracción IVc”</b>           |                      |                                  |            |                             |                            |
| Tripsina  | SwissProt            | <i>Sus scrofa</i>                | 60         | 24394 / 7.00                | 7                          |
| Cadena E, LDTI Complejo tripsina                | NCBIInr gi 3318722   | <i>Sus scrofa</i>                | 83         | 23457 / 8.26                | 8                          |
| <b>Tracto digestivo “Fracción 9a”</b>           |                      |                                  |            |                             |                            |
| Proteína hipotética LOTGIDRAFT_155067           | NCBIInr gi 556096927 | <i>Lottia gigantea</i> (Molusco) | 49         | 12191 / 5.24                | 12                         |
| Tripsina  | NCBIInr gi 136429    | <i>Sus scrofa</i>                | 82         | 24394 / 7.00                | 7                          |
| Cadena E, LDTI Complejo tripsina                | NCBIInr gi 3318722   | <i>Sus scrofa</i>                | 76         | 23457 / 8.26                | 8                          |
| Queratina, tipo II citoesquelética 2 epidérmica | SwissProt            | <i>Homo sapiens</i>              | 111        | 65393 / 8.07                | 5                          |
| <b>Tentáculos “Fracción Ia”</b>                 |                      |                                  |            |                             |                            |
| Tripsina  | NCBIInr gi 136429    | <i>Sus scrofa</i>                | 74         | 24394 / 7.00                | 7                          |
| Cadena E, LDTI Complejo tripsina                | NCBIInr gi 3318722   | <i>Sus scrofa</i>                | 76         | 23457 / 8.26                | 8                          |

Las puntuaciones obtenidas para tripsina y complejo tripsina-inhibidor de los extractos proteolíticos purificados estudiados fueron de 60 y 83 para músculo ventral, 76 y 111 para tracto digestivo y 74 y 76 para tentáculos, respectivamente (Tabla 23). La puntuación es una medida de la significancia estadística de una detección. La probabilidad de una identificación correcta del espectro con una secuencia en la base de datos aumenta con el número de señales de la proteína detectables. De acuerdo a los resultados reportados por el buscador MASCOT, los valores de puntuación obtenidos no indicaron identidad u homología significativa ( $p < 0.05$ ) de los péptidos.

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que las enzimas proteolíticas purificadas del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos de *I. fuscus* podrían ser nuevos miembros de las proteasas, debido a que no se encontró homología con serín, aspartil, cisteín o metalo proteasas descritas anteriormente en la literatura.

## 8.8 Hidrólisis de proteína y gelatina del músculo de *I. fuscus* con extracto proteolítico de los tentáculos de *I. fuscus* y determinación de actividad antioxidante.

Se utilizó el extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus* (obtenido como se describió en el apartado 7.6.3.2) para hidrolizar la proteína del músculo dorsal de *I. fuscus* utilizando diferentes relaciones enzima:sustrato (1:2, 1:1; 2:1) a 2 y 5 h de reacción, posteriormente se determinó la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC-FL) de cada hidrolizado, es decir, su capacidad antioxidante (Tabla 24). No hubo diferencia significativa entre los valores de ORAC de los hidrolizados obtenidos ( $p > 0.05$ ) (el análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey se reportan en el Anexo 16). Por lo tanto, se consideró incrementar el tiempo de hidrólisis a 24 h y utilizar sólo las proporciones enzima:sustrato, 1:1 y 2:1 para aumentar el grado de proteólisis y obtener mayor cantidad de péptidos con posible actividad antioxidante. Además, se propuso utilizar gelatina obtenida del músculo dorsal de *I. fuscus* con la hipótesis de facilitar la hidrólisis debido a que la gelatina es colágeno hidrolizado por calor, lo que permitiría obtener mayor cantidad de péptidos. Lo anterior con base en el párrafo siguiente.

El mecanismo de acción exacto de los péptidos como antioxidantes no se conoce claramente, pero se ha reportado que la potencia antioxidante se debe principalmente a la presencia de aminoácidos hidrofóbicos en el péptido (Mendis y col., 2005b). Por otro lado, los péptidos de gelatina contienen principalmente aminoácidos hidrofóbicos (Kim y col., 2010). Por lo tanto, ya que el pepino de mar posee cerca del 70% de colágeno de la proteína total, y dicho colágeno cuando es hidrolizado por calentamiento genera gelatina, se espera que los péptidos derivados de la gelatina del músculo dorsal de *I. fuscus* tengan mayores efectos antioxidantes.

Tabla 25. Actividad antioxidante de hidrolizados de proteína muscular de *I. fuscus*.

| Hidrolizado  | E:S=1:2,<br>2 h | E:S=1:2,<br>5 h | E:S=1:1,<br>2 h | E:S=1:1,<br>5 h | E:S=2:1,<br>2 h | E:S=2:1,<br>5 h |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| mg/mL*   | 3.46            | 3.47            | 3.50            | 3.47            | 3.27            | 3.30            |
| $\mu\text{mol}_{\text{Trolox}}/\text{mg}_{\text{proteína}}$ ** | $0.28 \pm 0.02$ | $0.29 \pm 0.04$ | $0.30 \pm 0.01$ | $0.29 \pm 0.01$ | $0.31 \pm 0.05$ | $0.38 \pm 0.04$ |

\*Valor medio (o media).

\*\* $\mu\text{mol}_{\text{Trolox}}/\text{mg}_{\text{proteína}}$  = Pendiente curva muestra / Pendiente curva estándar (Trolox).

Los hidrolizados de proteína del músculo dorsal de *I. fuscus* (ambas proporciones enzima:sustrato, 1:1 y 2:1) obtenidos a 24 h, tuvieron una capacidad antioxidante significativamente mayor ( $p < 0.001$ ) que los hidrolizados de gelatina estudiados (ambas proporciones enzima:sustrato, 1:1 y 2:1) (Tabla 25), por lo que se utilizó la proteína del músculo dorsal en los subsiguientes estudios (el análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey se reportan en el Anexo 17). Además, se seleccionó la relación enzima:sustrato 1:1 debido a que no hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre los valores de ORAC de las muestras de proteína del músculo estudiadas (enzima:sustrato 1:1 y 2:1). Por lo tanto, la gelatina se descartó como sustrato y se rechazó la hipótesis planteada anteriormente.

Tabla 26. Actividad antioxidante de hidrolizados de proteína y gelatina muscular de *I. fuscus* a 24 h.

| Hidrolizado  | Proteína, 1:1   | Proteína, 2:1   | Gelatina, 1:1   | Gelatina, 2:1   |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| mg/mL*   | 3.85            | 3.29            | 3.07            | 3.29            |
| $\mu\text{mol}_{\text{Trolox}}/\text{mg}_{\text{proteína}}$ ** | $0.72 \pm 0.07$ | $0.70 \pm 0.06$ | $0.61 \pm 0.04$ | $0.56 \pm 0.06$ |

\*Valor medio (o media).

\*\* $\mu\text{mol}_{\text{Trolox}}/\text{mg}_{\text{proteína}}$  = Pendiente curva muestra / Pendiente curva estándar (Trolox).

El hidrolizado de proteína muscular de *I. fuscus*, generado con una relación enzima:sustrato 1:1 con extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos, hidrolizado por 24 h, se ultrafiltró con membranas de 3 kDa. La fracción de péptidos con peso molecular menor a 3 kDa presentó el mayor valor de ORAC ( $p < 0.001$ ) con  $0.92 \mu\text{mol}_{\text{Trolox}}/\text{mg}_{\text{proteína}}$ , es decir, que tuvo mayor actividad antioxidante comparado con la fracción de péptidos con peso molecular mayor a 3 kDa (Tabla 26) (el análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey se reportan en el Anexo 18). En la Figura 46 se pueden observar las pendientes de las rectas resultantes (para el cálculo del valor de ORAC) de los valores de las áreas bajo las curvas netas (Net AUC) de las cinéticas de fluorescencia contra diferentes concentraciones de Trolox o de la fracción de péptidos con peso molecular menor a 3 kDa.

Tabla 27. Actividad antioxidante de péptidos de proteína muscular de *I. fuscus*.

| Hidrolizado E:S=1:1, 24 h  | Péptidos > 3kDa | Péptidos < 3kDa |
|--|-----------------|-----------------|
| mg/mL*   | 6.08            | 0.11            |
| $\mu\text{mol}_{\text{Trolox}}/\text{mg}_{\text{proteína}}^{*,**}$ | $0.49 \pm 0.01$ | $0.92 \pm 0.04$ |

\*Valor medio (o media).

\*\* $\mu\text{mol}_{\text{Trolox}}/\text{mg}_{\text{proteína}} = \text{Pendiente curva muestra} / \text{Pendiente curva estándar (Trolox)}$ .

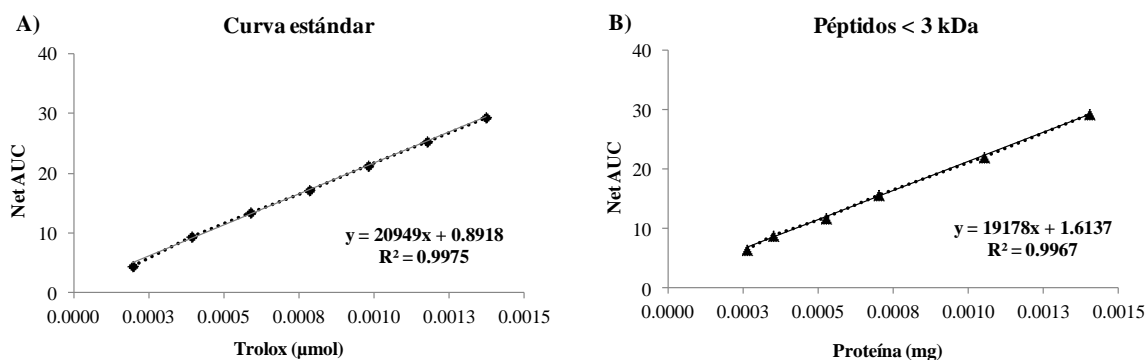


Figura 46. Actividad antioxidante de la fracción menor a 3 kDa del hidrolizado de proteína muscular de *I. fuscus* (E:S=1:1, a 24 h). A) Curva estándar de Trolox; B) Péptidos con peso molecular menor a 3 kDa. Gráfica representativa de tres experimentos independientes.

Nuestros resultados concordaron con lo reportado por Liu y col. (2009) quienes encontraron que los péptidos con peso molecular menor a 3 kDa (derivados de hidrolizados de proteínas del plasma de porcinos) tienen mayor capacidad reductora. Las propiedades de los péptidos antioxidantes están relacionadas con su composición de aminoácidos, estructura y peso molecular (Zhou y col., 2012). Generalmente, los de bajo peso molecular son altamente antioxidantes (Chen y col., 2007) aunque otros autores han encontrado que la actividad antioxidante de los hidrolizados está relacionada con el grado de hidrólisis (Gibbs y col., 2004; Kim y col., 2007).

### 8.8.1 Purificación de péptidos con actividad antioxidante (RP-HPLC).

Se purificaron 5 péptidos de la fracción de péptidos con peso molecular menor a 3 kDa del hidrolizado de proteína muscular de *I. fuscus* (relación 1:1 y generado a 24 h) mediante cromatografía preparativa por RP-HPLC (Figura 47) para determinar la capacidad antioxidante de cada péptido. El péptido “II” mostró el mayor valor de ORAC ( $p < 0.001$ ) con  $0.74 \mu\text{mol}_{\text{Trolox}}/\text{mg}_{\text{proteína}}$ , es decir, mayor actividad antioxidante, comparado con el valor de ORAC de los otros péptidos purificados (Tabla 27) (el análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey se reportan en el Anexo 19). En la Figura 48 se pueden observar las pendientes de las rectas resultantes (para el cálculo del valor de ORAC) de los valores de las áreas bajo las curvas netas (Net AUC) de las cinéticas de fluorescencia contra diferentes concentraciones de Trolox o de péptido “II”.

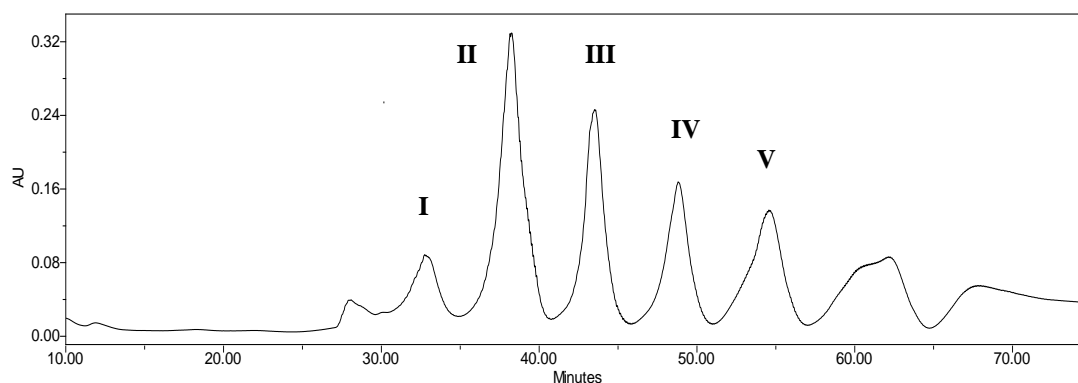


Figura 47. Perfil cromatográfico de la fracción menor a 3 kDa del hidrolizado de proteína muscular de *I. fuscus* (E:S=1:1, 24 h) para la purificación de los péptidos.

Tabla 28. Actividad antioxidante de los péptidos de la fracción menor a 3 kDa del hidrolizado de proteína muscular de *I. fuscus* (E:S=1:1, 24 h).

| Hidrolizado  | Péptido II      | Péptido III     | Péptido IV      | Péptido V       |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| mg/mL*   | 0.16            | 0.14            | 0.17            | 0.34            |
| $\mu\text{mol}_{\text{Trolox}}/\text{mg}_{\text{proteína}}^{**}$ | $0.74 \pm 0.07$ | $0.50 \pm 0.02$ | $0.18 \pm 0.02$ | $0.15 \pm 0.01$ |

\*Valor medio (o media).

\*\* $\mu\text{mol}_{\text{Trolox}}/\text{mg}_{\text{proteína}} = \text{Pendiente curva muestra} / \text{Pendiente curva estándar (Trolox)}$ .

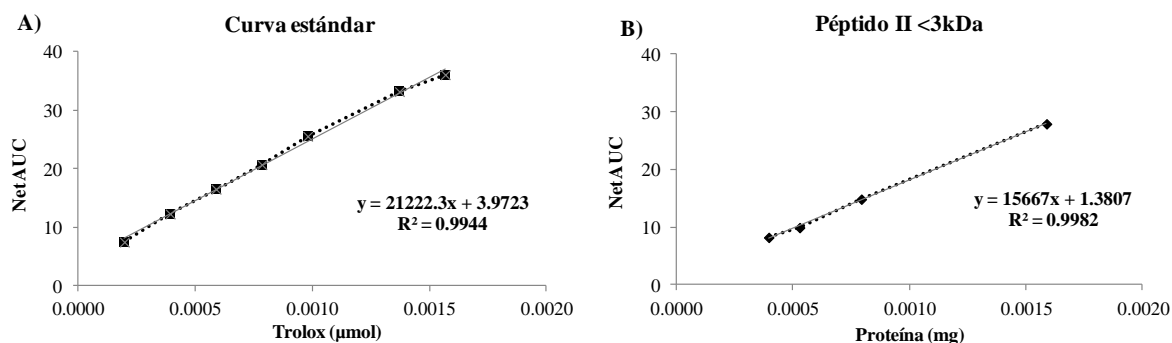


Figura 48. Actividad antioxidante del péptido “II” de la fracción menor a 3 kDa del hidrolizado de proteína muscular de *I. fuscus* (E:S=1:1, 24 h). A) Curva estándar de Trolox; B) Péptido “II” con peso molecular menor a 3 kDa. Gráfica representativa de tres experimentos independientes.

Nuestros resultados fueron similares a lo reportado por Zhen y col. (2012) quienes purificaron e identificaron tres oligopéptidos antioxidantes a partir de la autólisis del intestino del pepino de mar *S. japonicus*, sin embargo, las condiciones óptimas de obtención de hidrolizados de proteína (48.3°C, pH 4.4) fueron diferentes a las empleadas en el presente estudio (60°C, pH 6). Por otra parte, Osama y col. (2009) reportaron que los niveles de compuestos antioxidantes naturales en pepinos de mar pueden variar entre especies.

Aunque se ha reportado la presencia de péptidos antioxidantes en hidrolizados de colágeno de pepino de mar (Bordbar y col., 2011) hasta el momento no se ha reportado la obtención de péptidos antioxidantes a partir de proteína de *I. fuscus*. Nuestros resultados mostraron que los hidrolizados de proteína muscular de *I. fuscus* tuvieron aproximadamente la misma actividad antioxidante que el Trolox, el cual es un antioxidante sintético utilizado como control para la técnica de ORAC. Por otro lado, las proteasas de los tentáculos de *I. fuscus* tuvieron la capacidad de generar los péptidos antioxidantes analizados en el presente estudio. Lo anterior es importante ya que la especificidad de las proteasas puede afectar el tamaño, cantidad, composición y secuencia de aminoácidos de los péptidos generados, lo cual influye en la actividad biológica de los hidrolizados (Zhou y col., 2012). Además, las propiedades del hidrolizado tales como solubilidad, emulsificación, formación de espuma y gelificación, también dependen de la especificidad de la enzima y del grado de hidrólisis (Clemente, 2000).

Debido a que en el análisis electroforético de las enzimas proteolíticas de los tentáculos de *I. fuscus*, reportado en el apartado 8.5.4, se sugirió la posible presencia de cisteín proteasas, se piensa que los grupos tiol de dichas proteasas pudieron incrementar la actividad antioxidante, con base en que Qian y col. (2008) reportaron que el grupo tiol de las cisteínas tiene una acción antioxidante independiente debido a su interacción directa con los radicales. Los grupos tiol son expuestos al exterior, actuando como donadores de hidrógeno con el consecuente incremento de la capacidad antioxidante (Taylor y Richardson, 1980; Tong y col., 2000). Por otra parte, no se descarta el efecto de compuestos fenólicos con actividad antioxidante ya que las principales fuentes de alimento de los pepinos de mar son fitoplancton y partículas derivadas de la degradación de macroalgas, los cuales son materiales ricos en dichos compuestos (Osama y col., 2009).

Finalmente, el extracto proteolítico de los tentáculos y la proteína del músculo dorsal de *I. fuscus*, como subproductos, pueden ser aprovechados para la producción de péptidos con actividad antioxidante y podrían ser ingredientes potenciales para el desarrollo de alimentos funcionales, como alternativa a los antioxidantes sintéticos que causan riesgos a la salud. Sin embargo, es necesario llevar a cabo otros métodos *in vitro* e *in vivo* para determinar la actividad antioxidante de estos péptidos.



## 8.9 Hidrólisis de proteínas de huevo y leche con extracto proteolítico de los tentáculos de *I. fuscus*.

De ensayos preliminares de hidrólisis de ovoalbúmina, lisozima, caseína y  $\beta$ -lactoglobulina con el extracto parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus* (obtenido como se describió en el apartado 7.6.3.2), se seleccionaron ovoalbúmina y caseína debido a que fueron los sustratos que mostraron cualitativamente mayor hidrólisis (Figuras 49 y 50).

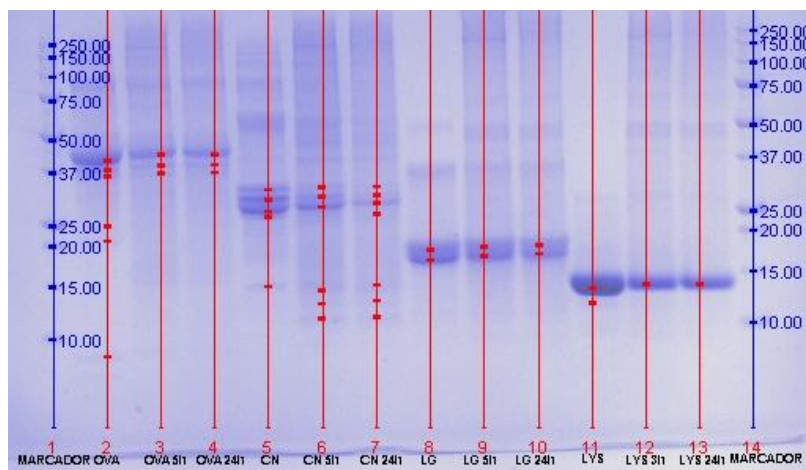


Figura 49. SDS-PAGE de hidrolizados de proteínas de huevo y leche generados por hidrólisis con extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus*. Líneas: 1, 14, Marcador molecular; 2, ovoalbúmina (OVA); 3, OVA hidrolizada 5 h; 4, OVA hidrolizada 24 h; 5, caseína (CN); 6, CN hidrolizada 5 h; 7, CN hidrolizada 24 h; 8, lactoglobulina (LG); 9, LG hidrolizada 5 h; 10, LG hidrolizada 24 h; 11, lisozima (LYS); 11, LYS hidrolizada 5 h; 13, LYS hidrolizada 24 h.

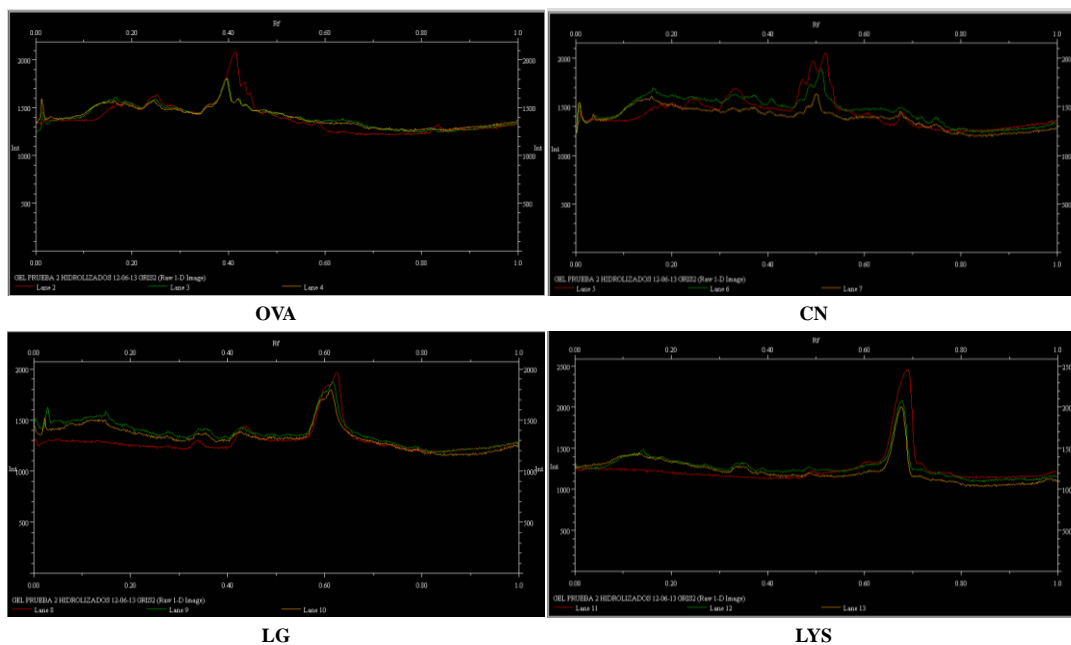


Figura 50. Densitogramas de perfiles electroforéticos de hidrolizados de proteínas de huevo y leche generados por hidrólisis con extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus*.

La  $\beta$ -lactoglobulina es muy resistente a la hidrólisis con pepsina (Mandalari y col., 2009b), asimismo la lisozima es resistente a la digestión con pepsina y proteinasa K (Polverino y col., 2002). Por lo tanto, lo anterior puede explicar por qué en nuestros resultados no se obtuvo mayor hidrólisis de  $\beta$ -lactoglobulina y lisozima, debido a que la pepsina es una aspartil proteasa y la proteinasa K una serín proteasa y que el extracto proteolítico de los tentáculos de *I. fuscus* con el que se llevó a cabo el ensayo de hidrólisis posee posiblemente aspartil y serín proteasas como lo discutido en el estudio del efecto de diferentes inhibidores de proteasas en el apartado 8.3.7.

### 8.9.1 Hidrólisis de ovoalbúmina.

Una de las principales razones por las cuales existe interés en la hidrólisis de proteínas de huevo es que parte de la población pediátrica padece alergia a dichas proteínas (Heine y col., 2006). La ovoalbúmina es una fosfoglicoproteína (45 kDa) mayoritaria en la clara de huevo (54%), considerada de los principales alérgenos (Mine y Yang, 2008). Por otro lado, la ovoalbúmina no tiene ninguna actividad biológica, sin embargo, por hidrólisis enzimática se liberan péptidos bioactivos de la estructura primaria de esta proteína. Se han reportado actividades biológicas de hidrolizados de ovoalbúmina como actividades antimicrobiana y antioxidante (Pellegrini y col., 2004; Davalós y col., 2004) y la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (Miguel y col., 2006; Hong y col., 2008).

La Figura 51 muestra el perfil electroforético de hidrolizados de ovoalbúmina producidos por la acción del extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus* a pH 6, a 60°C por 24 h y a 7°C por 24 y 48 h. Es de hacer notar que no se encontraron en la literatura reportes de producción de hidrolizados de ovoalbúmina a bajas temperaturas. Se obtuvieron péptidos de 30.6, 33.7 y 35.8 kDa a 60°C por 24 h, mientras que a 7°C se obtuvieron péptidos de 8.2, 10.7, 29.9 y 33.8 kDa con un tiempo de reacción de 48 h.

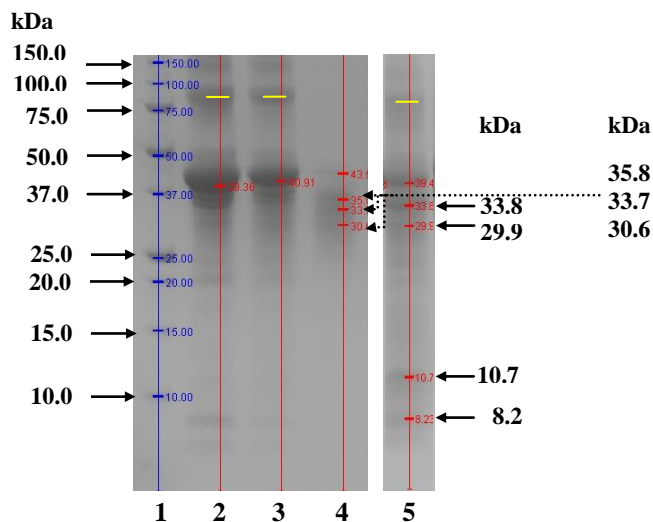


Figura 51. SDS-PAGE de hidrolizados de ovoalbúmina generados por hidrólisis con extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus*. Líneas: 1, Marcador molecular; 2, ovoalbúmina (OVA); 3, OVA hidrolizada 24 h a 7°C; 4, OVA hidrolizada 24 h a 60°C; 5, OVA hidrolizada 48 h a 7°C.

Los resultados fueron similares a lo reportado por Graszekiewicz y col. (2010) para la hidrólisis de proteínas de huevo con tripsina, quimotripsina y elastasa (serín proteasas). Estos autores describieron un alto grado de hidrólisis y la producción de péptidos de 9.5, 34 y 37 kDa. Asimismo, reportaron una proteína de 78 kDa correspondiente a ovotransferrina coincidiendo con lo obtenido en el análisis de SDS-PAGE (Figura 51, banda en color amarillo). Sin embargo, Miguel y col. (2006) informaron que la obtención de péptidos por hidrólisis de huevo crudo se deriva principalmente de la ovoalbúmina ya que la ovotransferrina es mucho más resistente a la proteólisis. La Figura 52 muestra el perfil cromatográfico (RP-HPLC) de los hidrolizados de ovoalbúmina y la diferencia de hidrofobicidad de los péptidos generados, donde se puede apreciar que la mayor hidrólisis se obtuvo a 60°C por 24 h y a 7°C por 48 h.

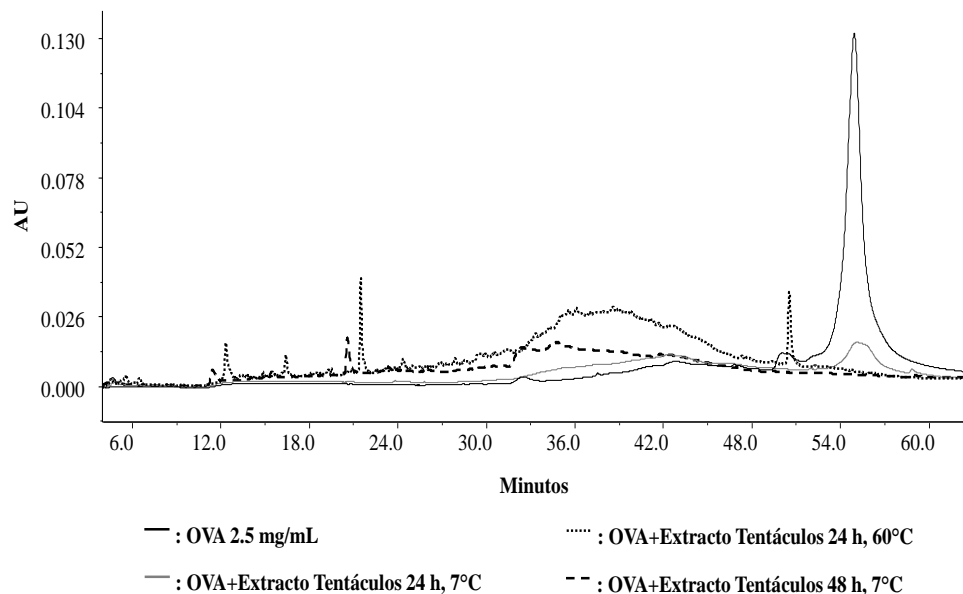


Figura 52. Perfil cromatográfico (RP-HPLC) de hidrolizados de ovoalbúmina generados por hidrólisis con extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus*.

### 8.9.2 Hidrólisis de caseína.

Más de 6 000 millones de personas en el mundo consumen leche de vaca y productos lácteos. La alergia a la leche de vaca es una de las más comunes alergias alimenticias principalmente en infantes (Monaci y col., 2006), con incidencia entre 2 a 8 % en todo el mundo (FAO, 2013; Fiocchi y col., 2010). Las principales proteínas encontradas en la leche son las caseínas que constituyen cerca del 80% de la proteína total (FAO, 2013), dichas proteínas se encuentran entre las principales proteínas de la leche que causan alergia (Benedé y col., 2014). La caseína existe en forma de micela como agregado de cuatro monómeros:  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseínas. Los alérgenos de la leche conservan su actividad biológica incluso después de ser sometidos a altas temperaturas (Fiocchi y col., 2010).

La Figura 53 muestra la hidrólisis de caseína con el extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus*, a pH 6, a 60°C por 24 h y a 7°C por 24 y 48 h. Hasta el momento no se han encontrado referencias en la literatura acerca de hidrólisis de caseína a bajas temperaturas utilizando enzimas proteolíticas.

Se hidrolizaron totalmente los cuatro monómeros de la caseína, generando péptidos entre 10 y 20 kDa y con peso molecular menor a 10 kDa a 60°C por 24 h, mientras que a 7°C por 24 h se produjeron péptidos de 10.6, 11.3 y 7.4 kDa, y a 7°C por 48 h péptidos de 7.2 kDa (Figura 53).

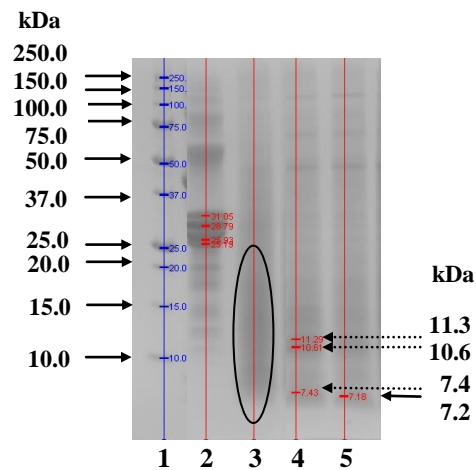


Figura 53. SDS-PAGE de hidrolizados de caseína generados por hidrólisis con extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus*. Líneas: 1, Marcador molecular; 2, caseína (CN); 3, CN hidrolizada 24 h a 60°C; 4, CN hidrolizada 24 h a 7°C; 5, CN hidrolizada 48 h a 7°C.

Las Figuras 54 y 55 muestran el perfil cromatográfico (RP-HPLC) de los hidrolizados de caseína. La detección mediante RP-HPLC de los péptidos generados fue mínima, posiblemente por baja concentración de los péptidos presentes, ya que en el estudio de SDS-PAGE sí se observaron los péptidos producidos.

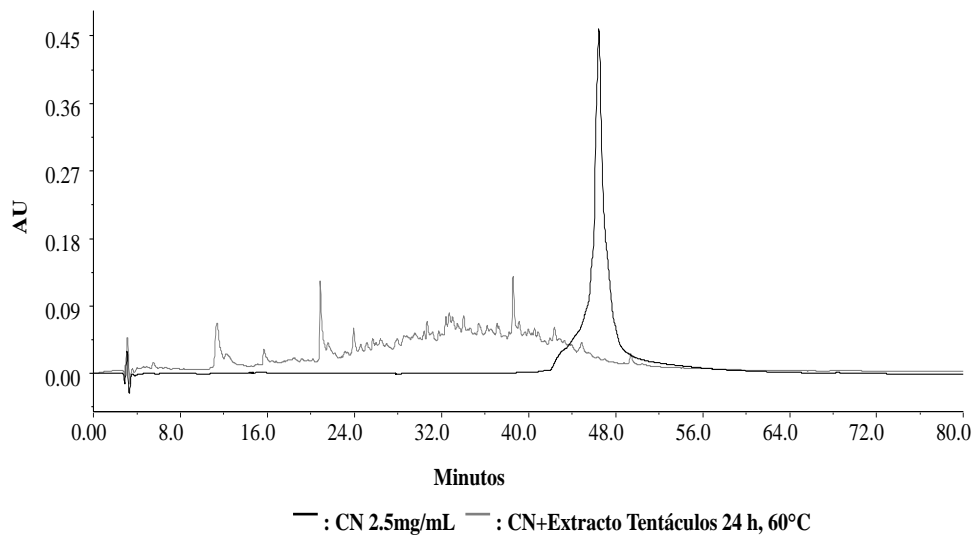


Figura 54. Perfil cromatográfico (RP-HPLC) de hidrolizados de caseína generados por hidrólisis con extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus*.

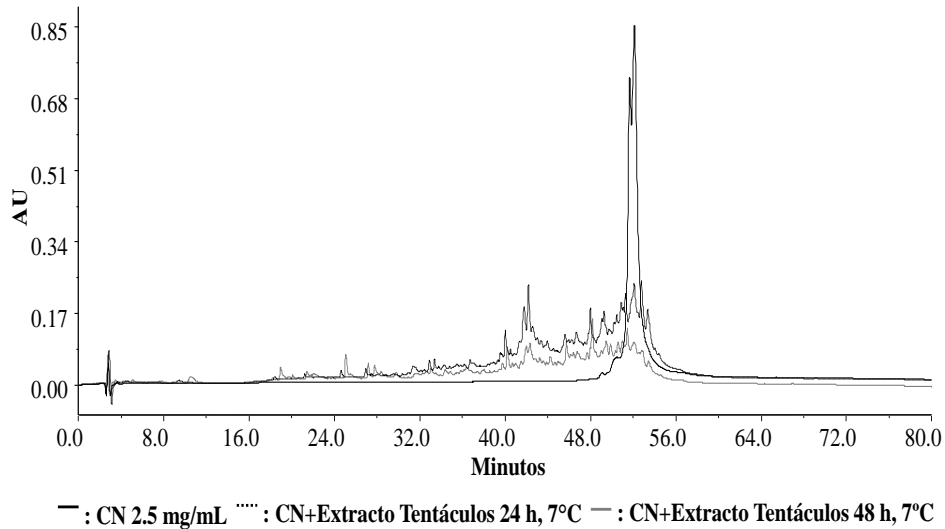


Figura 55. Perfil cromatográfico (RP-HPLC) de hidrolizados de caseína generados por hidrólisis con extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus*.

Sin embargo, en las Figuras 54 y 55 se puede observar que la mayor hidrólisis de caseína se obtuvo a 60°C por 24 h, seguida de la hidrólisis a 7°C por 48 h. Por otra parte, debido a la satisfactoria hidrólisis de caseína, se realizó un nuevo ensayo de hidrólisis pero utilizando el doble de la concentración del sustrato (enzima:sustrato, 1:4). La Figura 56 muestra que tres de los cuatro monómeros de la caseína se hidrolizaron parcialmente ( $\alpha$ s1-,  $\alpha$ s2-, y  $\beta$ - caseínas), mientras que la  $\kappa$ -caseína de aproximadamente 25.3 kDa se hidrolizó totalmente generando tres péptidos en mayor concentración con pesos moleculares estimados de 14.2, 17.6 y 19.5 kDa a 60 y 7 °C por 24 h, y un péptido en mayor concentración de 14.2 kDa a 7°C por 48 h. Cabe destacar que se observó mayor hidrólisis de caseína a 7°C por 48 h.

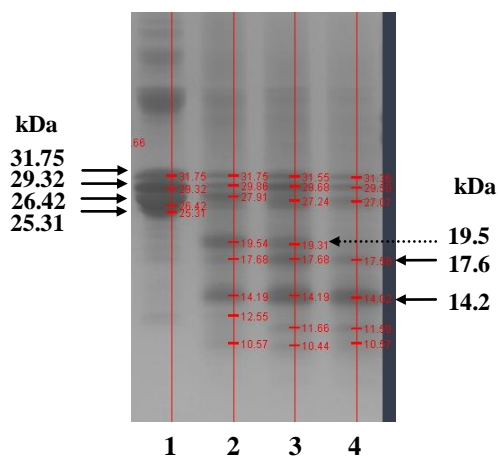


Figura 56. SDS-PAGE de hidrolizados de caseína generados por hidrólisis con extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus*. Líneas: 1, Caseína (CN); 2, CN hidrolizada 24 h a 7°C; 3, CN hidrolizada 24 h a 60°C; 4, CN hidrolizada 48 h a 7°C.

La Figura 57 muestra el perfil cromatográfico (RP-HPLC) de los hidrolizados de caseína generados, donde se obtuvo un comportamiento similar al presentado en el perfil electroforético (Figuras 56).

Asimismo, nuevamente no fue posible observar en los cromatogramas los péptidos generados en la hidrólisis de caseína. Sin embargo, la mayor hidrólisis de caseína se obtuvo a 60°C por 24 h, seguida de la hidrólisis a 7°C por 48 h.

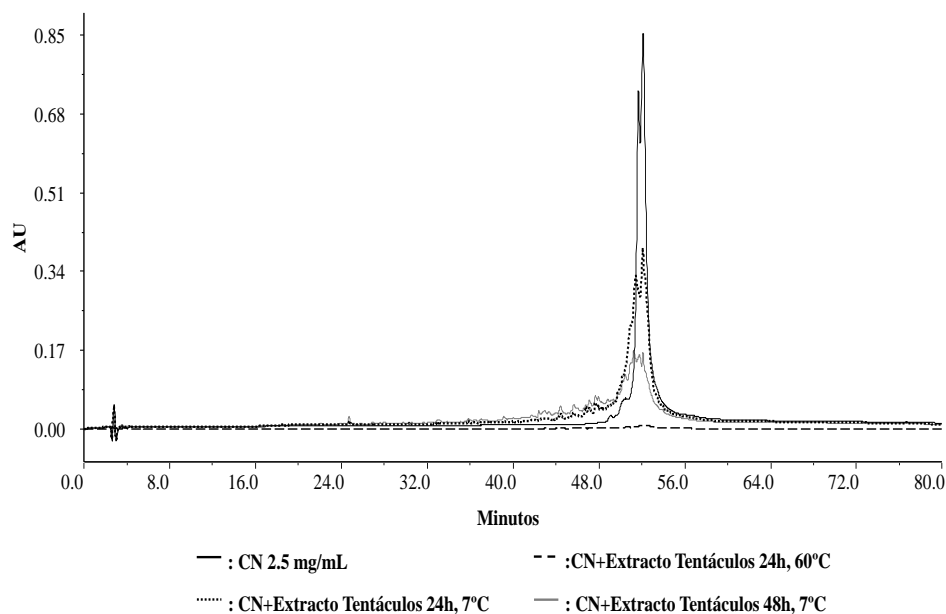


Figura 57. Perfil cromatográfico (RP-HPLC) de hidrolizados de caseína generados por hidrólisis con extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus*.

Nuestros resultados concordaron con los de Su y col. (2012) quienes reportaron hidrólisis pancreática de caseína bovina a pH 8 y 37°C durante 24 h en un reactor con agitación. Por su parte, Zhang y col. (2010) estudiaron la hidrólisis enzimática de caseína con papaína en un sistema de dos fases, n-propanol/NaCl, a 55°C y pH 5.6 por 5 h. Otros estudios (Mandalari y col., 2009a) se han realizado para evaluar la resistencia a la digestión con proteasas de alérgenos de la leche de vaca como  $\alpha$ -caseína, observando la susceptibilidad de esta proteína a la hidrólisis con pepsina y pancreatina. Las aspartil proteasas, como la pepsina actúan en secciones de 6 a 8 residuos (Mandalari y col., 2009a). Por lo tanto se sugiere que las posibles aspartil proteasas presentes en el extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos (apartado 8.3.7) son en parte las responsables de la proteólisis de la caseína, además de la participación de las cisteín y/o metalo proteasas presentes (apartado 8.5.4).

## CONCLUSIÓN GENERAL

Se purificaron parcialmente las proteasas presentes en los extractos proteolíticos del músculo ventral, del tracto digestivo y de los tentáculos de *Isostichopus fuscus*. Los resultados mostraron la presencia de proteasas ácidas y alcalinas en los extractos proteolíticos estudiados con estabilidad al pH, a la temperatura y al almacenamiento en refrigeración. También, dichas proteasas tuvieron actividad proteolítica a bajas temperaturas, donde esta última característica se destaca por las ventajas que se podrían generar al utilizarse en la industria, tales como, la reducción de los costos energéticos y la conservación de componentes termolábiles de interés.

Las proteasas de *I. fuscus* tuvieron mayor estabilidad a pH alcalino y mayor resistencia a la desnaturalización térmica que lo reportado para el pepino de mar *Stichopus japonicus*, sugiriendo que el comportamiento de las proteasas está ligado a las diferencias entre estas especies y a los hábitats en los que se desarrollan. Se ha reportado que factores como características fisiológicas, temperatura del medio y régimen nutricional, pueden utilizarse para explicar las variaciones de las actividades de proteasas digestivas entre organismos marinos.

En general, los resultados obtenidos, y con base en las referencias consultadas, sugirieron que las proteasas alcalinas identificadas fueron posibles metalo proteasas, mientras que las proteasas ácidas fueron posiblemente cisteín proteasas. Cabe destacar que no fue posible descartar la presencia de aspartil proteasas en los extractos proteolíticos. Además, al no haber encontrado homología por espectrometría de masas con serín, aspartil, cisteín o metalo proteasas previamente descritas, se sugirió que pueden tratarse de nuevos miembros del grupo de las proteasas.

Se obtuvo mayor actividad proteolítica con el extracto de los tentáculos de *I. fuscus* que con los extractos proteolíticos del músculo ventral y del tracto digestivo, sugiriendo un sistema alternativo de digestión ya que los pepinos de mar son capaces de expulsar sus órganos internos (como un método de defensa) y regenerarlos. Asimismo, los estudios utilizando las proteasas de los tentáculos de *I. fuscus* son una contribución importante ya que actualmente se desconoce la existencia de reportes sobre proteasas de los tentáculos de alguna especie de pepino de mar.

Por otra parte, fue posible utilizar el extracto proteolítico parcialmente purificado de los tentáculos de *I. fuscus* para hidrolizar proteínas del músculo dorsal de *I. fuscus*, de huevo y de leche.

En el mismo contexto, se identificó que los hidrolizados de proteína del músculo dorsal de *I. fuscus* poseen capacidad antioxidante y se purificaron los péptidos responsables de dicha actividad biológica. No se han reportado estudios sobre la presencia de péptidos antioxidantes en hidrolizados de proteína de *I. fuscus*, por lo que con este estudio se planteó una alternativa para el aprovechamiento del músculo de pepinos de mar autolizados o de baja calidad y la utilización de los extractos proteolíticos obtenidos en el presente trabajo.

Finalmente, la hidrólisis de ovoalbúmina y caseína a 7°C es una aportación novedosa debido a que se tienen escasos reportes acerca de su hidrólisis a bajas temperaturas y a las múltiples ventajas que se tendrían por llevar a cabo la hidrólisis enzimática a dicha temperatura.



## PERSPECTIVAS

El presente trabajo incentiva la producción y aprovechamiento del pepino de mar *I. fuscus*, tanto por su valor alimenticio como por su contenido de compuestos bioactivos. Asimismo, sustenta el desarrollo de métodos de purificación de proteasas de *I. fuscus*, robustos y finos.

En el mismo contexto, el posible desarrollo que se puede prever con este trabajo es la utilización de proteasas de *I. fuscus* en procesos biotecnológicos bajo diferentes condiciones de pH y temperatura, debido a las características particulares presentadas por de las enzimas proteolíticas de dicho organismo marino.

Por tanto, se sugiere la producción de hidrolizados proteína de *I. fuscus* por medio de hidrólisis enzimática con proteasas del mismo organismo o con proteasas comerciales, así como la purificación de los péptidos generados en función de su capacidad antioxidante (detectada de forma preliminar en este trabajo) o de otras posibles actividades biológicas, realizando los estudios correspondientes, *in vitro* e *in vivo*, por diferentes métodos o técnicas.

Finalmente, se sugiere la realización de estudios *in vitro* e *in vivo* para determinar la alergenicidad (por ejemplo: la técnica de ELISA) y la actividad biológica de los hidrolizados de proteínas de leche y huevo generados a bajas temperaturas con proteasas de *I. fuscus* debido a que no ha sido reportado anteriormente y a que parte de la población pediátrica padece alergia a dichas proteínas.

## PRODUCTIVIDAD ACADÉMICA

- Capítulo: Arisaí Hernández-Sámano, José Vicente Hernández-Ortiz, Angélica Ramos-Puebla, Edna Santos-Esperanza, Miriam Franco-Zavaleta, Raquel García-Barrientos, Isabel Guerrero-Legarreta, Xochitl Guzmán-García. 2010. Biomateriales de mares mexicanos. En: Avances en la investigación de la alimentación funcional. F.J. Fontecha (Ed.). pp. 43-50 Versión electrónica ISBN: 978-84-96023-89-5 I.
- Capítulo: García-Barrientos R., Hernández-Sámano A., Guzmán-García X., Armenta-López, Guerrero-Legarreta I. 2010. Nutraceutical from marine sources. In: Nutraceutical and functional foods: Conventional and Non conventional Sources. Jaramillo-Flores M.E. (Ed.). Studium Press, Lic. pp. 79-102.
- Cartel: “Partial purification and characterization of carp proteases (*Cyprinus sp.*)”. Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A.C. XXXII Encuentro Nacional y I Congreso Internacional AMIDIQ-2011. Quintana Roo, México. Mayo 3-6, 2011.
- Cartel: “Partial purification and characterization of sea cucumber proteases (*Isostichopus fuscus*)”. Institute of Food Technologists, Annual Meeting & Food Expo. IFT-11. New Orleans, Louisiana. Junio 11-14, 2011.
- Cartel: “Aislamiento y caracterización de proteasas de *Isostichopus fuscus*”. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Querétaro, México. Junio 19-24, 2011.
- Presentación oral y Cartel: “Effect of temperature on the proteases of sea cucumber *Isostichopus fuscus*”. Biotechnology summit-12. Mérida, Yucatán, México. Marzo 19-21, 2012.
- Cartel: “Efecto de la temperatura y diferentes inhibidores sobre las proteasas del tracto digestivo del pepino de mar, *Isostichopus fuscus*”. Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A.C. XXXIII Encuentro Nacional y II Congreso Internacional AMIDIQ-2012. San José del Cabo, BCS, México. Mayo 1-4, 2012.
- Impartición del curso-taller: “Tecnología de productos acuáticos”. Semana del centro de ciencias agropecuarias. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México. Noviembre 8-9, 2012.
- Cartel: “Estudio de enzimas proteolíticas del pepino de mar, *Isostichopus fuscus*”. Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A.C. XXXIV Encuentro Nacional y III Congreso Internacional AMIDIQ-2013. Mazatlán, Sinaloa, México. Mayo 7-10, 2013.
- Impartición del curso: “Proteínas y Enzimas”. Trimestre 13-P. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México D.F., México. Abril-Julio, 2013.
- Cartel: “Effect of temperature on proteolytic activity of sea cucumber, *Isostichopus fuscus*”. Institute of Food Technologists, Annual Meeting & Food Expo. IFT-13. Chicago, Illinois. Julio 13-16, 2013.

- Exposición: “Ingredientes bioactivos marinos en alimentación”. Curso Internacional “Avances en nutrición y alimentación funcional”. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. Octubre 14-16, 2013.
- Capítulo: Leticia Olivera-Castillo, Raquel García-Barrientos, Isabel Guerrero-Legarreta, Arisaí Hernández-Sámano, and Yasser Chim-Chi. 2013. Sea Cucumber as a Source of Bioactive Compounds: Current Research on *Isostichopus badionotus* and *Isostichopus fuscus* from Mexico. In: Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources. Blanca Hernández-Ledesma and Miguel Herrero (Eds.). ISBN: 978-1-118-41284-8. Wiley-Blackwell. pp. 329-338.
- Cartel: “Caracterización parcial de extracto proteolítico de pepino de mar y generación de hidrolizados de ovoalbúmina”. II Congreso Internacional de Investigación e Innovación en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Alimentos. Medellín, Colombia. Mayo 27-30, 2014.
- Cartel: “Aplicaciones biotecnológicas de proteasas del pepino de mar *Isostichopus fuscus*”. IV Simposium Perspectivas en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México D.F., México. Abril 13, 2015.
- Cartel: “Proteolytic activity of sea cucumber *Isostichopus fuscus*, collected at the Gulf of California”. Institute of Food Technologists, Annual Meeting & Food Expo. IFT-15. Chicago, Illinois. Julio 11-14, 2015.
- Publicación pendiente: Hernández-Sámano A.C., Guzmán-García X., García-Barrientos R., Guerrero-Legarreta I. 2015. Preliminary study of proteases of carp (*Cyprinus carpio*) from contaminated Zumpango lagoon in Mexico.
- Publicación pendiente: Hernández-Sámano A.C., Guzmán-García X., García-Barrientos R., Ascencio-Valle F., Sierra-Beltrán A., Guerrero-Legarreta I. 2015. Histological and enzymatic characterization of the digestive tract and tentacles from the sea cucumber *Isostichopus fuscus*.
- Publicación: Hernández-Sámano A.C., Guzmán-García X., García-Barrientos R., Ascencio-Valle F., Sierra-Beltrán A., Vallejo-Córdova B., González-Córdova A.F., Torres-Llanez M.J., Guerrero-Legarreta I. 2015. Extraction and characterization of sea cucumber *Isostichopus fuscus* proteases, collected at the Gulf of California, Mexico. Revista Mexicana de Ingeniería Química 14, 35-47.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abdel-Tawwab M., Abdelghany A.E., Ahmad M.H. 2007. Effect of feed supplementation on water properties, phytoplankton community structure and the growth of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), common carp, *Cyprinus carpio* (L.), and silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* (V.), Polycultured in fertilized earthen ponds. *Journal of Applied Aquaculture* 19, 1-24.
2. Agudo N.S. 2006. Sandfish hatchery techniques. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), The Secretariat of the Pacific Community (SPC) and The WorldFish Center, Nouméa, New Caledonia. ISBN 978-982-00-0175-6.
3. Aguilar-Ibarra A., Ramírez-Soberón G. 2002. Economic reasons, ecological actions and social consequences in the Mexican sea cucumber fishery. Secretariat of the Pacific Community (SPC) Beche-de-mer Information Bulletin 17, 33-36.
4. Althunibat O.Y., Ridzwan B.H., Taher M., Jamaludin M.D., Ikeda M.A., Zali B.I. 2009. *In vitro* antioxidant and antiproliferative activities of three Malaysian sea cucumber species. *European Journal of Scientific Research* 37, 376-387.
5. Anson M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology* 22, 79-89.
6. Aranishi F., Ogata H., Hara K., Osatomi K., Ishihara T. 1997. Purification and characterization of cathepsin L from hepatopancreas of carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology* 118, 531-537.
7. Asgeirsson B., Bjarnasson J.B. 1989. Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. *European Journal of Biochemistry* 180, 85-94.
8. Ashie I.N.A., Simpson B.K. 1996.  $\alpha$ 2-macroglobulin inhibition of endogenous proteases in fish muscle. *Journal of Food Science* 61(2), 357-361.
9. Association of Official Analytical Chemists - AOAC. 1975. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C. pp. 1094.
10. Bakus J.G. 1973. The biology and ecology of tropical holothurians. In: *Biology and Geology of Coral Reefs Vol. II*. Jones O.A., Edeans R. (Eds.). Academic Press, Nueva York. pp. 326-367.
11. Balti R., Hmidet N., Jellouli K., Nedjar-Arroume N., Guillochon D., Nasri M., 2010. Cathepsin D from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): purification and characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 10623-10630.
12. Barel C.D.N., Kramer P.G.N. 1977. A survey of the echinoderm associates of the north-east Atlantic area. *Zoologische Verhandelingen. Leiden, Bélgica*. pp. 156, 3-159.
13. Battaglene S.C. 1999. Culture of tropical sea cucumbers for stock restoration and enhancement. *NAGA, the ICLARM Quarterly* 22(4), 4-11.

14. Beauregard K.A., Truong N.T., Zhang H., Lin W., Beck G. 2001. The detection and isolation of a novel antimicrobial peptide from the echinoderm, *Cucumaria frondosa*. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 484, 55–62.
15. Becker P. 2002. La maladie de la tache blanche chez l’holothurie comestible commercialisée *Holothuria scabra*. Master thesis. Université de Mons-Hainaut, Belgique. pp. 55.
16. Becker P., Eeckhaut I., Ycaza R.H., Mercier A., Hamel J.F. 2009. Protozoan disease in larval culture of the edible sea cucumber *Isostichopus fuscus*. In: *Echinoderms*. Durham. Harris L.G. et al. (Eds.). *Proceedings of the 12th international echinoderm conference*, Durham, New Hampshire. pp. 571-573.
17. Benedé S., López-Expósito I., Giménez G., Grishina G., Bardina L., Sampson H.A., Molina E., López-Fandiño R. 2014. *In vitro* digestibility of bovine b-casein with simulated and human oral and gastrointestinal fluids. Identification and IgE-reactivity of the resultant peptides. *Food Chemistry* 143, 514-521.
18. Benjakul S., Leelapongwattana K., Visessanguan W. 2003. Comparative study on proteolysis of two species of bigeye snapper, *Priacanthus macracanthus* and *Priacanthus tayenus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83, 871-879.
19. Benjakul S., Morrissey M.T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(9), 3423–3430.
20. Benyon R.J., Bond J.S. 2001. *Proteolytic enzymes: A practical approach*. Practical Approach Series. Oxford University Press. Oxford, England. pp. 320.
21. Bernal G., Ripa P., Herguera J.C. 2001. Oceanographic and climatic variability in the lower Gulf of California: Links with the tropics and north. *International Journal of Marine Science* 27, 595-617.
22. Bing L., Jing-feng W., Jia F., Xiao-lin L., Hui L., Qin Z., Chang-hu X. 2010. Antifatigue effect of sea cucumber *Stichopus japonicus* in mice. *Food Science* 31, 244–247.
23. Blanco-Labra A., Martínez-Gallardo N.A., Sandoval-Cardoso L., Delano-Frier J., 1996. Purification and characterization of a digestive cathepsin D proteinase isolated from *Tribolium castaneum* larvae (Herbst). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26, 95-100.
24. Blunden G. 2001. Biologically active compounds from marine organisms. *Phytotherapy Research* 15, 89-94.
25. Bock S.A., Munoz-Furlong A., Sampson H.A. 2007. Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119, 8-1016.
26. Bordbar S., Anwar F., Saari N. 2011. High-Value Components and Bioactives from Sea Cucumbers for Functional Foods-A Review. *Marine Drugs* 9, 1761-1805.
27. Brewer P., Helbig N., Haard N.F. 1984. Atlantic cod pepsin. Characterization and use as a rennet substitute. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 17(1), 38-43.

28. Bruckner A.W. 2006. Sea cucumber population status, fisheries and trade in the United States. In: Proceedings of the CITES workshop on the conservation of sea cucumbers in the families *Holothuriidae* and *Stichopodidae*. Bruckner A.W. (Ed.). NOAA Technical Memorandum NMFS-OPR-34, USA. pp. 192-202.
29. Bruins M., Creusot N., Gruppen H., Janssen A., Boom R. 2009. Pressure-aided proteolysis of  $\beta$ -casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(12), 5529-5534.
30. Brusca R.C., Brusca G.J. 2003. *Invertebrados*. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid. pp. 1005.
31. Calva L. 2002. Hábitos alimenticios de algunos equinodermos. Parte 2: Erizos de mar y pepinos de mar. Laboratorio de Ecosistemas Costeros, Departamento de Hidrobiología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
32. Cameron J.L., Fankboner P.V. 1989. Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Parastichopus californicus* (Stimpson) (Echinodermata: Holothuroidea). II. Observations on the ecology of development, recruitment, and the juvenile life stage. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 127, 43-67.
33. Camire M.E. 2001. Extrusion and nutritional quality. In: Extrusion cooking, technologies and applications. Guy R. (Ed.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England. pp. 108-129.
34. Caso M.E. 1961. Los Equinodermos de México. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
35. Castillo-Yañez F.J., Pacheco-Aguilar R., García-Carreño F.L., Del Toro M.A.N. 2005. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 140, 91-98.
36. Chakrabarti I., Gani M.A., Chaki K.K., Sur R., Misra K.K. 1995. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* 112(1), 167-177.
37. Chaplin M.F., Bucke C. 1990. *Enzyme Technology*. Cambridge (UK): Cambridge University Press. Cambridge, England. pp. 40-79.
38. Chen C.S., Yan T.R., Chen H.Y. 1978. Purification and properties of trypsin-like enzymes and a carboxypeptidase A from *Euphasia superba*. *Journal of Food Biochemistry* 21, 349-366.
39. Chen G.T., Zhao L., Zhao L.Y., Cong T., Bao S.F. 2007. *In vitro* study on antioxidant activities of peanut protein hydrolysate. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 357-362.
40. Chen H.H., Yu P., Li J.R. 2010. The preparation of collagen polypeptide with free radical scavenging ability purified from *Acaudina molpadioides* Semper. *Chinese Institute of Food Science and Technology* 10, 19-25.
41. Chen J. 2003. Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China. Secretariat of the Pacific Community (SPC) Beche-de-mer Information Bulletin 18, 18-23.

42. Chen S., Xue C., Yin L., Tang Q., Yu G., Chai W. 2011. Comparison of structures and anticoagulant activities of fucosylated chondroitin sulfates from different sea cucumbers. *Carbohydrate Polymers* 83, 688-696.
43. Chenghui L., Beiwei Z., Xiuping D., Liguó C. 2007. Study on the separation and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from sea cucumber. *Food and Fermentation Industries* 33(9), 50-53.
44. Choo P.S. 2008. Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in Asia. In: *Sea cucumbers. A global review of fisheries and trade*. Toral-Granda V., Lovatelli A., Vasconcellos M. (Eds.). FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 516. Rome, Italy. pp. 81-118.
45. Clemente A. 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology* 11, 254-262.
46. Collin P.D. 2004. Peptides having anti-cancer and anti-inflammatory activity. United State Patent. 6, 767, 890, 27. 32.
47. Conand C.L. 1990. The Fishery of Pacific Island Countries. Part 2. Holothurians. FAO Fisheries Technical Paper No. 272. 2, 1-143.
48. Coulon P., Jangoux M. 1993. Feeding rate and sediment reworking by the holothuroid *Holoturia tubulosa* (Echinodermata) in a Mediterranean Sea grass bed off Ischia Island, Italy. *Marine Ecology Progress Series* 92, 201-204.
49. Cui F., Xue C., Li Z., Zhang Y., Dong P., Fu X., Gao X. 2007. Characterization and subunit composition of collagen from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Food Chemistry* 100(3), 1120-1125.
50. Dai Z. 1990. A review on autolysis in fish. *Journal Zhejiang College of Fisheries* 9, 56–51.
51. Daniel R.M., Toogood H.S., Bergquist P.L. 1995. Thermostable proteases. *Biotechnology and Genetic Engineering* 13, 50-100.
52. Dar M.A., Ahmad H.O. 2006. The feeding selectivity and ecological role of shallow water holothurians in the Red Sea. Secretariat of the Pacific Community (SPC) Beche-de-mer Information Bulletin 24, 11–21.
53. Davalõs A., Miguel M., Bartolome B., López-Fandiño R. 2004. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection* 67, 1939-1944.
54. De Paco C., Hurtado M., McFarland C., Martínez P., Reck G., Richmond R. 1993. Evaluación de la pesquería de pepinos de mar en las islas Galápagos - Ecuador. Informe para la Unión Mundial para la Naturaleza (UICN) como resultado de la Misión realizada a solicitud de la Fundación Charles Darwin para las Islas Galápagos.
55. Deichmann E. 1958. The Holothuroidea collected by The Velero II and IV during the years 1932 to 1954, Part II. Aspidochirota. *Allan Hancock Pacific Expeditions* 11(2), 253-348.



56. DeMoor S., Waite J.H., Jangoux M., Flammang P. 2003. Characterization of the adhesive from cuvierian tubules of the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothuroidea). *Marine Biotechnology* 5, 45-57.
57. Diario Oficial de la Federación. 2004. Carta Nacional Pesquera. Lunes 15 de Marzo de 2004. SAGARPA, CONAPESCA.
58. Diaz O., Gouldsworthy A., Leaver J. 1996. Identification of peptides released from casein micelles by limited trypsinolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(9), 2517-2522.
59. Dolmatov I.Y., Mashanov V.S. 2009. Regeneration in Holothurians. *Russian Journal of Developmental Biology* 40(2), 121-123.
60. Dublán O., Salazar A., Cruz-Camarillo R., Guerrero-Legarreta I., Ponce E. 2006. Effect of refrigerated storage on proteolytic activity, physicochemical and microstructural properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle. *Journal of Muscle Foods* 17, 291-310.
61. Duy N.D.Q. 2010. Seed production of sandfish (*Holothuria scabra*) in Vietnam. *Aquaculture Extension Manual* 48. Southeast Asian Fisheries Development Center, Iloilo, Filipinas.
62. Faid A., Zouiten A., Elmarrakchi A., Achkari-Begdouri A. 1997. Biotransformation of fish waste into a stable feed ingredient. *Food Chemistry* 60, 13-18.
63. Fajardo-León M.C., Michel-Guerrero E., Singh-Cabanillas J., Vélez-Barajas J.A., Massó-Rojas A. 1995. Estructura poblacional y ciclo reproductor del pepino de mar *Isostichopus fuscus* en Santa Rosalia, B.C.S., México. *Ciencia Pesquera* 11, 45-53.
64. Fajardo-León M.C., Vélez-Barajas A. 1996. Pesquería del pepino de mar. En: Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. Casas-Valdez M.C., Ponce-Diaz Y.G. (Eds.). SEMARNAP/CICIMAR. La Paz, México. pp. 151-165.
65. Farouk A.E.A., Ghouse F.A.H., Ridzwan B.H. 2007. New bacterial species isolated from Malaysian sea cucumbers with optimized secreted antibacterial activity. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 3, 60-65.
66. Feindel S. 2002. Status of the Maine sea cucumber (*Cucumaria frondosa*) fishery. Report to the standing legislative committee on marine resources. Maine Department of Marine Resources. USA. pp. 35.
67. Fennema O. 1982. Behaviour of proteins at low temperatures. In: *Food Protein Deterioration* Cherry J.P. (Ed.). American Chemical Society. Washington, USA. pp. 109-133.
68. Fialho E., Nakamura A., Juliano L., Masuda H., Silva Neto M.A.C. 2005. Cathepsin D-mediated yolk protein degradation is blocked by acid phosphatase inhibitors. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 436, 246-253.
69. Fiocchi A., Brozek J., Schünemann H., Bahna S.L., Von Berg A., Beyer K., Bozzola M., Bradsher J., Compalati E., Ebisawa M., Guzmán M.A., Li H., Heine R.G., Keith P., Lack G., Landi M., Martelli A., Rancé F., Sampson H., Stein A., Terracciano L., Vieths S. 2010. World Allergy Organization (WAO). Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) guidelines. *Pediatric Allergy and Immunology* 21(21), 1-125.

70. Fish J.D. 1967. The digestive system of the holothurian *Cucumaria elongata*. II. Distribution of the digestive enzymes. *Biological Bulletin* 132, 337-353.
71. Foegeding E.A., Lanier T.C., Hultion H.O. 2000. Características de los tejidos musculares comestibles. En: *Química de los Alimentos*. Fennema O.R. (Ed.). Acirbia, S.A. Zaragoza, España.
72. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2004. Advances in Sea Cucumber aquaculture and management. Lovatelli A., Conand C., Purcell S., Uthicke S., Hamel J.F., Mercier A. (Eds.). *FAO Fisheries Technical Paper No. 463*. Rome, Italy. pp. 425.
73. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2012. Commercially important sea cucumbers of the world. Purcell S.W., Samyn Y., Conand C. (Eds.). *FAO Species Catalogue for Fishery Purposes No. 6*. Rome, Italy. pp. 96-97.
74. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2010. Managing sea cucumber fisheries with an ecosystem approach. Purcell S.W. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 520*. Rome, Italy. pp. 157.
75. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2013. Milk and dairy products in human nutrition. Muehlhoff E., Bennett A., McMahon D. (Eds.). *FAO*. Rome, Italy. pp. 161-162.
76. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2008. Sea cucumbers. A global review of fisheries and trade. Toral-Granda V., Lovatelli A., Vasconcellos M. (Eds.). *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 516*. Rome, Italy. pp. 317.
77. Fredalina B.D., Ridzwan B.H., Zainal-Abidin A.A., Kaswandi M.A., Zaiton H., Zali I., Kittakoop P., Jais A.M. 1999. Fatty acid compositions in local sea cucumber *Stichopus chloronotus* for wound healing. *General Pharmacology* 33, 337-340.
78. Frokjaer S. 1994. Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Technology* 48, 86-88.
79. Fu X., Cui Z. 2007. Anti-fatigue effects of lower polypeptide from sea cucumber on mice. *Food Science and Technology* 4, 259-261.
80. Fu X., Xue C., Miao B., Li Z., Gao X., Hirata T. 2006. Distribution and seasonal activity variation of proteases in digestive tract of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Fisheries Science* 72, 1130-1132.
81. Fu X., Xue C., Miao B., Li Z., Gao X., Yang W. 2005. Characterization of proteases from the digestive tract of sea cucumber (*Stichopus japonicus*): High alkaline protease activity. *Aquaculture* 246(1-4), 321-329.
82. Fu X., Xue C., Miao B., Li Z., Yang W., Wang D. 2005. Study of a highly alkaline protease extracted from digestive tract of sea cucumber (*Stichopus japonicus*). *Food Research International* 38(3), 323-329.
83. Furne M., Hidalgo M.C., López A., García-Gallego M., Morales A.E., Domezain A., Domezaine J., Sanz A. 2005. Digestive enzyme activities in *Adriatic sturgeon*, *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture* 250, 391-398.

84. Gao F., Yang H., Xu Q., Wang F., Liu G. 2009. Effect of water temperature on digestive enzyme activity and gut mass in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka), with special reference to aestivation. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 27(4), 714-722.
85. García-Arrarás J.E., Greenberg M.J. 2001. Visceral regeneration in holothurians. *Microscopy Research and Technique* 55, 438-451.
86. García-Carreño F., Haard N.F. 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *Journal of Food Biochemistry* 17 (2), 97-113.
87. García-Carreño F.L. 1992. Protease inhibition in theory and practice. *Biotechnology Education* 3, 145-150.
88. García-Carreño F.L., Dimes L., Haard N.F. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry* 214(1), 65-69.
89. Gentle M.T. 1979. The fisheries biology of beche-de-mer. *South Pacific Bulletin*, Fourth quarter 25-27, 50.
90. Gibbs B.F., Zougman A., Masse R., Mulligan C. 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research International* 37, 123-131.
91. Godfrey T., Reichelt J. 1983. *Industrial Enzymology*. The Nature Press. Surrey, Gran Bretaña. pp. 582.
92. Graszkiwicz A., Żelazko M., Trziszka T. 2010. Application of pancreatic enzymes in hydrolysis of egg-white proteins. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 60(1), 57-61.
93. Guerard F., Decourcelle N., Sabourin C., Floch-laizet C., Le-Grel L., Le-Floch P., Gourlay F., Le-Delezir R., Jaouen P., Bourseau P. 2011. Recent developments of marine ingredients for food and nutraceutical applications: A review. *Journal des Sciences Halieutiques Aquatiques* 2, 21-27.
94. Guillaume J., Choubert G. 1999. Physiologie digestive et digestibilité des nutriments chez les poissons. En: *Nutrition et Alimentation des Poissons et Crustacés*. Guillaume J., Kaushik S., Bergot P., Métailler R. (Eds.). INRA-IFREMER. Versailles, Francia. 489.
95. Guizani N., Rolle R.S., Marshall M.R., Wei C.I. 1991. Isolation and characterization of a trypsin from the pyloric ceca of mullet (*Mugil cephalus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 98, 517-521.
96. Haard N.F. 1992. A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 1, 17-35.
97. Haard N.F., Simpson B.K. 1994. Proteases from aquatic organisms and their uses in the seafood industry. In: *Fish Process. Biotechnological Applications*. Martin A.M. (Ed.). Chapman & Hall. London, England. pp. 133-154.

98. Haard N.F., Simpson B.K. 2000. Seafood enzymes: utilization and influence on postharvest seafood quality. Marcel Dekker Inc. New York, USA. pp. 191-207.
99. Hair C.A., Pickering T.D., Mills D.J. 2012. Asia-Pacific tropical sea cucumber aquaculture. Proceedings of an International Symposium held in Noumea, New Caledonia, 15-17 February 2011. ACIAR Proceedings No. 136. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia. pp. 209.
100. Hamaguchi P., Geirsdottir M., Vrac A., Kristinsson H.G., Sveinsdottir H., Fridjonsson O.H., Hreggvidsson G.O. 2010. *In vitro* antioxidant and antihypertensive properties of Icelandic sea cucumber (*Cucumaria frondosa*). IFT 10<sup>th</sup> Annual Meeting & Food Expo. Chicago, USA. Cartel 282-04.
101. Hamel J.F., Ycaza R., Mercier A. 2003. Larval development and juvenile growth of the Galapagos sea cucumber *Isostichopus fuscus*. Secretariat of the Pacific Community (SPC) Beche-de-mer Information Bulletin 18, 3-8.
102. Hatakeyama H., Matsuo N., Shiba K., Nishinohara S., Yamasaki N., Sugawara H., Aoyagi H., 2002. Amino acid sequence and carbohydrate-binding analysis of the N-acetyl-D-galactosamine-specific C-type lectin, CEL-I, from the holothuroidea *Cucumaria echinata*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 66, 157-163.
103. Haug T., Kjuul A.K., Styrvoid O.B., Sandsdalen E., Olsen Ø.M., Stensvåg K. 2002. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea) and *Asterias rubens* (Asteroidea). Journal of Invertebrate Pathology 8, 94-102.
104. Heine R.G., Laske N., Hill D. 2006. The diagnosis and management of egg allergy. Current Allergy and Asthma Reports 6, 145-152.
105. Hernández-Ledesma B., Dávalos A., Bartolomé B., Amigo L. 2005. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 588-593.
106. Hernández-Martínez R., Gutiérrez-Sánchez G., Bergmann C.W., Loera-Corral O., Rojo-Domínguez A., Huerta-Ochoa S. 2011. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. Process Biochemistry 46, 2001-2006.
107. Hernández-Sámano Arisaí C. 2010. Identificación y caracterización de proteasas del pepino de mar. Tesis de Maestría. Posgrado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México D.F., México.
108. Herrero-Pérezrul M.D. 1994. Comparative study of reproduction of *Isostichopus fuscus* Ludwig, 1875 and *Neothyone gibbosa* Deichman, 1941 (Echinodermata: Holothuroidea) at La Paz Bay. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN-CICIMAR, México. pp. 88.
109. Herrero-Pérezrul M.D., Chávez-Ortiz E.A. 2005. Optimum fishing strategies of *Isostichopus fuscus* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Southern Gulf of California, Mexico. Revista de Biología Tropical 53(3), 357-366.

110. Herrero-Pérezrul M.D., Reyes-Bonilla H., García-Domínguez F., Cintra-Buenrostro C.E. 1999. Reproduction and growth of *Isostichopus fuscus* (Echinodermata:Holothuroidea) in the Southern Gulf of California, Mexico. *Marine Biology* 135, 521-532.
111. Hidalgo M.C., Urea E., Sanz A., 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170, 267-283.
112. Hoffmann D.R. 1983. Immunochemical identification of the allergens in egg white. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 71, 481-486.
113. Holen E., Elsayed S. 1990. Characterization of four major allergens of hen egg-white by IEF/SDS-PAGE combined with electrophoretic transfer and IgE-immunoautoradiography. *International Archives of Allergy and Immunology* 91(2), 136-41.
114. Hong F., Ming L., Yi S., Zhanxia L., Yongquan W., Chi L. 2008. Review, The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs? *Peptides* 29, 1062-1071.
115. Hooker Y., Solís-Marín F.A., Llellish M. 2005. Equinodermos de las Islas Lobos de Afuera (Lambayeque, Perú). *Revista Peruana de Biología* 12(1), 77-82.
116. Howaida R. Gabr Ashraf I. Ahmed, Mahmoud H., Hanafy Andrew J., Lawrence Mohammed I. Ahmed, Salah G. El-Etreby. 2004. Mariculture of sea cucumber in the Red Sea - the Egyptian experience. In: *Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management*. Lovatelli A., Conand C., Purcell S., Uthicke S., Hamel J.F., Mercier A. (Eds.). FAO Fisheries Technical Paper No. 463. Rome, Italy. pp. 373-384.
117. Huiling S., Mengqing L., Jingping Y., Bijuan C. 2004. Nutrient requirements and growth of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. In: *Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management*. Lovatelli A., Conand C., Purcell S., Uthicke S., Hamel J.F., Mercier A. (Eds.). FAO Fisheries Technical Paper No. 463. Rome, Italy. pp. 327-331.
118. Humphreys W.F., Lützen J. 1972. Studies on parasitic gastropods from echinoderms. In: *On the structure and biology of the parasitic gastropod Megadenus cantharelloides* n. sp., with comparisons on *Paramegadenus* n. g. Kongelige Danske Videnskabernes Selskab *Biology* 19(1), 1-27.
119. Ito N., Hirose M., Fukushima S., Tsuda H., Shirai T., Tatematsu M. 1986. Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology* 24, 82-1071.
120. Jangoux M. 1990. Diseases of Echinodermata. In: *Disease of Marine Animals*, Vol. 3. Kinne O. (Ed.). Biologische Anstalt Helgoland. Hamburg, Germany. pp. 439-567.
121. Jawahar A.T., Nagarajan J., Shanmugam S.A. 2002. Antimicrobial substances of potential biomedical importance from holothurian species. *Indian Journal of Marine Sciences* 31, 161-164.
122. Jiang S.T., Moody M.W., Chen H.C. 1991. Purification and characterization of proteases from digestive tract of grass shrimp (*Penaeus monodon*). *Journal of Food Science* 56, 322-326.

123. Jiabin C. 2004. Present status and prospects of sea cucumber industry in China. In: Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management. Lovatelli A., Conand C., Purcell S., Uthicke S., Hamel J.F., Mercier A. (Eds.). FAO Fisheries Technical Paper No. 463. Rome, Italy. pp. 38-25.
124. Jun S.Y., Park P.J., Jung W.K., Kim S.K. 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. European Food Research and Technology 219, 20-26.
125. Jung W.K., Qian Z.J., Lee S.H., Choi S.Y., Sung N.J., Byun H.G., Kim S.K. 2007. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide isolated from in vitro gastrointestinal digests of *Mytilus coruscus*. Journal of Medicinal Food 10, 197-202.
126. Jung W.K., Rajapakse N., Kim S.K. 2005. Antioxidative activity of a low molecular weight peptide derived from the sauce of fermented blue mussel, *Mytilus edulis*. European Food Research and Technology 220, 535-539.
127. Kalinin V.I., Aminin D.L., Avilov S.A., Silchenko A.S., Stonik V.A. 2008. Triterpene glycosides from sea cucumbers (Holothurioidea, Echinodermata). Biological activities and functions. Studies in Natural Products Chemistry 35, 135-196.
128. Ke P.J., Smith Lall B., Hirtle R.W., Kramer D.E. 1987. Technical studies on resource utilization of Atlantic sea cucumber (*Cucumaria frondosa*). Canadian Institute of Food Science and Technology Journal 20, 4-8.
129. Kerstitch A. 1989. Sea of Cortez marine invertebrates. A guide for the Pacific coast Mexico to Ecuador. Sea Challengers. Monterey, CA, USA. pp. 108-109.
130. Khantaphant S., Benjakul S. 2008. Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 151, 410-419.
131. Kim S.B., Seo I.S., Khan M.A., Ki K.S., Nam M.S., Kim H.S. 2007. Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. International Dairy Journal 17, 625-631.
132. Kim S.K., Byun H.G., Lee E.H. 1994. Optimum extraction conditions of gelatin from fish skins and its physical properties. Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry 5, 547-559.
133. Kim S.K., Choi Y.R., Park P.J., Choi J.H., Moon S.H. 2000. Screening of biofunctional peptides from cod processing wastes. Korean Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology 33, 198-204.
134. Kim S.K., Kim Y.T., Byun H.G., Nam K.S., Joo D.S., Shahidi F. 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of *Alaska pollack* skin. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 1984-1989.
135. Kim S.K., Mendis E. 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts-A review. Food Research International 39, 383-393.



136. Kim S.K., Wijesekara I. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods* 2, 1-9.
137. Kitts D.D. 1994. Bioactive substances in food: Identification and potential uses. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 72, 423-434.
138. Kitts D.D., Weiler K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design* 9, 1309-1323.
139. Klomklao S. 2008. Digestive proteinases from marine organisms and their applications. Review Article. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 30(1), 37-46.
140. Klomklao S., Benjakul S., Visessanguan W., Kishimura H., Simpson B.K. 2006. Proteolytic degradation of sardine (*Sardinella gibbosa*) proteins by trypsin from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) spleen. *Food Chemistry* 98, 14-22.
141. Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., Simpson, B.K. 2007. Trypsin from the pyloric caeca of bluefish (*Pomatomus saltatrix*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 148, 382-389.
142. Koob T.J., Koob Emunds M.M., Trotter J.A. 1999. Cell-derived stiffening and plasticizing factors in sea cucumber (*Cucumaria frondosa*) dermis. *Journal of Experimental Biology* 202(17), 2291-301.
143. Korhonen H., Pihlanto A. 2003. Food-derived bioactive peptides opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design* 9, 308-1297.
144. Kristjansson M.M., Nielson H.H. 1992. Purification and characterization of two chymotrypsin-like proteases from the pyloric ceca of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 101, 247-253.
145. Kumar R., Chaturvedi A.K., Shuklab P.K., Lakshmia V. 2007. Antifungal activity in triterpene glycosides from the sea cucumber *Actinopyga lecanora*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 17, 4387-4391.
146. Kunitz M. 1946. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. *Journal of General Physiology* 30, 291-310.
147. Kurbanoglu E.B., Algur O.F. 2002. The influence of ram horn hydrolyzate on the crop yield of the mushroom *Agaricus bisporus*. *Scientia Horticulturae* 94, 351-357.
148. Kurtovic I., Marshall S.N., Simpson B.K. 2006. Isolation and characterization of a trypsin fraction from the pyloric ceca of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 143, 432-440.
149. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
150. Lahl W.J., Braun S.D. 1994. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technology* 58(10), 68.



151. Lawrence A.J., Afifi R., Ahmed M., Khalifa S., Paget T. 2009. Bioactivity as an options value of sea cucumbers in the Egyptian Red Sea. *Conservation Biology* 24, 217–225.
152. Lawrence J.M. 1982. Digestion. In: Echinoderm nutrition. Lawrence J.M., Jangoux M. (Eds.). Balkema, Rotterdam, Germany. pp. 283-316.
153. Le Moullac G., Klein B., Sellos D., VanWormhoudt A. 1997. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and  $\alpha$ -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 208, 107-125.
154. Lee M.H., Kim Y.K., Moon H.S., Kim K.D., Kim G.G., Cho H.A., Yoon N.Y., Sim K.B., Park H.Y., Lee D.S., Lim C.W., Yoon H.D., Han S.K. 2012. Comparison on Proximate Composition and Nutritional Profile of Red and Black Sea Cucumbers (*Apostichopus japonicus*) from Ulleungdo (Island) and Dokdo (Island), Korea. *Food Science and Biotechnology* 21(5), 1285-1291.
155. Liao Y.L. 1997. Fauna Sinica, Phylum Echinodermata, Class Holothuroidea. Science Press Beijing. 334.
156. Liu Q., Kong B.H., Xiong Y.L.L., Xia X.F. 2009. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chemistry* 118, 403-410.
157. Liu Z., Oliveira A.C.M., Su Y.C. 2010. Purification and characterization of pepsin-solubilized collagen from skin and connective tissue of giant red sea cucumber (*Parastichopus californicus*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 58, 1270-1274.
158. Liu X., Zhu G., Zhao Q., Wang L., Gu B. 2004. Studies on hatchery techniques of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. In: Advances in sea cucumber aquaculture and management. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 463. Rome, Italy. pp. 287-296.
159. Lluch-Cota S.E., Aragon-Noriega E.A., Arreguin-Sanchez F., Auriolles-Gamboa D., Bautista-Romero J.J., Brusca R.C., Cervantes-Duarte R., Cortes-Altamirano R., Del-Monte-Luna P., Esquivel-Herrera A., Fernández G., Hendrickx M.E., Hernández-Vázquez S., Herrera-Cervantes H., Kahru M., Lavín M., Lluch-Belda D., Lluch-Cota D.B., López-Martínez J., Marinone S.G., Nevarez-Martínez M.O., Ortega-García S., Palacios-Castro E., Pares-Sierra A., Ponce-Diaz G., Ramírez-Rodríguez M., Salinas-Zavala C.A., Schwartzlose R.A., Sierra-Beltrán A.P. 2007. The Gulf of California: review of ecosystem status and sustainability challenges. *Progress in Oceanography* 73, 1-26.
160. Lovatelli A., Conand C., Purcell S., Uthicke S., Hamel J.F., Mercier A. 2004. Advances in sea cucumber aquaculture and management. FAO Fisheries Technical Paper No. 463. Rome, Italy. pp. 425.
161. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
162. Ludwig H.L. 1875. Beitrage zur Kenntniss der Holothurien. *Zoological Institute of Wurzburg* 2(2), 77-120.

163. Madureira A.R., Tavares T., Gomes A.M.P., Pintado M.E., Malcata F.X. 2010. Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science* 93, 437-455.
164. MAFF. 1975. Energy Allowances and Feeding Systems for ruminants. U.K. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Department. Technical Bulletin No 33.
165. Maluf L.Y. 1991. Echinoderms of the Galapagos. In: Galapagos Marine Invertebrates. James M.J. (Ed.). Plenum Press. Nueva York, USA. pp. 345-367.
166. Mamelona J., Pelletier E.M., Lalancette K.G., Legault J., Karboune S., Kermasha S. 2007. Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea cucumber, *Cucumaria frondosa*. *Food Chemistry* 104, 1040-1047.
167. Mamelona J., Saint Louis R., Pelletier E. 2010. Nutritional composition and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from echinoderm byproducts. *International Journal of Food Science & Technology* 45, 147-154.
168. Mandalari G., Adel-Patient K., Barkholt V., Baro C., Bennett L., Bublin M., Gaier S., Graser G., Ladics G.S., Mierzejewska D., Vassilopoulou E., Vissers Y.M., Zuidmeer L., Rigby N.M., Salt L.J., Defernez M., Mulholland F., Mackie A.R., Wickham M.S.J., Mills E.N.C. 2009a. In vitro digestibility of b-casein and b-lactoglobulin under simulated human gastric and duodenal conditions: A multi-laboratory evaluation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 55, 372-381.
169. Mandalari G., Mackie A.R., Rigby N.M., Wickham M.S.J., Mills E.N.C., 2009b. Physiological phosphatidylcholine protects bovine b-lactoglobulin from simulated gastrointestinal proteolysis. *Molecular Nutrition & Food Research* 53, 131-139.
170. Massin C., Uthicke S., Purcell S., Rowe F.W.E., Y. Samyn. 2009. Taxonomy of the heavily exploited Indo-Pacific sandfish complex (Echinodermata: Holothuriidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 155, 40-59.
171. Mathews K.E., Van Holde G., Ahern A. 2002. *Bioquímica*. Pearson Addison Wesley. Barcelona, España. pp. 166-170.
172. Matsubara H., Nakamura Tsukata S., Hirabayashi J., Jimbo M., Kamiya H., Ogawa T., Muramoto K. 2007. Diverse sugar-binding specificities of the marine invertebrate C-type lectins. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71(2), 513-519.
173. Mehmet A., Hüseyin S., Bekir T., Yilmaz E., Sevim K. 2011. Proximate composition and fatty acid profile of three different fresh and dried commercial sea cucumbers from Turkey. *International Journal of Food Science and Technology* 46, 500-508.
174. Meisel H. 2004. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors* 21, 55-61.
175. Mendis E., Rajapakse N., Byun H.G., Kim S.K. 2005a. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their *in vitro* antioxidant effects. *Life Sciences* 77, 2166-2178.

176. Mendis E., Rajapakse N., Kim S.K. 2005b. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 581-587.
177. Mercier A., Hidalgo R.Y., Hamel J.D. 2004. Aquaculture of the Galapagos sea cucumber *Isostichopus fuscus*. In: *Advances in sea cucumber aquaculture and management*. Lovatelli A., Conand C., Purcell S., Uthicke S., Hamel J.F., Mercier A. (Eds.). FAO Fisheries Technical Paper No. 463. Rome, Italy. pp. 347-358.
178. Mercier A., Ycaza R.H., Espinoza R., Arriaga Haro V.M., Hamel J.F. 2012. Hatchery experience and useful lessons from *Isostichopus fuscus* in Ecuador and Mexico. In: *Asia-Pacific Tropical Sea Cucumber Aquaculture*. Hair C.A., Pickering T.D., Mills D.J. (Eds.). ACIAR Proceedings, 136. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia. pp. 79-90.
179. Miguel M., Aleixandre A. 2006. Antihypertensive peptides derived from egg proteins. *Journal of Nutrition* 136, 1457-1460.
180. Mihalyi E. 1978. *Application of proteolytic enzymes to protein structure studies*. CRC Press. Palm Beach, Florida, USA. pp. 215-308.
181. Mine Y., Yang M. 2008. Recent advances in the understanding of egg allergens: Basic, industrial, and clinical perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 4874-4900.
182. Mommsen T.P., 2004. Salmon spawning migration and muscle protein metabolism: the August Krogh principle at work. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 139, 383-400.
183. Monaci, L., Tregoat, V., van Hengel, A.J., Anklam E. 2006. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *European Food Research and Technology* 223(2), 149-179.
184. Morken T., Kraugerud O.F., Sørensen M., Storebakken T., Hillestad M., Christiansen R., Øverland M. 2011. Effects of feed processing conditions and acid salts on nutrient digestibility and physical quality of soy-based diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture Nutrition* 18 (1), 21-34.
185. Mourao P.A.S., Pereira M.S., Pavão M.S., Mulloy B., Tollefsen D.M., Mowinckel M.C., Abildgaard U. 1996. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm. Sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action. *Journal of Biological Chemistry* 271, 23973–23984.
186. Muehlhoff E., Bennett A., McMahon D. 2013. *Milk and dairy products in human nutrition*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Roma, Italy. pp. 1-376.
187. Mulero-Canovas J., Zafrilla-Rentero P., Martínez-Cacha A., Leal-Hernández M., Abellan-Aleman J. 2011. Bioactive peptides. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis* 3, 219-227.
188. Murillo J.C., Chasiluisa C., Bautil B., Vizcaino J., Nicolaidis F., Moreno J., Molina L. 2003. Monitoreo de la Pesquería del Pepino de Mar (*Isostichopus fuscus*) en las islas Galápagos. Fundación Charles Darwin. Santa Cruz, Ecuador. pp. 48.

189. Murillo J.C., Martínez P., Toral-Granda M.V., Hearn A. 2002. Pepino de Mar. En: Reserva Marina de Galápagos, Línea Base de la Biodiversidad. Danulat E., Edgar G.J. (Eds.). Fundación Charles Darwin y Servicio Parque Nacional de Galápagos. Santa Cruz, Ecuador. pp. 488.
190. Murray A.P., Muniaín C., Seldes A.M., Maier M.S. 2001. Patagonicoside A: A novel antifungal disulfated triterpene glycoside from the sea cucumber *Psolus patagonicus*. *Tetrahedron* 57, 9563-9568.
191. Nagase H., Enjyoji K., Minamiguchi K., Kitazato K.T., Kitazato K., Saito H., Kato H. 1995. Depolymerized holothurian glycosaminoglycan with novel anticoagulant actions: Antithrombin III- and heparin cofactor II-independent inhibition of factor X activation by factor IXa-factor VIIIa complex and heparin cofactor II-dependent inhibition of thrombin. *Blood* 85, 1527-1534.
192. O'Donoghue G.V., Johnson D.B. 1986. A soluble aminopeptidase of *Holothuria forskali* intestinal mucosa: purification and active centre studies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 85, 397-405.
193. Oda T., Tsuru M., Hatakeyama T., Nagatomo H., Muramatsu T., Yamasaki N. 1997. Temperature and pH dependent cytotoxic effect of the hemolytic lectin CEL III from the marine invertebrate cucumaria echinata in various cell lines. *Journal of Biochemistry* 121, 560-567.
194. Okorie E.O., Su H.K., Sugeun G., Seunghyung L., Jun Y.B., Kyungmin H., Sungchul C.B. 2008. Preliminary Study of the Optimum Dietary Ascorbic Acid Level in Sea Cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Journal of the World Aquaculture Society* 39(6), 758-765.
195. Omran N.E.E. 2013. Nutritional value of some Egyptian sea cucumbers. *African Journal of Biotechnology* 12(35), 5466-5472.
196. Osama Y.A., Ridzwan B.H., Muhammad T., Jamaludin M.D., Masa Aki I., Zali B.I. 2009. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of three malaysian sea cucumber species. *European Journal of Scientific Research* 3, 376-387.
197. Pacheco R.G., Vicente C.P., Zancan P., Mourão P.A.S. 2000. Different antithrombotic mechanisms among glycosaminoglycans revealed with a new fucosylated chondroitin sulfate from an echinoderm. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 11, 563-573.
198. Padilha M.H., Pimentel A.C., Ribeiro A.F., Terra W.R. 2009. Sequence and function of lysosomal and digestive cathepsin D-like proteinases of *Musca domestica* midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39, 782-791.
199. Pawson D.L. 1982. Deep-sea echinoderms in the Tongue of the Ocean, Bahama Islands: A survey, using the research submersible Alvin. *Memoirs of the Australian Museum* 16, 129-145.
200. Pawson D.L. 1995. Echinoderms of tropical island Pacific: status of their systematic and notes on their ecology and biogeography. In: Marine and coastal biodiversity in the tropical island Pacific region. Vol. I. Maragos J.E., Peterson M.N.A., Eldredge L.G., Bardach J.E., Takeuchi H.F. (Eds.). Pacific Science Association/Berenice P. Bishop Museum. Honolulu, Hawaii, USA. pp. 171-192.
201. Pellegrini A., Hülsmeyer A.J., Hunziker P., Thomas U. 2004. Proteolytic fragments of ovalbumin display antimicrobial activity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1672, 76-85.

202. Pérez-Vega J.A., Olivera-Castillo L., Gómez-Ruíz J.A., Hernández-Ledesma B. 2013. Release of multifunctional peptides by gastrointestinal digestion of sea cucumber (*Isostichopus badiionotus*). *Journal of Functional Foods* 5, 869-877.
203. Pihlanto A., Korhonen H. 2003. Bioactive peptides and proteins. *Advances in Food and Nutrition Research* 47, 175-276.
204. Polverino de Laureto P., Frare E., Gottardo R., van Dael H., Fontana A. 2002. Partly folded states of members of the lysozyme/lactalbumin superfamily: A comparative study by circular dichroism spectroscopy and limited proteolysis. *Protein Science* 11, 46-2932.
205. Popov A.M. 2002. A comparative study of the hemolytic and cytotoxic activities of triterpenoids isolated from ginseng and sea cucumbers. *Biochemistry Bulletin* 29, 120-129.
206. Preston G.L. 1993. Beche-de-mer. In: *Nearshore marine resources of the Southern Pacific: information for fisheries development and management*. Forum Fisheries Agency. Honiara, Solomon Islands. pp. 371-407.
207. Purcell S.W. 2010. Managing sea cucumber fisheries with an ecosystem approach. Lovatelli A., Vasconcellos M., Yimin Y. (Eds.). *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 520*. Rome, Italy. pp. 157.
208. Purcell S.W., Samyn Y., Conand C. 2012. Commercially Important Sea Cucumbers of the World. *FAO Species Catalogue for Fishery Purposes No. 6*. Pp.150.
209. Qi H., Dong X.P., Cong L.N., Gao Y., Liu L., Mikiro T., Zhu B.W. 2007. Purification and characterization of a cysteine-like protease from the body wall of the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 33, 181-188.
210. Qian Z.J., Jung W.K., Byun H.G., Kim S.K. 2008. Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage. *Bioresource Technology* 99, 3365-3371.
211. Qin L., Zhu B.W., Zhou D.Y., Wu H.T., Tan H., Yang J.F., Li D.M., Dong X.P., Murata Y. 2011. Preparation and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from purple sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) gonad. *LWT - Food Science and Technology* 44, 1113-1119.
212. Quiñones J.L., Rosa R., Ruíz D.L., García-Arrarás J.E. 2002. Extracellular matrix remodeling and metalloproteinase involvement during intestine regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *Developmental Biology* 250, 97-181.
213. Rajapakse N., Mendis E., Byun H.G., Kim S.K. 2005a. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16, 562-569.
214. Rajapakse N., Mendis E., Jung W.K., Je J.Y., Kim S.K. 2005b. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International* 38, 175-182.

215. Raldúa D., Fabra M., Bozzo M.G., Weber E., Cerda J. 2006. Cathepsin B mediated yolk protein degradation during killifish oocyte maturation is blocked by an H<sup>+</sup>-ATPase inhibitor: Effects on the hydration mechanism. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 290, 456-466.
216. Rasmussen R.S., Morrissey M. 2007. Marine biotechnology for production of food ingredients. *Advances in Food and Nutrition Research* 52, 237-92.
217. Ravallec P.R., Charlot C., Pires C., Braga V., Batista I., Wormhoudt A.V., Gal Y.L., Fouchereau Peron M. 2001. The presence of bioactive peptides in hydrolysates prepared from processing waste of sardine (*Sardina pilchardus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 1120-1125.
218. Reitter R.J. 1995. Oxidative processes and antioxidative mechanisms. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9, 33-526.
219. Restani P., Gaiaschi A., Plebani A., Beretta B., Cavagni G., Fiocchi A., Poiesi C., Velona T., Ugazio A.G., Galli C.L. 1999. Cross- reactivity between milk proteins from different animal species. *Clinical and Experimental Allergy* 29, 997-1004.
220. Reyes-Bonilla H. 1997. Biología poblacional de *Isostichopus fuscus* (Ludwig, 1875) (*Echinodermata: Holothuroidea*) en el sur de el Golfo de California. Informe final del Proyecto H216. Universidad Autónoma de Baja California Sur, Departamento de Biología Marina. Proyecto de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). pp. 23-25.
221. Richmond R.H., Hooper D., Martínez P.C. 1995. The biology and ecology of sea cucumbers. In: *Suggestions for the Management of Sea Cucumber Resources in Micronesia. Results of the Workshop, Regional sea cucumber fisheries meeting: A regional management plan for a sustainable sea cucumber fishery for Micronesia.* Micronesia. pp. 1-77.
222. Ridzwan B.H. 2007. *Sea Cucumbers, a Malaysian Heritage*, 1st Ed. Research Centre of International Islamic University Malaysia (IIUM): Kuala Lumpur Wilayah Persekutuan. Malaysia. pp. 1-15, 89-128.
223. Ridzwan B.H., Kaswandi M.A., Azman Y., Fuad M. 1995. Screening for antibacterial agents in three species of sea cucumbers from coastal areas of Sabah. *General Pharmacology* 26, 1539-1543.
224. Robinson H., Hogden C. 1940. The biuret reaction in the determination of serum proteins. I. A study of the conditions necessary for the production of a stable color which bears a quantitative relationship to the protein. *Journal of Biological Chemistry* 135, 707-725.
225. Roginsky A., Singh B., Ding X.Z., Collin P., Woodward C., Talamonti M.S., Bell R.H., Adrian T.E. 2004. Frondanol(R)-A5p from the sea cucumber, *Cucumaria frondosa* induces cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells. *Pancreas* 29, 335.
226. Rojo L., Sotelo-Mundo R., Garcia-Carreno F., Graf L. 2010. Isolation, biochemical characterization, and molecular modeling of American lobster digestive cathepsin D1. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 157, 394-400.



227. Roy P., Colas B., Durand P. 1996. Purification, kinetical and molecular characterization of a serine collagenolytic protease from greenshore crac (*Carcinus maenas*) digestive gland. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 115, 87-95.
228. Ruppert E.E., Barnes R.D. 1996. *Zoología de los Invertebrados*. McGraw-Hill Interamericana, México. pp. 1114.
229. Saito M., Kunisaki N., Urano N. 2002. Collagen as the major edible component of sea cucumber. *Journal of Food Science* 67, 1319-1322.
230. Salarzadeh A.R., Afkhami M., Bastami K.D., Ehsanpour M., Khazaali A., Mokhleci A. 2012. Proximate Composition of Two Sea Cucumber Species *Holothuria pavra* and *Holothuria arenicola* in Persian Gulf. *Annals of Biological Research* 3(3), 1305-1311.
231. Salgado-Castro L.R. 1993. Sea cucumber fisheries of the Pacific Coast (*Parastichopus parvimensis* and *P. californicus* and *Isostichopus fuscus*), from the Gulf of California. National Fisheries Institute. Ministry of Fisheries. pp. 114.
232. Salgado-Castro L.R. 1994. Propuesta de las opciones de manejo de las pesquerías de pepinos de mar en las costas oriental y occidental de Baja California, México. CRIP Ensenada. Informe Técnico del Instituto Nacional de la Pesca (inédito). pp. 27.
233. San Miguel-Ruíz J.E., García-Arrarás J.E. 2007. Common cellular events occur during wound healing and organ regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *BMC Developmental Biology* 7, 1-19.
234. Scopes R.K. 1994. *Protein Purification: Principles and Practice*. Springer-Verlag. New York, USA. pp. 380.
235. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2013. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <http://www.siap.gob.mx/produccion-pesquera-por-especie/> Fecha de acceso 28 de Enero de 2015.
236. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Dirección General de Vida Silvestre. Diario Oficial de la Federación. Segunda Sección. México.
237. Seo J.Y., Lee S.M. 2011. Optimum dietary protein and lipid levels for growth of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture Nutrition* 17(2), 56-61.
238. Shahidi F., Han X., Synowiecki J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry* 53, 285-293.
239. Shahidi F., Janak Kamil Y.V.A. 2001. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Fereidoon Trends in Food Science and Technology* 12, 435-464.



240. Shepherd S.A., Martínez P., Toral-Granda M.V., Edgar G.J. 2004. The Galápagos sea cucumber fishery: management improves as stocks decline. *Environmental Conservation* 31, 102-110.
241. Shi C., Marshall S.N., Simpson B.K. 2007. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of the New Zealand hoki fish (*Macruronus Novaezealandiae*). *Journal of Food Biochemistry* 31, 772-796.
242. Simpson B.K., Haard N.F. 1985. Characterization of the trypsin fraction from cunner, *Tautoglabrus adspersus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 80, 475-480.
243. Simpson B.K., Haard N.F. 1987. Cold adapted enzymes from fish. In: *Food Biotechnology*. Knorr D. (Ed.). Marcel Dekker. Nueva York, USA. pp. 495-527.
244. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76-85.
245. Solís-Marín F.A., Arriaga-Ochoa J.A., Laguarda-Figueras A., Frontana-Uribe C.S., Durán-González A. 2009. Holoturoideos del Golfo de California. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. CONABIO-UNAM. México. pp. 24-30. ISBN. 978-6077607-16-8.
246. Sookkheo B., Sinchaikul S., Phutrakul S. 2000. Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Protein Expression and Purification* 20, 142-151.
247. Sorensen M., Morken T., Kosanovic M., Øverland M., 2011. Pea and wheat starch possess different processing characteristics and affect physical quality and viscosity of extruded feed for Atlantic salmon. *Aquaculture Nutrition* 17, 326-336.
248. Su R., Liang M., Qi W., Liu R., Yuan S., He Z. 2012. Pancreatic hydrolysis of bovine casein: Peptide release and time-dependent reaction behavior. *Food Chemistry* 133, 851-858.
249. Su Y., Liu S., Wu C. 2009. Optimization of the preparation procedure and the antioxidant activity of polypeptide from sea cucumber. *Journal of Fujian Fisheries* 02.
250. Sugawara T., Zaima N., Yamamoto A., Sakai S., Noguchi R., Hirata T. 2006. Isolation of sphingoid bases of sea cucumber cerberosides and their cytotoxicity against human colon cancer cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70, 2906-2912.
251. Sun L.M., Wang T.T., Zhu B.W., Niu H.L., Zhang R., Hou H.M., Zhang G.L., Murata Y. 2013. Effect of matrix metalloproteinase on autolysis of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Food Science and Biotechnology* 22(5), 1259-1261.
252. Sun L.M., Zhu B.W., Wu H.T., Yu L., Zhou D.Y., Dong X., Yang J.F., Li D.M., Ye W.X., Murata Y. 2011. Purification and Characterization of Cathepsin B from the Gut of the Sea Cucumber (*Stichopus japonicus*). *Food Science and Biotechnology* 20(4), 919-925.

253. Tanaka Y. 1958. Feeding and digestive processes of *Stichopus japonicus*. Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University 9, 14-28.
254. Tauzin J., Miclo L., Roth S., Mollé D., Gaillard J.L. 2003. Tryptic hydrolysis of bovine  $\alpha$ 2-casein: identification and release kinetics of peptides. International Dairy Journal 13(1), 15-27.
255. Taylor M.J., Richardson T. 1980. Antioxidant activity of skim milk: Effect of heat and resultant sulfhydryl groups. Journal of Dairy Science 63, 1783-1795.
256. Therkildsen N.O., Petersen C.W. 2006. A review of the emerging fishery for the sea cucumber *Cucumaria frondosa*: Biology, policy, and future prospects. Secretariat of the Pacific Community (SPC) Beche-de-mer Information Bulletin 23, 16-25.
257. Tian F., Zhang X., Tong Y., Yi Y., Zhang S., Li L., Sun P., Lin L., Ding J.P.E. 2005. A new sulfated saponin from sea cucumber, exhibits anti-angiogenic and anti-tumor activities in vitro and in vivo. Cancer Biology and Therapy 4, 874-882.
258. Tipper J.P., Lyons Levy G. 2003. Purification, characterization and cloning of tensilin, the collagen-fibril binding and tissue stiffening factor from *Cucumaria frondosa* dermis. Matrix Biology 21, 625-635.
259. Tong L.M., Sasaki S., McClements D.J., Decker E.A. 2000. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48, 1473-1478.
260. Tong Y., Zhang X., Tian F., Yi Y., Xu Q., Li L., Tong L., Lin L., Ding J., Philinopside A. 2005. A novel marine-derived compound possessing dual anti-angiogenic and anti-tumor effects. International Journal of Cancer 114, 843-853.
261. Toral-Granda M.V. 2005. The use of calcareous spicules for the identification of the Galápagos sea cucumber *Isostichopus fuscus* in the international market. Secretariat of the Pacific Community (SPC) Beche-de-mer Information Bulletin 22, 3-5.
262. Toral-Granda M.V. 2007. Biological and trade status of sea cucumbers in the families Holothuridae and Stichopodidae. CITES CoP14 Doc. 62, 33.
263. Toral-Granda M.V. 2008. Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in Latin America and the Caribbean. In: Sea cucumbers: a global review of fisheries and trade. Toral-Granda V., Lovatelli A., Vasconcellos M. (Eds.). FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 516. Rome, Italy. pp. 211-229.
264. Toral-Granda M.V., Martínez P.C. 2007. Reproductive biology and population structure of the sea cucumber *Isostichopus fuscus* (Ludwig, 1875) (Holothuroidea) in Caamaño, Galapagos Islands, Ecuador. Marine Biology 151, 2091-2098.
265. Toral-Granda M.V., Murillo J.C., Piu M., Nicolaidis F., Moreno J., Reyes H., Castrejón M., Hearn A. 2005. Evaluación de la pesquería de pepino de mar (*Isostichopus fuscus*) en la Reserva Marina de Galápagos en el año 2005. Fundación Charles Darwin/Parque Nacional Galápagos. Puerto Ayora, Santa Cruz, Ecuador. pp. 41.

266. Toral V.G., Martínez, P.C. 2004. Population density and fishery impacts on the sea cucumber (*Isostichopus fuscus*) in the Galapagos marine reserve. In: Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management. Lovatelli A., Conand C., Purcell S., Uthicke S., Hamel J.F., Mercier A. (Eds.). FAO Fisheries Technical Paper No. 463. Rome, Italy. pp. 91-100.
267. Valledor de Lozoya A. 1994. Envenenamientos por animales. Animales venenosos y urticantes del mundo. Ediciones Díaz de Santos S.A. Madrid, España. pp 173-174.
268. VandenSpiegel D., Jangoux M. 1987. Cuvierian tubules of the holothuroid *Holothuria forskali* (Echinodermata); a morphofunctional study. *Marine Biology* 96, 263-275.
269. Vecht-Lifshitz S.E., Almas K.A., Zomer E. 1990. Microbial growth on peptones from fish industrial wastes. *Letters in Applied Microbiology* 10, 183-186.
270. Venugopal V. 2009. Marine Habitat and Resources. In: Marine Products for Healthcare: Functional and Bioactive Nutraceutical Compounds from the Ocean. Venugopal V. (Ed.). CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton, Florida, USA. pp. 23-50.
271. Volpi N. 2006. Advances in chondroitin sulfate analysis. Application in physiological and pathological states of connective tissue and during pharmacological treatment of osteoarthritis. *Current Pharmaceutical Design* 12, 639-658.
272. Wang F. 1997. Nutrient analysis of frozen sea cucumber (*Acaudina molpadioides*). *East China Sea Marine Science* 15(4), 65-67.
273. Wang J., Wang Y., Tang Q., Wang Y., Chang Y., Zhao Q., Xue C. 2010. Antioxidation activities of low-molecular-weight gelatin hydrolysate isolated from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Journal of Ocean University of China* 9, 94-98.
274. Wang P.A., Stenvik J., Larsen R., Mæhre H., Olsen R.L. 2007. Cathepsin D from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) liver. Isolation and comparative studies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 147, 504-511.
275. Wang R., Cheng Y. 2004. Breeding and culture of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*, Liao. In: Advances in sea cucumber aquaculture and management. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 463. Rome, Italy. pp. 277-286.
276. Wen J., Hua C., Fan S. 2010. Chemical composition and nutritional quality of sea cucumbers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 2469-2474.
277. Whitaker J.R. 1994. Classification and nomenclature of enzymes. In: Principles of enzymology for the food sciences. Marcel Dekker. Nueva York, USA. pp. 367-385.
278. Williamson A.L., Brindley P.J., Abbenante G., Prociv P., Berry C., Girdwood K., Pritchard D.I., Fairlie D.P., Hotez P.J., Dalton J.P., Loukas A. 2002. Cleavage of hemoglobin by hookworm cathepsin D aspartic proteases and its potential contribution to host specificity. *FASEB Journal* 16, 1458-1460.
279. Willock A., Burgener M., Sancho A. 2004. First Choice or Fallback? An examination of issues relating to the application of Appendix III of CITES to marine species. Traffic International. Cambridge, United Kingdom. pp. 15-23.

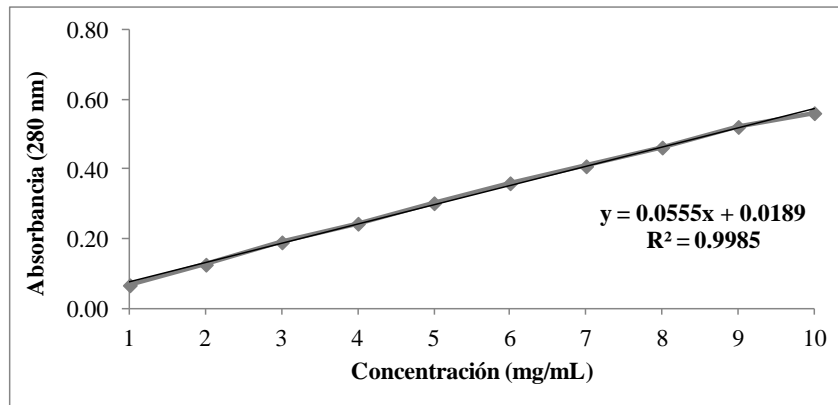
280. Wu H.L., Hu Y.Q., Shen J.D., Cai Q.F., Liu G.M., Su W.J., Cao M.J. 2013a. Identification of a novel gelatinolytic metalloproteinase (GMP) in the body wall of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) and its involvement in collagen degradation. *Process Biochemistry* 48, 871-877.
281. Wu H.T., Li D.M., Zhu B.W., Sun J.J., Zheng J., Wang F.L., Konno K., Jiang X. 2013b. Proteolysis of noncollagenous proteins in sea cucumber, *Stichopus japonicus*, body wall: Characterization and the effects of cysteine protease inhibitors. *Food Chemistry* 141, 1287-1294.
282. Xia S., Yang H., Li Y., Liu S., Xu Q., Rajkumar M. 2013. Effects of food processing method on digestibility and energy budget of *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture* 384-387:128-133.
283. Yaacob H.B., Kim K.H., Shahimi M., Aziz N.S., Sahil S.M. 1997. Malaysian sea cucumber (Gamat): A prospect in health food and therapeutic. *Proceeding of Asian Food Technology Seminar*. Kuala Lumpur, Malaysia.
284. Yamaguchi T., Yashita Y., Takeda I., Kiso H. 1982. Proteolytic enzymes in green asparagus kiwi fruit and miut: Occurrence and partial characterization. *Agricultural and Biological Chemistry* 46, 1983-1986.
285. Yoshinaka R., Sato M., Tanaka H., Ikeda S. 1986. Distribution of pancreatic elastase and metalloprotease in vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 83, 45-49.
286. Yoshinaka R., Sato M., Yamashita M., Itoko M., Ikeda S. 1987. Specificity of the collagenolytic serine proteinase from the characterization, and the effect of feed on their composition. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* 103, 575-578.
287. Yuan W.P., Liu C.H., Wang X.J., Meng X.M., Xia X.K., Zhang M.S., Hu W. 2010. Evaluation and analysis of nutritional composition of different parts of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Science and Technology of Food Industry* 05.
288. Yuan X.T., Yang H.S., Zhou Y., Mao Y.Z., Zhang T., Liu Y. 2006. The influence of diets containing dried bivalve feces and/or powdered algae on growth and energy distribution in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) (Echinodermata: Holothuroidea). *Aquaculture* 256, 457-467.
289. Zefirova O.N., Mamaeva A.V., Chupov V.V., Valuev L.L., Plate N.A., 1996. Synthesis and properties of immobilized collagenolytic protease from hepatopancreas of the king crab (*Paralithoides camtschatica*). *Applied Biochemistry and Microbiology* 52, 461-464.
290. Zeng M., Xiao F., Li B., Zhao Y., Liu Z., Dong S. 2007. Study on free radical scavenging activity of sea cucumber (*Paracaudina chinens var.*) gelatin hydrolysate. *Journal of Ocean University of China (Oceanic and Coastal Sea Research)* 6(3), 255-258.
291. Zetina-Moguel C., Ríos-Lara G., Hernández-Herrera I., Guevara-Ortiz M., Ortiz-Avilés E., Pool-Gómez J. 2002. Catálogo de especies de pepino de mar comercializables del Estado de Yucatán. Editorial Universidad Autónoma de Yucatán. Yucatán, México. pp. 20-21.
292. Zhang C., Kim S. 2010. Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects. *Marine Drugs* 8, 1920-1934.

293. Zhang Q.L., Liu Y.H. 1998. The techniques of sea cucumber culture and its enhancement. Qingdao Ocean University Publishing House. Qingdao, Shandong, China. pp. 157.
294. Zhanga Y., Shib G., Zhao F. 2010. Hydrolysis of casein catalyzed by papain in n-propanol/NaCl two-phase system. *Enzyme and Microbial Technology* 46, 438-443.
295. Zhao Q., Wang J.F., Xue Y., Wang Y., Gao S., Lei M., Xue C.H. 2008. Comparative study on the bioactive components and immune function of three species of sea cucumber. *Journal of Fishery Sciences of China* 01.
296. Zhao Y., Li B., Liu Z., Dong S., Zhao X., Zeng M. 2007. Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate. *Process Biochemistry* 42, 1586-1591.
297. Zheng J., Wu H.T., Zhu B.W., Dong X.P., Zhang M.M., Li Y.L. 2012. Identification of antioxidative oligopeptides derived from autolysis hydrolysates of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) guts. *European Food Research and Technology* 234, 895-904.
298. Zhong Y., Ahmad-Khan M., Shahidi F. 2007. Compositional characteristics and antioxidant properties of fresh and processed sea cucumber (*Cucumaria frondosa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 1188-1192.
299. Zhou X., Wang C., Jiang A. 2012. Antioxidant peptides isolated from sea cucumber *Stichopus japonicas*. *European Food Research and Technology* 234, 441-447.
300. Zhu B., Yu J., Zhang Z., Zhou D., Yang J., Li D., Murata Y. 2009. Purification and partial characterization of an acid phosphatase from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Process Biochemistry* 44(8), 875-879.
301. Zhu B.W., Zhao L., Sun L., Li D., Murata Y., Yu L., Zhang L. 2008. Purification and characterization of a cathepsin L-like enzyme from the body wall of the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 72(6), 1430-1437.
302. Zhu B.W., Zheng J., Zhang Z.S., Dong X.P., Zhao L.L., Mikiro T. 2008. Autophagy plays a potential role in the process of sea cucumber body wall “melting” induced by UV irradiation. *Wuhan University Journal of Natural Sciences* 13, 232-238.
303. Zou Z., Yi Y., Wu H., Wu J., Liaw C., Lee K. 2003. Intercedensides A-C, three new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Mensamaria intercedens* Lampert. *Journal of Natural Products* 66, 1055-1060.
304. Zulueta A., Esteve M.J., Frigola A. 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry* 114, 310-316.

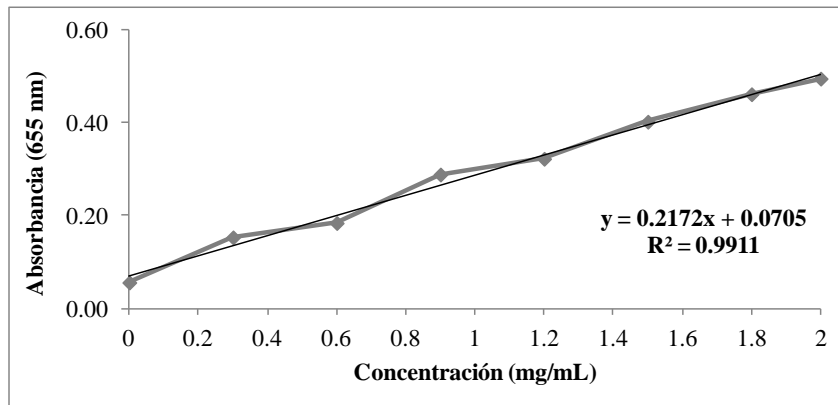
# ANEXOS

## ANEXO 1. Curvas estándar para la determinación de concentración de proteína.

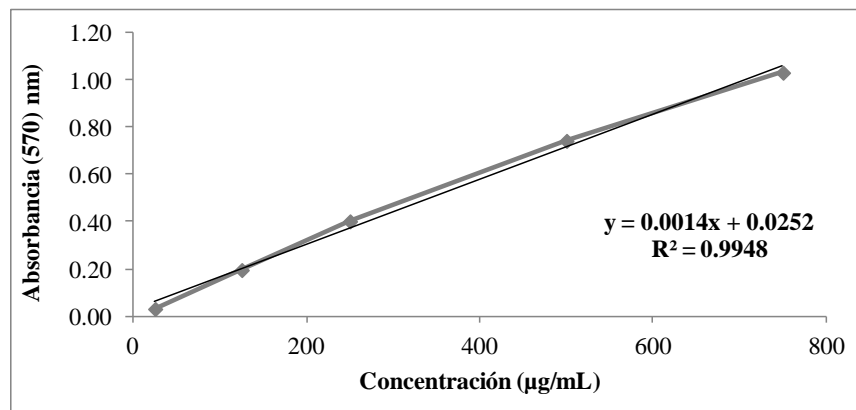
### Método de biuret.



### Método de Lowry.



### Método de BCA.





**ANEXO 2. Análisis de especímenes *I. fuscus* recolectados en el Golfo de California (México).**

**Pesos y longitudes de pepinos de mar *I. fuscus*.**

| No.          | Peso (g)     | Longitud (cm) |
|--------------|--------------|---------------|
| 1            | 350          | 25            |
| 2            | 350          | 22            |
| 3            | 350          | 22            |
| 4            | 340          | 23            |
| 5            | 500          | 25            |
| 6            | 390          | 23            |
| 7            | 345          | 22            |
| 8            | 430          | 23            |
| 9            | 320          | 22            |
| 10           | 450          | 25            |
| 11           | 405          | 22            |
| 12           | 390          | 25            |
| <b>Media</b> | <b>380.0</b> | <b>23.3</b>   |
| <b>D.E.</b>  | <b>39.1</b>  | <b>1.4</b>    |
| <b>C.V.</b>  | <b>10.3</b>  | <b>5.8</b>    |

**ANEXO 3. Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey de la actividad de extractos proteolíticos crudos del músculo ventral de *I. fuscus* en función del tiempo de reacción.**

**Análisis de varianza**

| Fuente de variación | Media cuadrática | gl | Sig.  |
|---------------------|------------------|----|-------|
| Músculo ventral     | 2253.634         | 9  | 0.001 |

**Comparación múltiple de medias de Tukey**

| Fuente de variación | Tiempo de reacción (min) |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                     |                     |                     |
|---------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                     | 2                        | 4                 | 6                 | 8                 | 10                | 12                | 14                | 15                  | 16                  | 18                  |
| Músculo ventral     | 101.3 <sup>a</sup>       | 51.4 <sup>b</sup> | 35.2 <sup>c</sup> | 27.5 <sup>d</sup> | 22.6 <sup>e</sup> | 18.8 <sup>f</sup> | 15.8 <sup>g</sup> | 14.3 <sup>h,i</sup> | 13.5 <sup>h,i</sup> | 12.7 <sup>h,i</sup> |

Valor medio de actividad específica (U/mg) con diferente superíndice son significativamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ).

**ANEXO 4. Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey del efecto del pH sobre la actividad de extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus*.**

**Análisis de varianza**

| Fuente de variación | Media cuadrática | gl | Sig.  |
|---------------------|------------------|----|-------|
| Músculo ventral     | 23.940           | 8  | 0.001 |
| Tracto digestivo    | 60.142           | 8  | 0.001 |
| Tentáculos          | 185.474          | 8  | 0.001 |

**Comparación múltiple de medias de Tukey**

| Fuente de variación | pH                 |                   |                   |                   |                    |                   |                    |                   |                   |
|---------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
|                     | 2                  | 3                 | 4                 | 5                 | 6                  | 7                 | 8                  | 9                 | 10                |
| Músculo ventral     | 49.8 <sup>a*</sup> | 43.2 <sup>c</sup> | 40.5 <sup>c</sup> | 38.8 <sup>f</sup> | 45.4 <sup>b</sup>  | 43.3 <sup>c</sup> | 45.7 <sup>b</sup>  | 42.1 <sup>d</sup> | 42.4 <sup>d</sup> |
| Tracto digestivo    | 52.8 <sup>c</sup>  | 50.7 <sup>d</sup> | 45.3 <sup>e</sup> | 42.3 <sup>f</sup> | 58.6 <sup>a*</sup> | 52.4 <sup>c</sup> | 54.8 <sup>b</sup>  | 50.6 <sup>d</sup> | 52.4 <sup>c</sup> |
| Tentáculos          | 65.2 <sup>d</sup>  | 61.7 <sup>e</sup> | 55.9 <sup>f</sup> | 51.4 <sup>g</sup> | 73.9 <sup>b</sup>  | 70.4 <sup>c</sup> | 76.2 <sup>a*</sup> | 70.6 <sup>c</sup> | 71.6 <sup>c</sup> |

Valor medio de actividad específica (U/mg) con diferente superíndice son significativamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ).

\*Valor medio significativamente mayor.

**ANEXO 5. Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey de la estabilidad al pH de extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus*.**

**Análisis de varianza**

| Fuente de variación | Media cuadrática | gl | Sig.  |
|---------------------|------------------|----|-------|
| Músculo ventral     | 130.806          | 8  | 0.001 |
| Tracto digestivo    | 89.053           | 8  | 0.001 |
| Tentáculos          | 35.828           | 8  | 0.001 |

**Comparación múltiple de medias de Tukey**

| Fuente de variación | pH                 |                     |                      |                     |                     |                     |                       |                       |                   |
|---------------------|--------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|
|                     | 2                  | 3                   | 4                    | 5                   | 6                   | 7                   | 8                     | 9                     | 10                |
| Músculo ventral     | 79.7 <sup>a*</sup> | 51.9 <sup>f</sup>   | 74.4 <sup>a,b*</sup> | 69.1 <sup>b,c</sup> | 67.4 <sup>c,d</sup> | 61.3 <sup>d,e</sup> | 64.6 <sup>c,d,e</sup> | 66.2 <sup>c,d,e</sup> | 60.3 <sup>e</sup> |
| Tracto digestivo    | 89.7 <sup>b</sup>  | 87.8 <sup>b,c</sup> | 89.6 <sup>b</sup>    | 83.3 <sup>d</sup>   | 82.7 <sup>d</sup>   | 86.9 <sup>c</sup>   | 94.5 <sup>a*</sup>    | 75.5 <sup>f</sup>     | 79.3 <sup>e</sup> |
| Tentáculos          | 90.9 <sup>b</sup>  | 95.3 <sup>a*</sup>  | 95.2 <sup>a*</sup>   | 91.5 <sup>b</sup>   | 87.8 <sup>c,d</sup> | 90.9 <sup>b</sup>   | 85.6 <sup>e</sup>     | 85.7 <sup>d,e</sup>   | 88.1 <sup>c</sup> |

Valor medio de actividad residual (%) con diferente superíndice son significativamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ).

\*Valor medio significativamente mayor.

**ANEXO 6. Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey del efecto de la temperatura sobre la actividad de extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus*.**

**Análisis de varianza**

| Fuente de variación | Media cuadrática | gl | Sig.  |
|---------------------|------------------|----|-------|
| Músculo ventral     | 50.609           | 8  | 0.001 |
| Tracto digestivo    | 296.892          | 8  | 0.001 |
| Tentáculos          | 113.228          | 8  | 0.001 |

**Comparación múltiple de medias de Tukey**

| Fuente de variación | Temperatura (°C)    |                     |                     |                   |                    |                     |                    |                    |                   |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
|                     | 0                   | 10                  | 20                  | 30                | 40                 | 50                  | 60                 | 70                 | 80                |
| Músculo ventral     | 45.0 <sup>e</sup>   | 47.5 <sup>d</sup>   | 47.2 <sup>d</sup>   | 48.5 <sup>c</sup> | 50.6 <sup>b</sup>  | 56.4 <sup>a*</sup>  | 56.7 <sup>a*</sup> | 44.4 <sup>f</sup>  | 45.0 <sup>e</sup> |
| Tracto digestivo    | 50.8 <sup>f</sup>   | 60.2 <sup>d</sup>   | 63.4 <sup>c,d</sup> | 56.4 <sup>e</sup> | 72.7 <sup>b*</sup> | 52.7 <sup>f</sup>   | 66.2 <sup>c</sup>  | 76.4 <sup>a*</sup> | 36.3 <sup>g</sup> |
| Tentáculos          | 73.9 <sup>d,e</sup> | 72.1 <sup>e,f</sup> | 80.9 <sup>b,c</sup> | 78.8 <sup>c</sup> | 75.6 <sup>d</sup>  | 73.9 <sup>d,e</sup> | 94.7 <sup>a*</sup> | 82.1 <sup>b</sup>  | 71.1 <sup>f</sup> |

Valor medio de actividad específica (U/mg) con diferente superíndice son significativamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ).

\*Valor medio significativamente mayor.

**ANEXO 7. Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey de la estabilidad a la temperatura de extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus*.**

**Análisis de varianza**

| Fuente de variación | Media cuadrática | gl | Sig.  |
|---------------------|------------------|----|-------|
| Músculo ventral     | 553.593          | 8  | 0.001 |
| Tracto digestivo    | 599.541          | 8  | 0.001 |
| Tentáculos          | 215.366          | 8  | 0.001 |

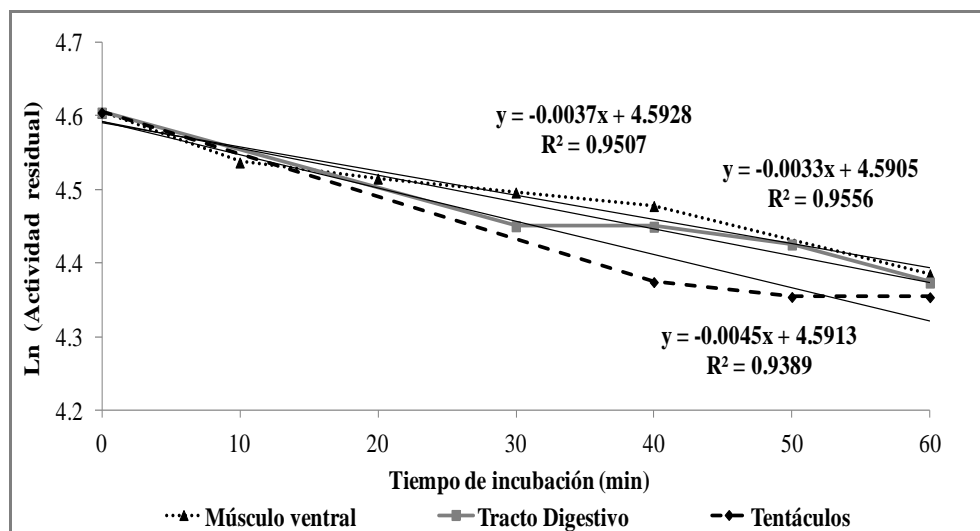
**Comparación múltiple de medias de Tukey**

| Fuente de variación | Temperatura (°C)    |                    |                   |                     |                     |                      |                   |                     |                   |
|---------------------|---------------------|--------------------|-------------------|---------------------|---------------------|----------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
|                     | 0                   | 10                 | 20                | 30                  | 40                  | 50                   | 60                | 70                  | 80                |
| Músculo ventral     | 85.2 <sup>c</sup>   | 77.3 <sup>f</sup>  | 91.4 <sup>b</sup> | 102.2 <sup>a*</sup> | 83.9 <sup>d</sup>   | 83.2 <sup>d</sup>    | 78.9 <sup>e</sup> | 78.8 <sup>e</sup>   | 48.8 <sup>g</sup> |
| Tracto digestivo    | 69.8 <sup>f</sup>   | 82.2 <sup>c</sup>  | 81.3 <sup>c</sup> | 88.6 <sup>a*</sup>  | 85.1 <sup>b*</sup>  | 86.9 <sup>a,b*</sup> | 72.3 <sup>e</sup> | 75.6 <sup>d</sup>   | 42.2 <sup>g</sup> |
| Tentáculos          | 74.4 <sup>b,c</sup> | 84.7 <sup>a*</sup> | 77.2 <sup>b</sup> | 85.5 <sup>a*</sup>  | 74.5 <sup>b,c</sup> | 78.5 <sup>a,b</sup>  | 67.5 <sup>c</sup> | 72.3 <sup>b,c</sup> | 52.1 <sup>d</sup> |

Valor medio de actividad residual (%) con diferente superíndice son significativamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ).

\*Valor medio significativamente mayor.

### ANEXO 8. Cálculo de tiempo de vida media de extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus*.



Incubación por 1 h a 70°C de los extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus*.

Ln (actividad final/actividad inicial) vs. tiempo de incubación (minutos)

Donde:  $K_d$  = pendiente de la recta;  $t_{1/2} = \text{Ln}(2/K_d)$ .

### ANEXO 9. Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey del efecto de almacenamiento en refrigeración sobre la actividad de extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus*.

#### Análisis de varianza

| Fuente de variación | Media cuadrática | gl | Sig.  |
|---------------------|------------------|----|-------|
| Músculo ventral     | 584.188          | 11 | 0.001 |
| Tracto digestivo    | 989.752          | 8  | 0.001 |
| Tentáculos          | 467.154          | 5  | 0.001 |

#### Comparación múltiple de medias de Tukey

| Fuente de variación | Tiempo de almacenamiento (días) |                     |                   |                     |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
|---------------------|---------------------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                     | 1                               | 4                   | 6                 | 7                   | 8                 | 10                | 13                | 15                | 17                | 18                | 21                | 22                |
| Músculo ventral     | 100 <sup>a</sup>                | 90.9 <sup>b,c</sup> | ----              | 89.3 <sup>c,d</sup> | 87.0 <sup>d</sup> | 89.4 <sup>c</sup> | ----              | 89.7 <sup>c</sup> | 68.3 <sup>e</sup> | 62.2 <sup>f</sup> | 58.4 <sup>g</sup> | 52.5 <sup>h</sup> |
| Tracto digestivo    | 100 <sup>a</sup>                | 78.9 <sup>b</sup>   | 74.0 <sup>c</sup> | 72.9 <sup>d</sup>   | 73.2 <sup>d</sup> | ----              | 58.4 <sup>e</sup> | 49.6 <sup>f</sup> | ----              | ----              | 47.9 <sup>g</sup> | 40.8 <sup>h</sup> |
| Tentáculos          | 100 <sup>a</sup>                | 84.9 <sup>b</sup>   | 76.8 <sup>c</sup> | 74.8 <sup>d</sup>   | ----              | ----              | ----              | 72.9 <sup>e</sup> | ----              | ----              | ----              | 62.8 <sup>f</sup> |

Valor medio de actividad residual (%) con diferente superíndice son significativamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ).

**ANEXO 10. Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey del efecto de inhibidores de proteasas sobre la actividad de extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus*.**

**Ensayo a pH 6**

**Análisis de varianza**

| Fuente de variación | Media cuadrática | gl | Sig.  |
|---------------------|------------------|----|-------|
| Músculo ventral     | 65.906           | 5  | 0.001 |
| Tracto digestivo    | 164.225          | 5  | 0.001 |
| Tentáculos          | 163.902          | 5  | 0.001 |

**Comparación múltiple de medias de Tukey**

| Fuente de variación | Inhibidor             |                    |                   |                     |                    |                   |
|---------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|---------------------|--------------------|-------------------|
|                     | PMSF                  | TLCK               | TI                | EDTA                | Pepstatina A       | β-Mercaptoetanol  |
| Músculo ventral     | 77.2 <sup>b,c,d</sup> | 96.7 <sup>a</sup>  | 80.3 <sup>b</sup> | 76.8 <sup>c,d</sup> | 68.0 <sup>e*</sup> | 75.9 <sup>d</sup> |
| Tracto digestivo    | 79.4 <sup>c*</sup>    | 86.2 <sup>b</sup>  | 92.0 <sup>a</sup> | 94.9 <sup>a</sup>   | 80.5 <sup>c*</sup> | 96.2 <sup>a</sup> |
| Tentáculos          | 95.5 <sup>b</sup>     | 79.3 <sup>e*</sup> | 93.1 <sup>c</sup> | 95.6 <sup>b</sup>   | 83.3 <sup>d</sup>  | 99.8 <sup>a</sup> |

Valor medio de actividad residual (%) con diferente superíndice son significativamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ).

\*Valor medio significativamente menor.

Ver el apartado de abreviaturas.

**Ensayo a pH 8**

**Análisis de varianza**

| Fuente de variación | Media cuadrática | gl | Sig.  |
|---------------------|------------------|----|-------|
| Músculo ventral     | 1872.671         | 3  | 0.001 |
| Tracto digestivo    | 40.144           | 3  | 0.001 |
| Tentáculos          | 36.883           | 3  | 0.001 |

**Comparación múltiple de medias de Tukey**

| Fuente de variación | Inhibidor          |                   |                     |                    |
|---------------------|--------------------|-------------------|---------------------|--------------------|
|                     | PMSF               | TLCK              | TI                  | EDTA               |
| Músculo ventral     | 93.9 <sup>a</sup>  | 97.1 <sup>a</sup> | 51.0 <sup>b*</sup>  | 40.0 <sup>b*</sup> |
| Tracto digestivo    | 75.0 <sup>b</sup>  | 81.2 <sup>a</sup> | 71.2 <sup>c*</sup>  | 74.9 <sup>b</sup>  |
| Tentáculos          | 75.9 <sup>c*</sup> | 84.3 <sup>a</sup> | 81.9 <sup>a,b</sup> | 81.1 <sup>b</sup>  |

Valor medio de actividad residual (%) con diferente superíndice son significativamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ).

\*Valor medio significativamente menor.

Ver el apartado de abreviaturas.

**ANEXO 11. Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey del efecto de iones sobre la actividad de extractos proteolíticos crudos de *I. fuscus*.**

**Análisis de varianza**

| Fuente de variación | Media cuadrática | gl | Sig.  |
|---------------------|------------------|----|-------|
| Músculo ventral     | 1278.684         | 8  | 0.001 |
| Tracto digestivo    | 130.872          | 8  | 0.001 |
| Tentáculos          | 84.096           | 8  | 0.001 |

**Comparación múltiple de medias de Tukey**

| Fuente de variación | Iones               |                   |                     |                     |                     |                       |                     |                     |                    |
|---------------------|---------------------|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
|                     | Cl <sup>-</sup>     | Na <sup>+</sup>   | Zn <sup>+</sup>     | Mn <sup>2+</sup>    | Cu <sup>2+</sup>    | Ca <sup>2+</sup>      | Mg <sup>2+</sup>    | Ba <sup>2+</sup>    | Hg <sup>2+</sup>   |
| Músculo ventral     | 80.1 <sup>d</sup>   | 97.9 <sup>b</sup> | 84.1 <sup>d</sup>   | 59.0 <sup>e</sup>   | 41.9 <sup>f*</sup>  | 89.4 <sup>b,c,d</sup> | 95.1 <sup>b,c</sup> | 88.5 <sup>c,d</sup> | 115.7 <sup>a</sup> |
| Tracto digestivo    | 91.8 <sup>d,e</sup> | 95.3 <sup>b</sup> | 90.8 <sup>c,f</sup> | 92.7 <sup>c,d</sup> | 91.4 <sup>d,e</sup> | 100.5 <sup>a</sup>    | 89.6 <sup>f</sup>   | 74.9 <sup>g*</sup>  | 93.7 <sup>c</sup>  |
| Tentáculos          | 91.5 <sup>a</sup>   | 90.5 <sup>b</sup> | 85.5 <sup>d</sup>   | 84.4 <sup>e</sup>   | 82.1 <sup>f</sup>   | 88.5 <sup>c</sup>     | 81.3 <sup>f</sup>   | 70.1 <sup>g*</sup>  | 86.4 <sup>d</sup>  |

Valor medio de actividad residual (%) con diferente superíndice son significativamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ).

\*Valor medio significativamente menor.

**ANEXO 12. Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey de actividad de extractos proteolíticos parcialmente purificados de *I. fuscus*.**

**Cromatografía de intercambio aniónico en lote.**

**Análisis de varianza**

| Fuente de variación | Media cuadrática | gl | Sig.  |
|---------------------|------------------|----|-------|
| Músculo ventral     | 690667.645       | 5  | 0.001 |
| Tracto digestivo    | 28280.135        | 5  | 0.001 |
| Tentáculos          | 57548.515        | 5  | 0.001 |

**Comparación múltiple de medias de Tukey**

| Fuente de variación | Fracciones purificadas |                    |                     |                    |                      |                     |
|---------------------|------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|----------------------|---------------------|
|                     | F1                     | F2                 | F3                  | F2 pp.60% >100 kDa | F3 pp.60% >100 kDa   | Extracto crudo      |
| Músculo ventral     | 81.8 <sup>c</sup>      | 68.5 <sup>c</sup>  | 808.3 <sup>b</sup>  | 317.5 <sup>c</sup> | 1438.6 <sup>a*</sup> | 648.7 <sup>b</sup>  |
| Tracto digestivo    | 212.8 <sup>c</sup>     | 247.0 <sup>b</sup> | 495.2 <sup>a*</sup> | 124.8 <sup>d</sup> | 150.1 <sup>d</sup>   | 266.2 <sup>c</sup>  |
| Tentáculos          | 83.2 <sup>c</sup>      | 255.7 <sup>b</sup> | 513.8 <sup>a*</sup> | 31.7 <sup>d</sup>  | 95.7 <sup>c</sup>    | 319.8 <sup>a*</sup> |

Valor medio de actividad específica (U/mg) con diferente superíndice son significativamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ).

\*Valor medio significativamente mayor.

Donde: F1=No retenido; F2=Eluido 0.25 M; F3=Eluido 0.50 M; F2pp.60%>100kDa=F2 precipitado 60% >100 kDa; F3pp.60%>100kDa=F3 precipitado 60% >100 kDa.

Ver el apartado de abreviaturas.

**ANEXO 13. Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey del efecto del pH sobre la actividad de extractos proteolíticos parcialmente purificados de *I. fuscus*.**

**Análisis de varianza**

| Fuente de variación | Media cuadrática | gl | Sig.  |
|---------------------|------------------|----|-------|
| Músculo ventral     | 2187034.700      | 8  | 0.001 |
| Tracto digestivo    | 32338.613        | 8  | 0.001 |
| Tentáculos          | 10654914.000     | 8  | 0.001 |

**Comparación múltiple de medias de Tukey**

| Fuente de variación | pH                   |                     |                      |                      |                      |                        |                      |                      |                       |
|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
|                     | 2                    | 3                   | 4                    | 5                    | 6                    | 7                      | 8                    | 9                    | 10                    |
| Músculo ventral     | 242.8 <sup>e</sup>   | 202.8 <sup>e</sup>  | 231.8 <sup>e</sup>   | 338.7 <sup>e</sup>   | 703.3 <sup>d</sup>   | 831.2 <sup>c,d</sup>   | 1438.6 <sup>b</sup>  | 939.9 <sup>c</sup>   | 3007.3 <sup>a*</sup>  |
| Tracto digestivo    | 901.4 <sup>d,e</sup> | 812.3 <sup>f</sup>  | 845.1 <sup>e,f</sup> | 941.8 <sup>c,d</sup> | 1165.8 <sup>a*</sup> | 885.8 <sup>d,e,f</sup> | 1046.6 <sup>b</sup>  | 1143.8 <sup>a*</sup> | 1014.6 <sup>b,c</sup> |
| Tentáculos          | 9653.7 <sup>g</sup>  | 9220.9 <sup>h</sup> | 10355.2 <sup>f</sup> | 6491.6 <sup>i</sup>  | 13471.9 <sup>b</sup> | 13660.4 <sup>a*</sup>  | 12787.8 <sup>c</sup> | 11691.9 <sup>d</sup> | 10592.6 <sup>c</sup>  |

Valor medio de actividad específica (U/mg) con diferente superíndice son significativamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ).

\*Valor medio significativamente mayor.

**ANEXO 14. Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey del efecto de la temperatura sobre la actividad de extractos proteolíticos parcialmente purificados de *I. fuscus*.**

**Ensayo a pH 6**

**Análisis de varianza**

| Fuente de variación | Media cuadrática | gl | Sig.  |
|---------------------|------------------|----|-------|
| Músculo ventral     | 71689.695        | 5  | 0.001 |
| Tracto digestivo    | 127820.618       | 6  | 0.001 |
| Tentáculos          | 14748607         | 5  | 0.001 |

**Comparación múltiple de medias de Tukey**

| Fuente de variación | Temperatura (°C)     |                     |                     |                     |                      |                      |                    |
|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|--------------------|
|                     | 10                   | 20                  | 30                  | 37                  | 50                   | 60                   | 70                 |
| Músculo ventral     | 404.3 <sup>b</sup>   | 484.8 <sup>b</sup>  | 94.9 <sup>c</sup>   | ----                | 621.5 <sup>a*</sup>  | 393.3 <sup>b</sup>   | 210.5 <sup>c</sup> |
| Tracto digestivo    | 1043.3 <sup>c</sup>  | 487.7 <sup>f</sup>  | 982.7 <sup>d</sup>  | 1165.8 <sup>b</sup> | 1131.8 <sup>b</sup>  | 1256.4 <sup>a*</sup> | 908.7 <sup>e</sup> |
| Tentáculos          | 8837.0 <sup>a*</sup> | 3334.9 <sup>d</sup> | 2680.4 <sup>e</sup> | 5472.5 <sup>c</sup> | 8753.2 <sup>a*</sup> | 7716.7 <sup>b</sup>  | ----               |

Valor medio de actividad específica (U/mg) con diferente superíndice son significativamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ).

\*Valor medio significativamente mayor.



### Ensayo a pH 8

#### Análisis de varianza

| Fuente de variación | Media cuadrática | gl | Sig.  |
|---------------------|------------------|----|-------|
| Músculo ventral     | 223407.032       | 5  | 0.001 |
| Tracto digestivo    | 96571.671        | 6  | 0.001 |
| Tentáculos          | 10441684.000     | 6  | 0.001 |

#### Comparación múltiple de medias de Tukey

| Fuente de variación | Temperatura (°C)     |                      |                      |                     |                        |                      |                      |                      |
|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                     | 10                   | 20                   | 30                   | 37                  | 40                     | 50                   | 60                   | 70                   |
| Músculo ventral     | 752.4 <sup>a*</sup>  | 751.3 <sup>a*</sup>  | ----                 | 798.2 <sup>a*</sup> | ----                   | 312.9 <sup>c</sup>   | 530.7 <sup>b</sup>   | 134.3 <sup>d</sup>   |
| Tracto digestivo    | 1574.3 <sup>c</sup>  | 1545.4 <sup>d</sup>  | 1540.5 <sup>d</sup>  | ----                | 1635.8 <sup>b</sup>    | 1915.8 <sup>a*</sup> | 1305.2 <sup>e</sup>  | 1251.9 <sup>f</sup>  |
| Tentáculos          | 15956.9 <sup>d</sup> | 19626.8 <sup>b</sup> | 21589.9 <sup>a</sup> | ----                | 18810.1 <sup>b,c</sup> | 22082.1 <sup>a</sup> | 18438.4 <sup>c</sup> | 16736.9 <sup>d</sup> |

Valor medio de actividad específica (U/mg) con diferente superíndice son significativamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ).

\*Valor medio significativamente mayor.

### ANEXO 15. Análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey de purificación de proteínas de *I. fuscus* por HPLC.

#### Análisis de varianza

| Fuente de variación | Media cuadrática | gl | Sig.  |
|---------------------|------------------|----|-------|
| Músculo ventral     | 1.1E+008         | 5  | 0.001 |
| Tracto digestivo    | 559105.399       | 9  | 0.001 |
| Tentáculos          | 4350194.400      | 9  | 0.001 |

#### Comparación múltiple de medias de Tukey

| Fuente de variación | Fracciones purificadas |                    |                    |                       |                    |                    |
|---------------------|------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|
|                     | I                      | II                 | III                | IV                    | V                  | VI                 |
| Músculo ventral     | 206.6 <sup>b</sup>     | 781.3 <sup>b</sup> | 302.7 <sup>b</sup> | 15497.6 <sup>a*</sup> | 470.7 <sup>b</sup> | 105.3 <sup>b</sup> |

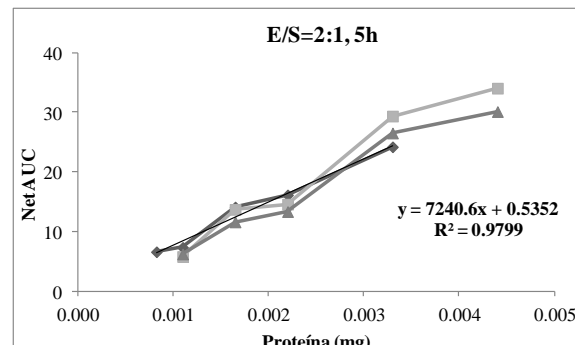
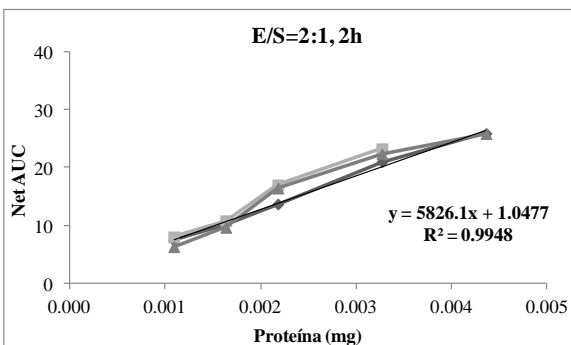
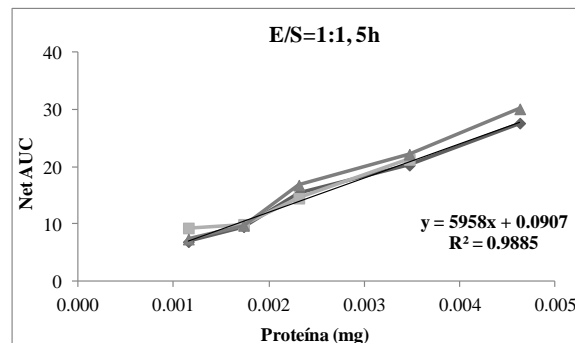
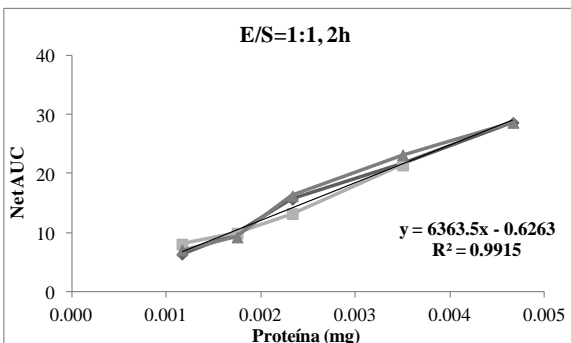
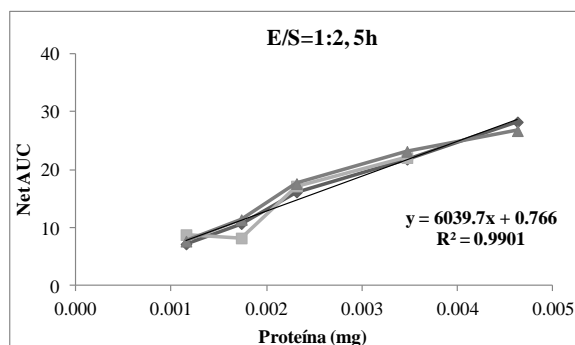
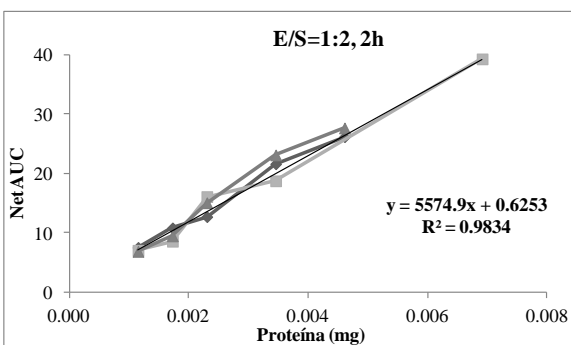
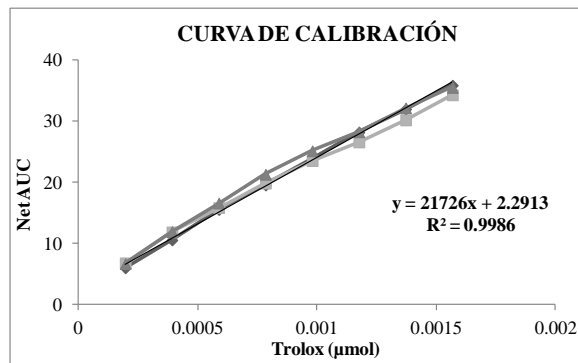
| Fuente de variación | Fracciones purificadas |                    |                     |                      |                     |                     |                    |                    |                      |                      |
|---------------------|------------------------|--------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
|                     | 1                      | 2                  | 3                   | 4                    | 5                   | 6                   | 7                  | 8                  | 9                    | 10                   |
| Tracto digestivo    | 867.1 <sup>b,c</sup>   | 416.1 <sup>d</sup> | 1142.5 <sup>b</sup> | 633.2 <sup>c,d</sup> | 1193.2 <sup>b</sup> | 1175.7 <sup>b</sup> | 366.4 <sup>d</sup> | 292.3 <sup>d</sup> | 1766.8 <sup>a*</sup> | 864.6 <sup>b,c</sup> |

| Fuente de variación | Fracciones purificadas |                    |                    |                       |                     |                     |                    |                    |                      |                    |
|---------------------|------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
|                     | A                      | B                  | C                  | D                     | E                   | F                   | G                  | H                  | I                    | J                  |
| Tentáculos          | 46.1 <sup>e</sup>      | 325.2 <sup>e</sup> | 292.3 <sup>e</sup> | 2159.5 <sup>b,c</sup> | 2340.8 <sup>b</sup> | 1889.3 <sup>c</sup> | 258.7 <sup>e</sup> | 318.0 <sup>e</sup> | 4293.2 <sup>a*</sup> | 696.4 <sup>d</sup> |

Valor medio de actividad específica (U/mg) con diferente superíndice son significativamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ).

\*Valor medio significativamente mayor.

**ANEXO 16. Curvas de calibración e hidrolizados de proteína del músculo de *I. fuscus* para el cálculo de actividad antioxidante.**



Donde:

Net AUC = Área bajo la curva neta de cinéticas de fluorescencia.

**Análisis de varianza**

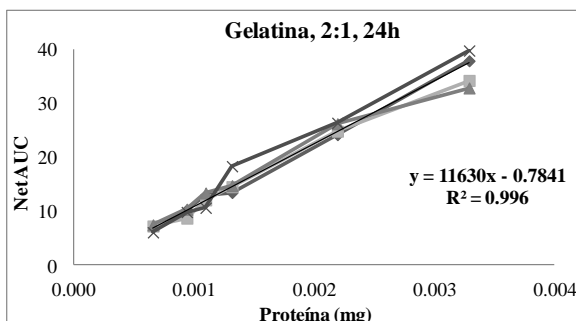
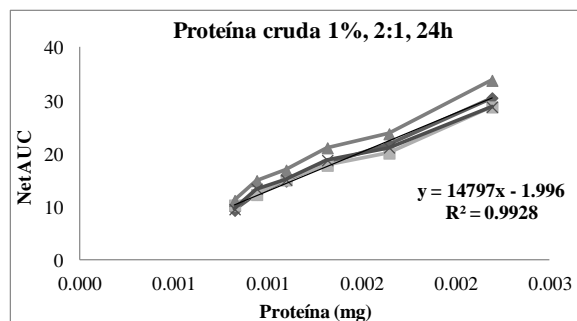
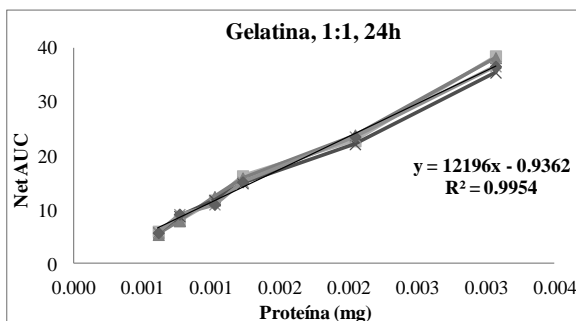
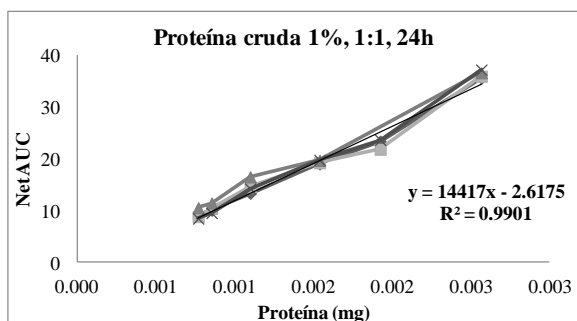
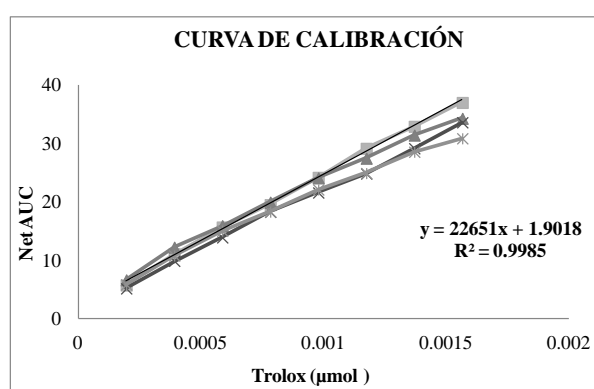
| Fuente de variación | Media cuadrática | gl | Sig.  |
|---------------------|------------------|----|-------|
| Hidrolizados        | 0.004            | 5  | 0.001 |

**Comparación múltiple de medias de Tukey**

| Fuente de variación | Relación enzima:sustrato, tiempo (h) |                      |                      |                      |                      |                    |
|---------------------|--------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------|
|                     | 1:2, 2h                              | 1:2, 5h              | 1:1, 2h              | 1:1, 5h              | 2:1, 2h              | 2:1, 5h            |
| Hidrolizados        | 0.283 <sup>b</sup>                   | 0.293 <sup>a,b</sup> | 0.303 <sup>a,b</sup> | 0.292 <sup>a,b</sup> | 0.313 <sup>a,b</sup> | 0.381 <sup>a</sup> |

Valor medio de ORAC con diferente superíndice son significativamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ).

**ANEXO 17. Curvas de calibración e hidrolizados de proteína y gelatina del músculo de *I. fuscus* para el cálculo de actividad antioxidante.**



Donde:

Net AUC = Área bajo la curva neta de cinéticas de fluorescencia.

**Análisis de varianza**

| Fuente de variación | Media cuadrática | gl | Sig.  |
|---------------------|------------------|----|-------|
| Hidrolizados a 24 h | 0.024            | 3  | 0.001 |

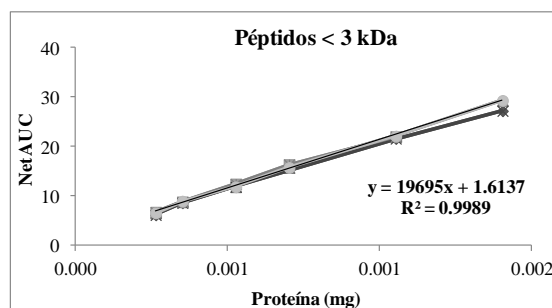
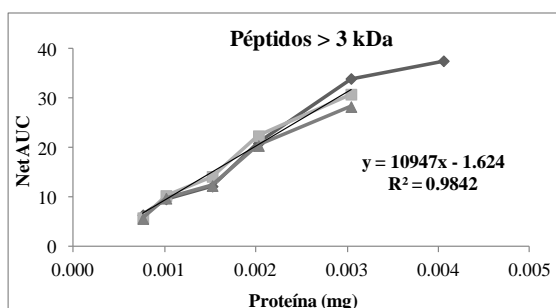
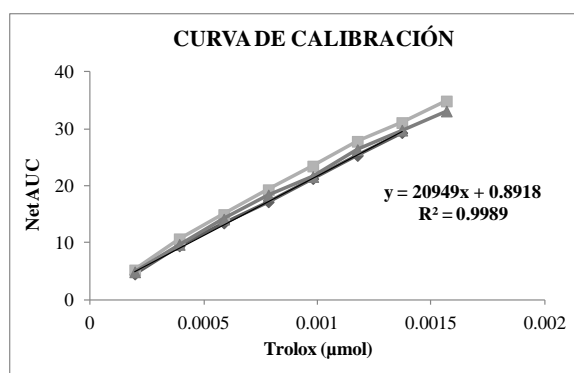
**Comparación múltiple de medias de Tukey**

| Fuente de variación | Sustrato, relación enzima:sustrato |                     |                    |                    |
|---------------------|------------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
|                     | Proteína, 1:1                      | Proteína, 2:1       | Gelatina, 1:1      | Gelatina, 2:1      |
| Hidrolizados a 24 h | 0.724 <sup>a*</sup>                | 0.698 <sup>a*</sup> | 0.615 <sup>b</sup> | 0.556 <sup>b</sup> |

Valor medio de ORAC con diferente superíndice son significativamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ).

\*Valor medio significativamente mayor.

**ANEXO 18. Curvas de calibración y péptidos de hidrolizado de proteína del músculo de *I. fuscus* para el cálculo de actividad antioxidante.**



Donde:

Net AUC = Área bajo la curva neta de cinéticas de fluorescencia.

**Análisis de varianza**

| Fuente de variación             | Media cuadrática | gl | Sig.  |
|---------------------------------|------------------|----|-------|
| Hidrolizado proteína, 1:1, 24 h | 0.266            | 1  | 0.001 |

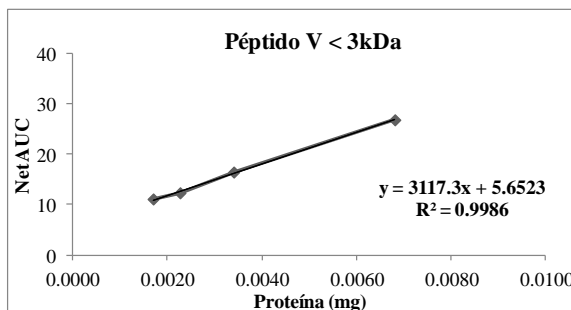
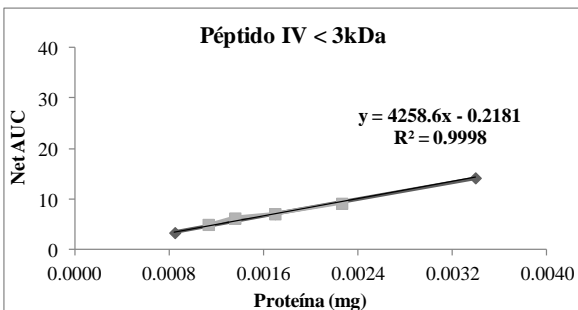
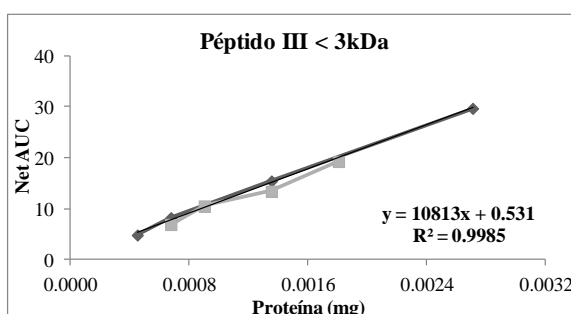
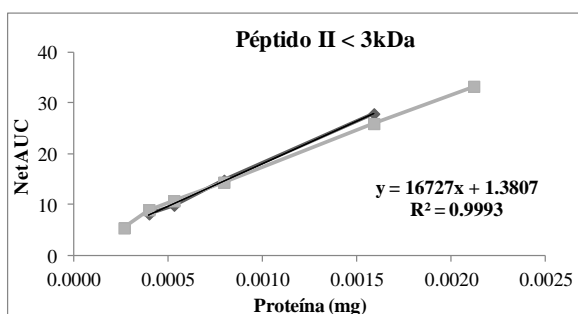
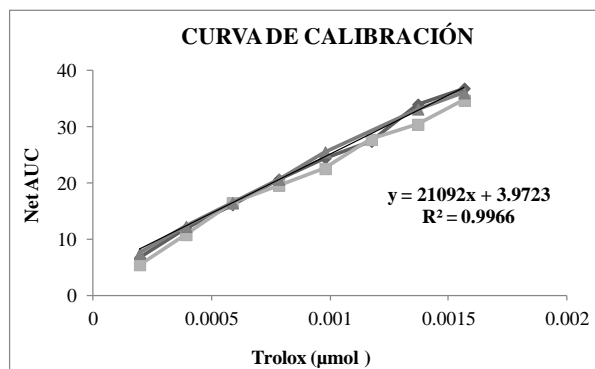
**Comparación múltiple de medias de Tukey**

| Fuente de variación             | Péptidos           |                     |
|---------------------------------|--------------------|---------------------|
|                                 | > 3 kDa            | < 3 kDa             |
| Hidrolizado proteína, 1:1, 24 h | 0.494 <sup>b</sup> | 0.916 <sup>a*</sup> |

Valor medio de ORAC con diferente superíndice son significativamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ).

\*Valor medio significativamente mayor.

**ANEXO 19. Curvas de calibración y péptidos purificados de hidrolizado de proteína del músculo de *I. fuscus* para el cálculo de actividad antioxidante.**



Donde:

Net AUC = Área bajo la curva neta de cinéticas de fluorescencia.

**Análisis de varianza**

| Fuente de variación | Media cuadrática | gl | Sig.  |
|---------------------|------------------|----|-------|
| Péptidos < 3 kDa    | 0.156            | 3  | 0.001 |

**Comparación múltiple de medias de Tukey**

| Fuente de variación | Péptidos purificados |                    |                    |                    |
|---------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                     | II                   | III                | IV                 | V                  |
| Péptidos < 3 kDa    | 0.738 <sup>a*</sup>  | 0.497 <sup>b</sup> | 0.184 <sup>c</sup> | 0.147 <sup>c</sup> |

Valor medio de ORAC con diferente superíndice son significativamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ).

\*Valor medio significativamente mayor.