



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección de Estudios de Posgrado e Investigación

“Caracterización bioquímica de la actividad de
Xaa-prolil dipeptidil aminopeptidasa (Xaa-Pro-DAP)
de la semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
**DOCTOR EN CIENCIAS
EN ALIMENTOS**

P R E S E N T A :

M.T. MARIA DE LA LUZ SANCHEZ MUNDO

Directores de Tesis

Dra. María Eugenia Jaramillo Flores

Dra. Consuelo del Carmen Bautista Muñoz



México, D. F., Diciembre 2010



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F., siendo las 12:00 horas del día 17 del mes de noviembre del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de Alimentos para examinar la tesis titulada:

Caracterización bioquímica de la actividad de Xaa-prolil dipeptidil aminopeptidasa (Xaa-pro-DAP) de la semilla de cacao (*Theobroma cacao*)

Presentada por el alumno:

Sánchez

Apellido paterno

Mundo

Apellido materno

María de la Luz

Nombre(s)

Con registro:

A	0	7	0	6	0	1
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

DOCTORADO

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directoras de tesis


Dra. María Eugenia Jaramillo Flores


Dra. Consuelo del Carmen Bautista Muñoz


Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López


Dra. Lidia Dorantes Alvarez


Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza

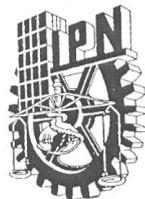

Dr. Humberto Hernández Sánchez

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


Dr. Manuel Jesús Piñón López



S. E. P.
Escuela Nacional de
Ciencias Biológicas
Sección de Estudios
de Posgrado
e Investigación



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F., el día **10** del mes de **Diciembre** del año 2010, el (la) que suscribe **María de la Luz Sánchez Mundo** alumna del Programa de **Doctorado en Ciencias en Alimentos** con número de registro **A070601**, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de **Dra. María Eugenia Jaramillo Flores y Dra. Consuelo del Carmen Bautista Muñoz** ceden los derechos del trabajo intitulado: **“Caracterización bioquímica de la actividad de Xaa-prolil dipeptidil aminopeptidasa (Xaa-pro-DAP) de la semilla de cacao (Theobroma cacao).”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: qfbluzsanchez@hotmail.com; jaramillo_flores@hotmail.com; cbautistam@colpos.mx; si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

M en C. María de la Luz Sánchez Mundo

Nombre y firma alumno (a)

Vo. Bo

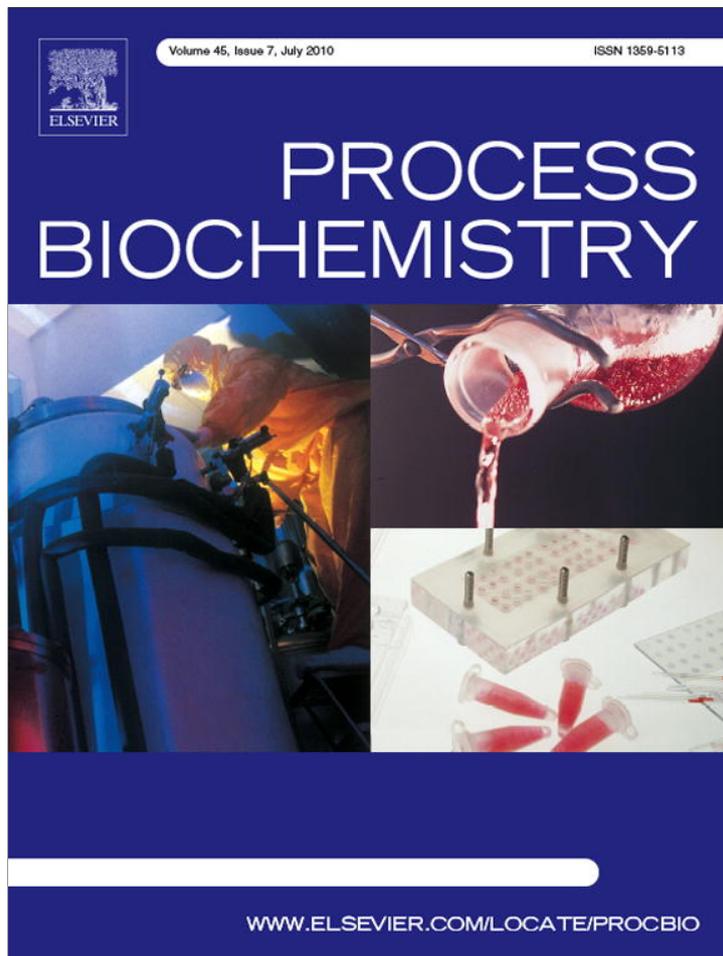
Dra. María Eugenia Jaramillo Flores

Director de Tesis

Dra. Consuelo del Carmen Bautista Muñoz

Director de Tesis

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

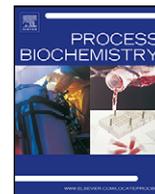
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio

Characterization of the exopeptidase activity existing in *Theobroma cacao* L. during germination

M.L. Sánchez-Mundo^a, C. Bautista-Muñoz^b, M.E. Jaramillo-Flores^{a,*}

^a *Graduados e Investigación en Alimentos, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Carpio y Plan de Ayala, CP 11340, México, DF, Mexico*

^b *Departamento de Biotecnología, Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, Periférico Carlos A. Molina S/N, CP 86500, Tabasco, Mexico*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 September 2009

Received in revised form 9 April 2010

Accepted 13 April 2010

Keywords:

Theobroma cacao L.

Xaa-Prolyl dipeptidyl aminopeptidase

Germination

Peptidase

ABSTRACT

The present work reports exopeptidase activity existing in cacao (*Theobroma cacao* L.) during germination. Aminopeptidase (APE), carboxypeptidase (CP) and Xaa-Prolyl dipeptidyl aminopeptidase (Xaa-Pro-DAP) membrane-bound enzymes have been identified. The Xaa-Pro-DAP enzyme (E.C. 3.4.14.5) had not been previously detected in germinating cacao seeds. Xaa-Pro-DAP was partially purified and characterized, and the highest activity was found after 10 days of germination. Xaa-Pro-DAP was isolated by precipitation with 40% ammonium sulfate and partially purified with two chromatographic steps. The enzyme had a relative molecular weight of 80 kDa as determined by Native-PAGE and was, able to use Ala-Pro-4 μ β NA as substrate. In the presence of SDS, this enzyme did not show activity because it must be in a trimer to be functional. Its activity was inhibited 44% by the chelating agent EDTA and 48% by the serine peptidase inhibitor PMSF at 0.1 mM, indicating that the partially purified Xaa-Pro-DAP is a serine metallopeptidase. The cations Cu²⁺ and Cd²⁺ caused 44% and 67% inhibition, respectively, while the other divalent cations tested had no significant effect on the activity of the partially purified enzyme. The enzyme showed a high specificity for Ala-Pro-pNA as a proteolytic substrate.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Peptidases carry out a large number of vital processes in plants, such as the proteolysis of proteins providing free amino acids. During the germination process, the biological activity of these peptidases increases due to the activation of pre-existing enzymes and the synthesis of new enzymatic molecules [1]. In dicotyledon seeds, such as cacao, degradation of reserve proteins produces an accumulation of free amino acids in cotyledons [2]. *Theobroma cacao* seeds contain albumins, globulins, prolamins and glutelins, albumins being the main protein fraction [3,4]. *T. cacao* L. has been described as a plant whose seed contains a vicilin-class globulin (but not legume-class) as storage protein [5]. The precursors of the cacao aroma are derived from these storage proteins by the proteolytic process that takes places during fermentation [6]. Hansen et al. [7] reported endopeptidase, aminopeptidase and carboxypeptidase activity in cacao seeds during fermentation. In ripe seeds that had not been germinated, the predominant proteolytic activity is attributed to aspartyl peptidase. This activity is found at very high levels in cacao seeds compared to the levels detected in seeds from other plants [8].

Xaa-Prolyl dipeptidyl aminopeptidase (dipeptidyl aminopeptidase IV) (Pep-XP, PepX; Xaa-Pro-DAP, EC 3.4.14.5) was first identified in rat liver [9] and was subsequently purified from various mammalian tissues and from lactic acid bacteria such as *Lactococcus* and *Lactobacillus* [10,11]. Xaa-Pro-DAP activity has also been reported in insects, yeast and plants [12–14]. The function of Xaa-Pro-DAP is not clearly established in plants, although its activity has been detected in poppy [13,14], gherkin seedlings [15], ginseng sprouts [16], and barley [17], and is suggested to play a role in the mobilization and/or utilization of storage proteins during germination. The present work contributes to the characterization of the exopeptidase activities of cocoa. Our aim was to isolate and characterize its exopeptidases, specifically the dipeptidyl aminopeptidase (Xaa-Pro-DAP) activity, present during the germination process of *T. cacao* L.

2. Materials and methods

2.1. Seed material and germination

T. cacao seeds of the criollo genotype were obtained from state of Tabasco, Mexico. For germination, seeds from which the testa had been removed were kept in wet agrolite at 25 °C over a 12 h period of light/darkness and the germinated seeds were collected every 24 h for 15 days after imbibition [18].

2.2. Acetone dry powder

Dry cacao powder (DCP) was obtained according to the method described by Hansen et al. [7]. Fat was removed from the powder by adding 10 ml/g 100% hexane

* Corresponding author at: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN, Carpio y Plan de Ayala, Casco de Santo Tomás, CP 11340, México, Mexico.

Tel.: +52 55 57296000x62464; fax: +52 55 57296000x62359.

E-mail address: jaramillo.flores@hotmail.com (M.E. Jaramillo-Flores).

at 4 °C and stirring constantly for 2 h. Finally, the solvent was eliminated from the sample and it was dried at 30 °C. To remove the polyphenols, the defatted seed powder was extracted five times with 80% (v/v) aqueous acetone and then three times with 100% acetone. The suspensions were centrifuged at 4 °C for 5 min at 5000 × g and 20,000 × g for the last three extractions. Finally, the solvent was evaporated from the resulting paste at room temperature. It was ground again until a homogeneous appearance was achieved. The dry powder, which was white/slightly yellow, was stored at –20 °C until analysis.

2.3. Enzyme extract

The enzyme extract was obtained from 15 mg of DCP and 30 mg of polyvinylpyrrolidone (PVPP) in 900 µl of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 1% Triton X-100. The mixture was stirred for 30 min at 37 °C and then centrifuged at 20,000 × g for 10 min at 4 °C.

2.4. Determination of enzymatic activity

The Xaa-Pro-DAP activity was measured by using Alanyl-proline-*p*-nitroanilide (Ala-Pro-*p*-NA; Bachem, Bubendorf, Switzerland) as substrate. The reaction mixture included 250 µl 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 1% Triton X-100; 120 µl distilled water, 30 µl substrate solution (10 mM in water), and 100 µl enzyme extract. After 30 min of incubation at 37 °C, the reaction was stopped with 400 µl ZnSO₄ (5% w/v) and 100 µl Ba(OH)₂ (7.5%, w/v), followed by centrifugation at 15,000 × g for 10 min. The absorbance of the *p*-nitroaniline liberated by the reaction was measured at 405 nm. One unit of Xaa-Pro-DAP (U) was defined as the amount of enzyme needed to liberate 1 µmol of *p*-nitroaniline from the substrate per minute under the standard assay conditions.

2.5. Protein concentration

Protein concentration was determined over the course of enzyme purification by the method of Folin-Lowry modified by Markwell et al. [19], using bovine serum albumin as a standard and measuring the absorbance at 280 nm.

2.6. Enzyme purification

2.6.1. Ammonium sulfate fractionation

The supernatant obtained in 2.3 was precipitated at 40% saturation of ammonium sulfate. The precipitate was collected by centrifugation at 17,000 × g for 20 min at 4 °C and the pellet obtained was dissolved in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) and dialyzed for 24 h at 4 °C with the same buffer. The protein concentration and Xaa-Pro-DAP activity were then determined.

2.6.2. Ion exchange chromatography

The protein fraction obtained by ammonium sulfate ammonia precipitation was applied to a High Q Macro-Prep® column (1.5 cm × 18 cm, Biorad, Hercules, CA 94547, USA) previously equilibrated with 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0). Fractions of 2 ml were collected at a flow rate of 0.2 ml/min with the same buffer; the elution was performed with a linear gradient of 0–1.0 M NaCl in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) at a flow rate of 0.2 ml/min, monitored at 280 nm (FPLC-Econo Pump, Biorad, Hercules, CA 94547, USA). The protein concentration and activity against Ala-Pro-*p*-NA were measured. Fractions with the highest enzyme activity were pooled, dialyzed against 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) at 4 °C, and concentrated by ultrafiltration with a 10 kDa molecular weight cutoff membrane (Amicon® Millipore).

2.6.3. Hydrophobic interaction chromatography

The active fractions from the High Q Macro-Prep were adjusted to 1.5 M ammonium sulfate and loaded onto an Octyl-Sepharose CL-4B column (1.5 cm × 18 cm, GE Healthcare SE-751 25 Uppsala, Sweden), previously equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 1.5 M ammonium sulfate. The bound proteins were eluted with a decreasing linear gradient of 1.5–0 M of ammonium sulfate in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), at a flow rate of 0.2 ml/min and fraction volume of 2 ml, monitored at 280 nm (FPLC-Econo Pump, Biorad, Hercules, CA, USA). Fractions with the highest enzyme activity were pooled, dialyzed against 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) at 4 °C, concentrated by ultrafiltration and used to characterize the enzyme. All the purification steps were conducted at 4 °C.

2.7. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and native-PAGE

SDS-PAGE was performed with 4% stacking and 12% separating gels according to Laemmli [20]. The gels were stained with the Silver Stain Plus (Biorad, USA) commercial kit. For the estimation of molecular weight after electrophoresis, were used one standard set (Amersham Pharmacia Biotech). Native-PAGE was performed by the method described by Benoist and Schwencke [21] and Degraeve and Martial-Gros [22] with slight modifications. After electrophoresis, the gel was incubated with 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0), the substrate Ala-Pro-4µβNA (10 mM dissolved in 30% DMSO) and a fresh mixture of 2 ml Fast Garnet GBC (11 mg/ml in

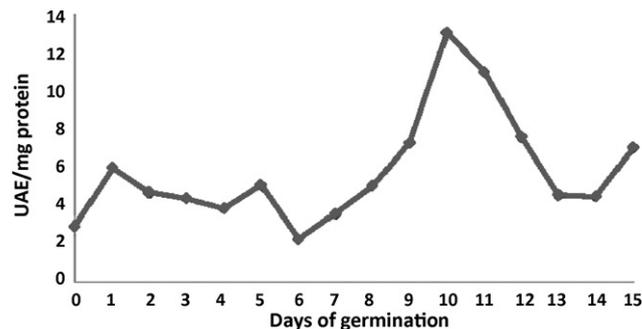


Fig. 1. Changes in the specific activity of Xaa-Pro-DAP during the germination process of cacao seeds of the criollo white almond genotype. Levels are reported as specific enzymatic activity in U/mg of protein.

50% DMSO) (Sigma Chemical, USA) at 37 °C until red or orange bands were observed, which indicate the presence of Xaa-Pro-DAP activity.

2.8. Dynamic light scattering analysis (DLS)

Analysis of the distribution of molecular size was carried out as a part of the protein characterization, using a Malvern Zetasizer Nano Series S-90 (Malvern Instruments, Malvern, England) instrument and analyzing the molecular diameters with the equipment software. Molecular diameter was determined over a temperature interval of 25–80 °C, with gradual increases of 10 °C.

2.9. Substrate specificity

The activity of the Xaa-Pro-DAP against *p*-nitroanilide substrates was determined according to the standard conditions described for the enzyme assay. The following substrates were used in the analysis: Arg-Pro-*p*-NA, Gly-Pro-*p*-NA, Ala-Ala-Pro-*p*-NA, and Ala-*p*-NA at both 1 and 10 mM. The lysyl and leucyl aminopeptidase activities were tested with Lys-*p*-NA and Leu-*p*-NA and the carboxypeptidase-type activity was tested with Bz-Tyr-*p*-NA.

2.10. Effects of inhibitors and reducing agents on enzyme activity

The effects of inhibitors and reducing agents on enzyme activity were studied in both the enzyme extract and the partially purified enzyme, using 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), *p*-chloromercuribenzoate (PCMB), dithiothreitol (DTT), leupeptin, pepstatin, bestatine, diprotine, pefabloc, β-mercaptoethanol and cysteine at concentrations of 0.1 and 1.0 mM. The enzyme was pre-incubated with inhibitors for 30 min at 37 °C and the remaining enzyme activity was determined using Ala-Pro-*p*-NA as a substrate. The activity of the enzyme assayed in the absence of inhibitors was taken as 100% [23–25].

2.11. Effects of metal ions on enzyme activity

The effects of several metal ions on enzyme activity were also investigated in the enzyme extract and partially purified enzyme. The enzyme was pre-incubated with 0.1 and 1.0 mM metal ions at 37 °C for 30 min. The following metal ions were used: Ba²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Cd²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ and Na⁺. The Xaa-Pro-DAP activity was determined by the standard assay as described above using Ala-Pro-*p*-NA as substrate. The activity of the enzyme without metallic ions was considered 100% [23,26].

3. Results and discussion

3.1. Germination

During the germination process, the level of Xaa-Pro-DAP enzymatic activity from day 0 to 8 did not change. After this point, it started to increase, reaching the highest activity values at 10–11 days with 13.03 UAE and 10.99 UAE and then decreasing in the days following germination (Fig. 1). These results may be related to the drastic changes in the protein vacuoles, as observed by electron microscopy, which took place after 10–13 days of germination. Protein vacuoles inflated and fused to form one central vacuole which appeared optically empty [6]. According to these results, Xaa-Pro-DAP together with other peptidases may play a role in the degradation of storage proteins during the germination of cacao

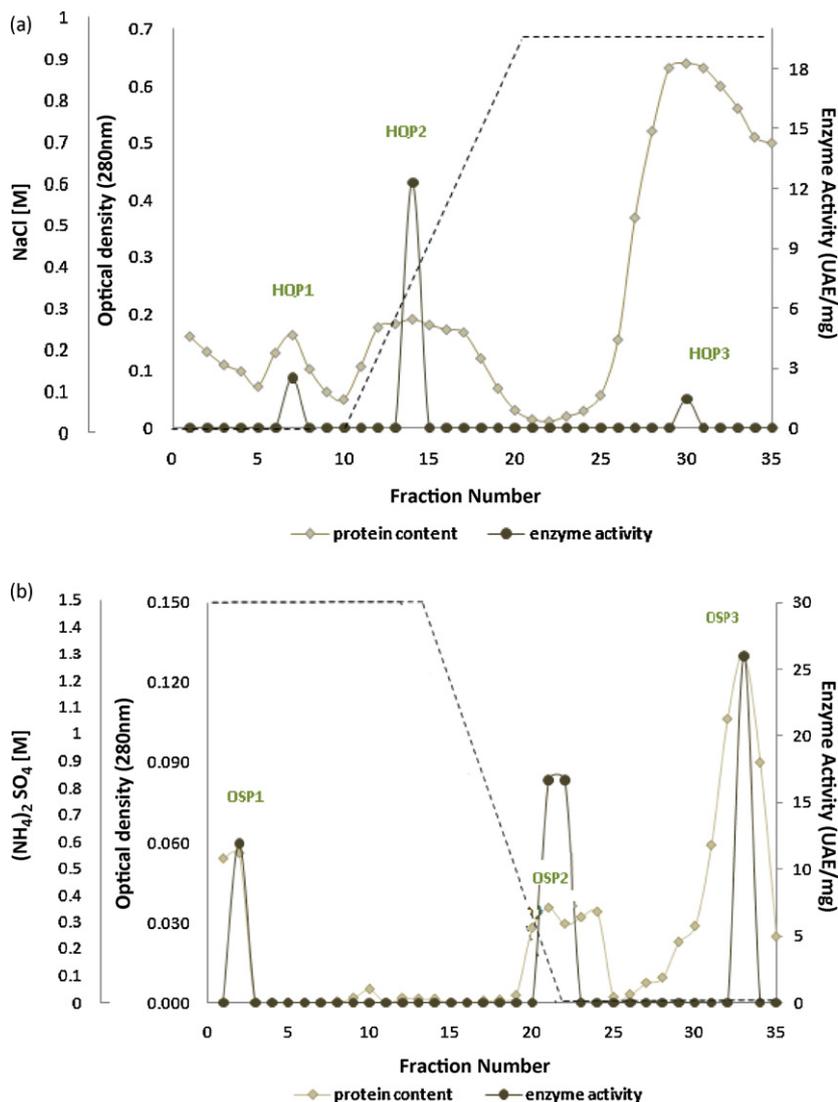


Fig. 2. Purification of the Xaa-Pro-DAP from the seeds of cacao *Theobroma cacao* germinated. (a) Ion exchange chromatography on HQ-Sepharose and (b) hydrophobic interaction chromatography on Octyl-Sepharose CL-4B.

seeds, taking part in the mobilization of the amino acids needed for the growth of the embryo. This last stage corresponds to the initiation of visible morphological changes, a function that has been attributed to the enzyme in other plants [13,14,16]. Therefore, the enzyme may be involved in the development of the plant and be expressed in other organs besides cotyledons.

3.2. Purification of the Xaa-Pro-DAP

The elution profile showed three peaks (HQP1, HQP2 and HQP3) containing the Xaa-Pro-DAP activity (Fig. 2a). The HQP1 peak (fractions 6–8) eluted before the saline gradient started. Elution of the HQP2 peak (fractions 10–13) was observed at 0.3 M NaCl, and therefore the fraction is weakly retained by the column, possi-

bly because of a low concentration of amino acid residues with a net negative charge. Finally, the HQP3 peak (fractions 30–32) was strongly retained in the column, eluting at 1 M NaCl. Peak 2 (HQP2) showed the highest enzymatic activity and was subjected to hydrophobic interaction chromatography on Octyl-Sepharose CL-4B, which gave three peaks containing the Xaa-Pro-DAP activity (Fig. 2b). The OSP1 peak (fractions 1–3) eluted at 1.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The OSP2 peak (fractions 20–23) eluted at 0.25 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and the OSP3 peak (fraction 33) eluted at 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The last peak (OSP3) had the highest enzymatic activity. After the final purification step, the enzyme was purified 37.53-fold with a yield of 21.97% and a specific activity of 16.66 UAE/mg protein. The results of the purification procedure are summarized in Table 1.

Table 1
Purification of Xaa-Pro-DAP of cacao seeds *Theobroma cacao* L.

Purification stage	Total protein (mg)	Total activity (U ^a)	Specific activity (UAE/mg)	Purification factor	Yield (%)
Crude extract	9.7684	4.3376	0.4440	1.00	100.00
Ammonium sulfate precipitate (40%)	4.9118	4.1433	0.8435	1.89	95.00
Ion exchange with HQ-sepharose	0.1460	1.796	12.3013	27.70	41.50
Hydrophobic interaction with octyl-sepharose	0.0572	0.9533	16.6660	37.53	21.97

^a An enzyme unit is defined as the amount of enzyme needed to liberate 1 mol pNA/min, using Ala-Pro-pNA as substrate.

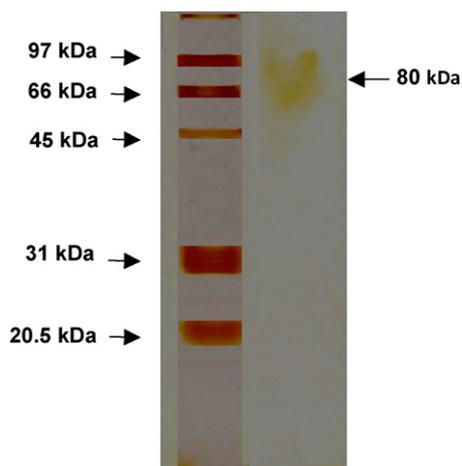


Fig. 3. Native-PAGE analysis of the enzymatic extract.

3.3. Determination of relative molecular weight and DLS analysis

The relative molecular weight of the native protein was estimated to be 80 kDa (Fig. 3). The enzyme shows no activity in presence of SDS, and therefore it must be in a polymeric state to be active (it is only active in the native state). This is due to the cooperative nature of the aggregation process and also because at some protein concentrations it is favorable for the molecule to aggregate because an increase in inter-molecular interactions between monomers results in a lower-energy state compared to the monomers alone. Through the study of the molecular dynamics in a solution of the enzymatic extract from a concentration of 0.09–0.019 mg/ml, it was observed that the monomer has a strong tendency to aggregate under native conditions (Fig. 4a). At 25 °C, a tetramer and a high molecular weight aggregate coexist (insert in Fig. 4a), the tetramer making up 97.3% of the population in the molecular-weight distribution. As the temperature increases, the tetramer breaks up into dimers with the presence of a polymer of very high molecular weight (showed in insert of Fig. 4a), which indicates the beginning of the denaturation process. At 40 °C, octamers and dimers are observed, while at 50 °C pentamers and monomers coexist, and finally at 80 °C only monomers of the protein are found. These monomers have, a diameter of 33.28 nm and a Pdl of 0.072, in the form of a mono-dispersed system (Fig. 4b). The partially purified enzyme at a concentration of 0.1416 mg/ml was a single species of 166 nm in molecular diameter (Fig. 4b).

3.4. Exopeptidase activities in *T. cacao* L.

The peptidases identified in our purification process were solubilized at neutral pH using 1% Triton X-100, indicating that they are membrane-bound enzymes. The difficulty in achieving the complete solubilization of cacao enzymes is probably one reason for the lack of available information on their properties. The results of testing the enzymatic activity on different substrates are shown in Table 2. Regarding the different substrates tested in the present work, the degree of hydrolysis at a concentration of 10 mM substrate was as follows, from the highest to lowest: Ala-pNA > Gly-Pro-pNA > Ala-Pro-pNA > Leu-pNA > Ala-Ala-Pro-pNA > Arg-Pro-pNA > Bz-Tyr-pNA > Lys-pNA. The highest activity toward substrates with X-Pro as the N-terminal sequence was found for Gly-Pro-pNA, followed by Ala-Pro-pNA, Ala-Ala-Pro-pNA and Arg-Pro-pNA. The relative activities toward these substrates showed that the N-terminal residue exerts an effect on the specificity of the enzyme with the following order of preference: glycine, alanine and arginine. Aminopeptidase activity (APE)

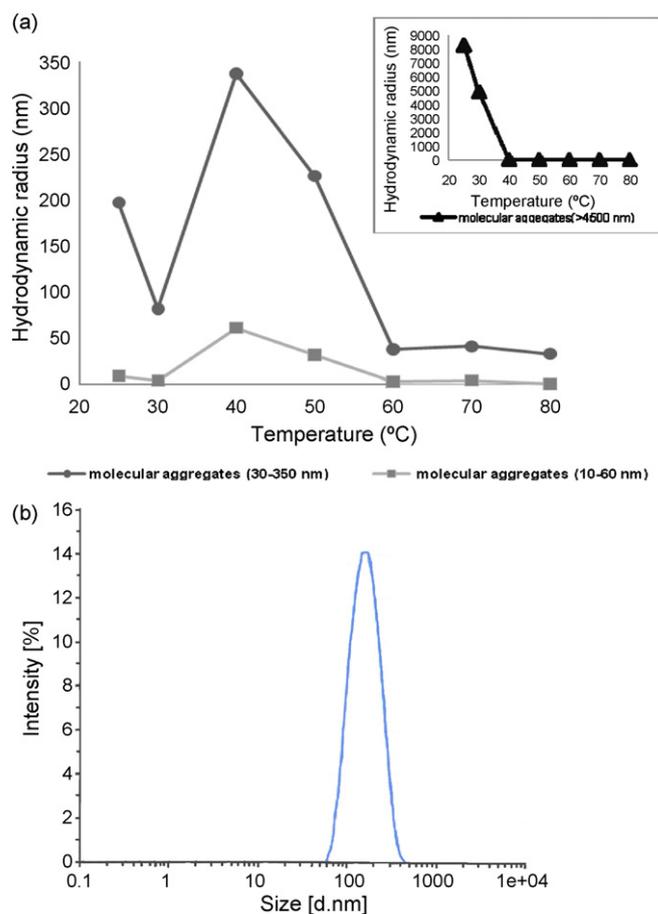


Fig. 4. Distribution of the molecular size during the thermal treatment of Xaa-Pro-DAP (a) and size distribution of Xaa-Pro-DAP in native conditions at 25 °C (b).

was also identified and the highest values were found for the substrates Ala-pNA followed by Leu-pNA, both at 10 mM. Non-specific aminopeptidase (Type N) (E.C. 3.4.11.1) is an aminopeptidase with wide substrate specificity that has been found in numerous strains

Table 2

Exopeptidase activity of *Theobroma cacao* towards various chromogenic substrates.

Substrate ^a	Specific activity (UAE ^b /mg) (mean value ± S.D. (n = 3))	
	1 mM	10 mM
Enzymatic extract		
Ala-pNA	1.51 ± 0.022	2.35 ± 0.017
Gly-Pro-pNA	0.93 ± 0.003	1.91 ± 0.001
Ala-Pro-pNA	0.88 ± 0.030	1.73 ± 0.011
Leu-pNA	0.70 ± 0.016	1.62 ± 0.000
Ala-Ala-Pro-pNA	0.81 ± 0.001	1.30 ± 0.023
Arg-Pro-pNA	0.52 ± 0.009	1.14 ± 0.005
Bz-Tyr-pNA	0.59 ± 0.007	0.90 ± 0.060
Lys-pNA	0.90 ± 0.001	0.73 ± 0.009
Partial purified Xaa-Pro-DAP		
Ala-Pro-pNA	4.81 ± 0.001	24.06 ± 0.001
Gly-Pro-pNA	2.84 ± 0.002	6.41 ± 0.002
Arg-Pro-pNA	1.09 ± 0.002	4.37 ± 0.001
Ala-Ala-Pro-pNA	0.65 ± 0.001	2.18 ± 0.002
Leu-pNA	0.65 ± 0.001	1.33 ± 0.001
Bz-Tyr-pNA	0.241 ± 0.001	0.547 ± 0.003
Lys-pNA	n.d.	0.459 ± 0.002
Ala-pNA	n.d.	n.d.

n.d.: not detected.

^a pNA: p-Nitroanilide; Bz: benzoyl.

^b An enzyme unit is defined as the amount of enzyme needed to liberate 1 mol pNA/min.

of lactic acid bacteria. It is very active on Lys-*p*NA, Leu-*p*NA [27] and Ala-*p*NA [25]. APE has been reported as the second most prevalent enzyme after aspartic peptidase (AP) (E.C. 3.4.23) in fermented cacao seeds. Therefore, the substrate Lys-*p*NA was also tested, which had a lower degree of hydrolysis compared to Ala-*p*NA and Leu-*p*NA at 10 mM. Regarding Lys-*p*NA, a higher activity at 1 mM was observed than at 10 mM, which suggests a substrate inhibition phenomenon against the APE enzyme. The substrate Bz-Tyr-*p*NA was hydrolyzed at a higher proportion at 10 mM than at 1 mM, confirming the presence of carboxypeptidase activity (CP) (E.C. 3.4.17). A synergistic activity between aspartyl peptidase and carboxypeptidases has been reported during cacao fermentation [28]. In a similar manner, Xaa-Pro-DAP of *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1 and non-specific aminopeptidase (Type N) showed a synergistic effect in boosting the degree of gluten hydrolysis [29]. Therefore, our results show that these enzymes work in a concerted manner during the germination process to degrade the storage proteins, a process required in the formation of seedlings. Xaa-Pro-DAP is important in cacao because cacao seeds contain a group of proteins that have proline in their structure (at concentrations of 0.72–1.97%), which are the natural substrates of the enzyme [30].

As shown in Table 2, the specificity of the partially purified Xaa-Pro-DAP of *T. cacao* was observed with -*p*NA substrates. Maximum hydrolysis rates were obtained when proline was in the N-penultimate position. Among colorimetric substrates, Ala-Pro-*p*NA was hydrolyzed at the highest rates, which indicates a high preference for the amino acid Ala adjacent to proline, followed by Gly-Pro-*p*NA, Arg-Pro-*p*NA and Ala-Ala-Pro-*p*NA. The degree of hydrolysis increased in all the substrates with X-Pro as the N-terminal sequence compared with the extract, indicating higher Xaa-Pro-DAP activity due to the purification process, which also decreased the aminopeptidase and carboxypeptidase concentration. A similar substrate preference was reported for the enzyme purified from *L. sakei*, which hydrolyzed substrates with an X-Pro amino terminus almost exclusively [11] showing preference for Ala, Arg and Gly, in decreasing order [24].

Hydrolysis of the substrates Leu-*p*NA (1 and 10 mM), Lys-*p*NA and Bz-Tyr-*p*NA (10 mM) was detected, indicating that leucine-aminopeptidase and carboxypeptidase enzymes were still present in the partially purified enzyme fractions, though their activities were quite low when compared with that of partially purified Xaa-Pro-DAP activity. Leu-*p*NA maintained the hydrolysis level detected in the enzymatic extract, whereas Lys-*p*NA and Bz-Tyr-*p*NA decreased their activities to almost half of what was detected in the extract. The Ala-*p*NA substrate was not hydrolyzed, indicating the absence of a non-specific aminopeptidase. It was clear however, that the Xaa-Pro-DAP activity increased almost 10 times compared to the activity found in the enzymatic extract over the course of the purification. Until now, there has been scarce information about the biochemical characteristics of aminopeptidases and carboxypeptidases present in cocoa.

3.5. Effect of inhibitors on enzyme activity

Table 3 shows the effects of inhibitors on the Xaa-Pro-DAP activity from the enzyme extract of *T. cacao*. The best inhibitors at 0.1 mM were PMSF, PCMB and pepstatin, which caused a decrease of 54, 40 and 39% of the maximum activity, respectively. Increases in inhibitory power directly proportional to concentration were only observed with leupeptatin (12–29%), diprotine (18–29%) and PCMB (40–49%). Among chemicals that react with sulfhydryl groups, β -mercaptoethanol, cysteine and dithiothreitol had no effect. Incubation with PCMB yielded a considerable inactivation of the Xaa-Pro-DAP activity. This indicates the possible involvement of functional sulfhydryl group(s) at or near the active site of the enzyme, which confirms the presence of a cysteine peptidase,

Table 3

Effect of inhibitors/activators on the exopeptidase activity in *Theobroma cacao* L.

Inhibitor ^a	Relative activity ^b (%)			
	Enzymatic extract		Partial purified Xaa-Pro-DAP	
	0.1 mM	1.0 mM	0.1 mM	1.0 mM
Diprotine A	82	71	76	86
PMSF	46	68	52	83
EDTA	89	79	56	61
PCMB	60	51	115	99
Leupeptin	80	76	92	64
Pepstatin A	61	80	82	84
Bestatine	86	154	75	126
AESBF	102	112	91	97
Pefabloc	115	131	92	101
Cysteine	109	104	64	92
β -Mercaptoethanol	72	115	74	97
Dithiothreitol	85	109	62	70
Blank	100	100	100	100

^a PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; PCMB, *p*-chloromercuribenzoate; AESBF, 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride.

^b Expressed as a percentage of hydrolysis of Ala-Pro-*p*NA in the absence of any added chemical agent, which was given a value of 100%.

which has been previously isolated [31]. These authors mention that it is very likely that it does not take part in the hydrolysis of storage proteins in ungerminated seeds. On the other hand, its activity increases during the germination process when the degradation of globular storage proteins occurs. Although all the Xaa-Pro-DAP originating from dairy lactic acid bacteria cited in the literature are considered serine enzymes, many authors have reported that sulfhydryl groups may also be important for the enzyme activity [32,33].

Regarding the specific inhibitors of serine peptidases tested such as leupeptatin, AESBF, pefabloc, and PMSF, only leupeptin and PMSF had an inhibitory effect. The presence of a carboxypeptidase has been reported in cacao, which has been characterized as a serine peptidase that acts on hydrophobic amino acids and is inhibited by PMSF. Differences observed among different inhibitors of serine peptidase show that the sulfonation of the protein is a more effective mechanism of inhibition than acylation. The Xaa-Pro-DAP activity was reduced by 39% by 0.1 mM pepstatin A, an inhibitor of aspartic peptidase, but this effect decreased at 1 mM, probably due to the inactivation of the aspartic peptidase present in the extract, reflecting less proteolytic action on Xaa-Pro-DAP by aspartic peptidase. It is known that the AP activity remains constant during the first days of germination and it does not decrease before the onset of globulin degradation [34]. The inhibitors of metallopeptidases analyzed in the present study showed inhibition in the range of 0–14% for bestatine, 18–29% for diprotin A, and 11–21% for EDTA. According to these results, the enzymatic extract of germinated *T. cacao* contains a cysteine metallopeptidase besides the carboxypeptidase and aminopeptidase. The carboxypeptidase and aminopeptidase were originally identified in cacao and other plants as metallopeptidases [35,36].

To determine the biochemical properties of the partially purified Xaa-Pro-DAP, the enzyme activity was measured in the presence of different enzyme inhibitors (Table 3). One of the enzyme inhibitors was the chelating agent EDTA (0.1 mM), which caused a 44% decrease from the original activity, indicating that metal ions are involved in enzyme function or stability. This means that the partially purified Xaa-Pro-DAP is a metalloenzyme. This result differs from the report of Xaa-Pro-DAP of *Lactobacillus helveticus* ITG LH1 [22], which was not inactivated by metal chelating agents such as EDTA or 1, 10-phenanthroline. The partially purified Xaa-Pro-DAP activity was reduced by 25% by 0.1 mM bestatine, an inhibitor

Table 4
Effect of metallic cations on the exopeptidase activity in *Theobroma cacao* L.

Metal salt	Relative activity ^a (%)			
	Enzymatic extract		Partial purified Xaa-Pro-DAP	
	0.1 mM	1.0 mM	0.1 mM	1.0 mM
BaCl ₂	74	69	84	76
CoCl ₂	117	48	134	75
ZnCl ₂	70	59	77	85
CaCl ₂	104	49	96	82
CuCl ₂	74	52	63	56
MgCl ₂	89	115	72	98
CdCl ₂	97	55	98	33
NaCl	108	75	103	84

^a Expressed as a percentage of hydrolysis of Ala-Pro-pNA in the absence of any added metal salt, which was given a value of 100%.

of leucine-aminopeptidase, but this effect on activity decreased at 1 mM, probably due to the inactivation of the aminopeptidase present, reflecting less or none proteolytic action on Xaa-Pro-DAP by aminopeptidase. This enzyme was lightly inhibited by a dipeptidyl aminopeptidase inhibitor (diprotin A at 0.1 mM). Pepstatin A, which is an aspartic peptidase inhibitor, had no effect on its activity (Table 3). Under the same conditions, the enzyme was inhibited 48% and 36% by the serine peptidase inhibitor, PMSF at 0.1 mM and leupeptin at 1.0 mM. The effect of AEBSF and Pefabloc; other inhibitors of serine peptidase, was negligible (Table 3). The results from these serine peptidase inhibitors corroborate that Xaa-Pro-DAP is a serine peptidase.

Additionally, the reducing agents dithiothreitol, cysteine and β-mercaptoethanol as well as the sulfhydryl group reagent PCMB did not have any effect on its activity. These findings suggest that partially purified Xaa-Pro-DAP does not belong to the cysteine peptidase family. The cysteine peptidase activity identified in the enzymatic extract was not detected in semi-purified Xaa-Pro-DAP, likely due to its removal during the purifying process.

3.6. Effect of divalent cations on Xaa-Pro-DAP activity of *T. cacao* L.

Table 4 shows the effect of metal ions on the activity of Xaa-Pro-DAP in the enzymatic extract and partially purified enzyme.

Ca²⁺ and Mg²⁺ have been reported to increase the cysteine peptidase activity [37]; the absence of this effect on Xaa-Pro-DAP corroborates our conclusion that it is a serine peptidase rather than a cysteine peptidase. Co²⁺ and Ca²⁺ (1 mM) inhibited the enzyme activity by 52 and 51%, respectively, while the other divalent cations tested caused 31–48% inhibition. According to some authors, the cations Cu²⁺, Hg²⁺ and Zn²⁺ are strong inhibitors of the Xaa-Pro-DAP activity in bacteria such as *L. helveticus* CNRZ 32, *L. delbreckii* subsp. *bulgaricus* and *L. acidophilus*. In *Lactobacillus sakei* these cations had no significant inhibitory effect [24].

The Xaa-Pro-DAP activity decreases as the ionic strength increases by the effect of sodium chloride in the extract on *T. cacao*.

The activity of the partially purified enzyme was inhibited 44% and 67% by the presence of 1.0 mM Cu²⁺ and Cd²⁺, respectively. A similar inhibition by Cu²⁺ and Cd²⁺ was found for the Xaa-Pro-DAP of *L. sanfranciscensis* CB1 [11]. The other divalent cations tested had low or no effect on the partially purified enzyme (Table 4). Cobalt ions at 0.1 mM increased the enzyme activity by 34%, but this did not happen when the salt concentration was 1 mM. This effect is probably due to proteolytic cleavage of Xaa-Pro-DAP by the residual cobalt-activated carboxypeptidase and aminopeptidase. Some studies on the effect of cobalt on carboxypeptidases [38,39] and aminopeptidases [40,41] reported increases from 1.7 to 50 times the original activity using 4 μM to 1 mM CoCl₂. However, not every

aminopeptidase cited in the literature is considered to be cobalt-activated, and some authors have reported strong inhibition of a leucine-aminopeptidase by Co²⁺ at 10 mM [36,42].

Finally, the ionic strength difference caused by addition of 0.1 mM NaCl had no effect on the partially purified enzyme activity, while increasing the ionic strength decreased the enzymatic activity (Table 4).

The proteolytic system in the germinated *T. cacao* extract has been partially characterized, identifying lysine and leucine-aminopeptidase (APE), carboxypeptidase (CP) and Xaa-Prolyl dipeptidyl aminopeptidase (Xaa-Pro-DAP) membrane-bound enzymes. These peptidases may take part in the degradation of storage proteins during cacao germination in a synergistic manner. The Xaa-Pro-DAP activity detected in the enzymatic extract, with a relative molecular weight of 80 kDa, was active in the native state. The activity in the extract was sensitive to 0.1 mM PMSF, PCMB and pepstatin A, which inhibited activity by 54, 40 and 39%, respectively. All cations except Co²⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ decreased enzyme activity. The activation by reducing agents shows the presence of a cysteine metallopeptidase in the enzymatic extract of *T. cacao*. The partially purified Xaa-Pro-DAP enzyme showed a higher specificity for the Ala-Pro-pNA substrate but aminopeptidase and carboxypeptidase activities are still present. The activity of the partially purified enzyme was inhibited 44% by the chelating agent EDTA at 0.1 mM and 48% and 36% by the serine peptidase inhibitor, PMSF at 0.1 mM and leupeptin at 1.0 mM. The partially purified Xaa-Pro-DAP is a serine metallopeptidase. Because this Xaa-Pro-DAP has not been previously detected in cacao, the purification and characterization of this enzyme will help in the ongoing efforts to understand the proteolytic system of *T. cacao* and the role of these systems in the germination process.

Acknowledgements

This work was partially supported by funds from CONACyT Scholarship 217805 and PIFI. The authors M.E.J.F. and C.B.M. would like to acknowledge SNI/COFAA-IPN; EDI/IPN SIP/IPN Grants SIP-20100386 and CONACyT 46704-Z for financial support.

References

- [1] Ramakrishna V. Mobilization of albumins and globulins during germination of Indian bean (*Dolichos lablab* L. var. *lignosus*) seeds. *Acta Bot Croat* 2007;66:135–42.
- [2] Bewley JD. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 1997;9:1055–66.
- [3] Abecia-Soria L, Pezoa-García NH, Amaya-Farfan J. Soluble Albumin and Biological value of protein in cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans as a function of roasting time. *J Food Sci* 2005;70:294–8.
- [4] Zak D, Keeny P. Changes in cocoa proteins during ripening of fruit, fermentation, and further processing of cocoa beans. *J Agric Food Chem* 1976;24:483–6.
- [5] Voigh J, Biehl B. The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. *Food Chem* 1993;47:145–51.
- [6] Kratzer U, Frank R, Kalbacher H, Biehl B, Wöstemeyer J, Voigt J. Subunit structure of the vicilina-like globular storage protein of cocoa seeds and the origin of cocoa- and chocolate-specific aroma precursors. *Food Chem* 2009;113:903–13.
- [7] Hansen C, del Olmo M, Burri C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *J Sci Food Agric* 1998;77:273–81.
- [8] Voigt J, Biehl B, Heinrichs H, Marsoner S, Hugi A. In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. *Food Chem* 1994;49:173–80.
- [9] Hopsu-Havu V, Glenner G. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycy-prolyl-β-naphthylamida. *Histochemie* 1966;7:192–201.
- [10] Perez-Guzman A, Cruz y Victoria T, Cruz-Camarillo R. Purification and characterization of X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NRRL 634. *J Microbiol Biotech* 2006;22:953–8.
- [11] Gallo G, De Angelis M, McSweeney P, Rosaria M, Gobetti M. Partial purification and characterization of an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Food Chem* 2005;91:535–44.
- [12] Bordallo C, Schwencke J, Rendueles M. Localization of the thermosensitive X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase in the vacuolar membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 1984;173:199–203.

- [13] Ramakrishna V, Ramakrishna Rao P. Axial control of protein reserve mobilization during germination of Indian bean (*Dilochos lablab* L.) seeds. *Acta Biol Szeged* 2005;29:23–7.
- [14] Stano J, Kovács P, Psenak M, Gajdos J, Erdelsky K, Kákoniová D, et al. Distribution of dipeptidyl peptidase IV in organ tissue cultures of poppy plants *Papaver somniferum* L., cv 'Amarin'. *Pharmazie* 1997;52:319–21.
- [15] Stano J, Kovács P, Nemeč P, Neubert K. Dipeptidyl peptidase IV in gherkin seedlings *Cucumis sativus* L. cv. Pálava. *Biologia* 1994;49:905–10.
- [16] Stano J, Kovács P, Kákoniová D, Lisková D, Kirilova ND, Komov V. Activity of dipeptidyl peptidase IV in ginseng callus culture. *Biologia* 1994;49:905–10.
- [17] Davy A, Thomsen K, Juliano MA, Alves L, Svendsen I, Simpson D. Purification and characterization of barley dipeptidyl peptidase IV. *Plant Physiol* 2000;122:425–31.
- [18] Laloí M, McCarthy J, Morandi O, Gysler C, Bucheli P. Molecular and biochemical characterization of two aspartic proteinases TcAP1 y TcAP2 from *Theobroma cacao* seeds. *Planta* 2002;215:754–62.
- [19] Markwell M, Haas S, Bieber L, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978;87:206–10.
- [20] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage TA. *Nature* 1970;227:680–5.
- [21] Benoist P, Schwencke J. Native agarose-polyacrylamide gel electrophoresis allowing the detection of aminopeptidase, dehydrogenase, and esterase activities at the nanogram level: enzymatic patterns in some *Frankia* strains. *Anal Biochem* 1990;187:337–44.
- [22] Degraeve P, Martial-Gros A. Purification and partial characterization of X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase of *Lactobacillus helveticus* ITG LH1. *Int Dairy J* 2003;13:497–507.
- [23] Haddar A, Bougatef A, Agrebi R, Sellami-Kamoun A, Nasri M. A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and characterization. *Process Biochem* 2009;44:29–35.
- [24] Sanz Y, Toldrá F. Purification and characterization of an X-prolyl dipeptidyl peptidase from *Lactobacillus sakei*. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:1815–20.
- [25] Magboul A, McSweeney P. Purification and characterization of an X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024. *Sciences* 2000;80:385–96.
- [26] García-Alvarez N, Bordallo C, Gascon S, Suarez-Rendueles P. Purification and characterization of a thermosensitive X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase (dipeptidyl aminopeptidase yscV) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Acta* 1985;832:119–25.
- [27] Gómez de la Cruz MJ. Degradación de péptidos hidrófobos por bacterias lácticas. Aplicación en la eliminación del sabor amargo en queso. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, España, 1996. p. 21–22.
- [28] Biehl B, Voigt J. Biochemical approach to raw cocoa quality improvement. Comparison of seed proteins and proteases in their ability to produce cocoa aroma precursors. In: Paper presented at Malaysian international cocoa conference, 20E21. 1994.
- [29] Byun T, Kofod L, Blinkovsky A. Synergistic action of an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase and a non-specific aminopeptidase in protein hydrolysis. *J Agric Food Chem* 2001;49:2061–3.
- [30] Kalvatchev Z, Garzaro D, Guerra F. *Theobroma cacao* L.: Un nuevo enfoque para nutrición y salud. *Agroalimentaria* vol. 004, No. 61998; p. 23–25.
- [31] Biehl B, Ziegeler-Berghausen H, Srivastava S, Xiong Q, Passern D, Heinrichs H. Cocoa specificity of proteolytic flavor precursors: the cocoa seed proteases 1991. In: Proceedings of the 1991 international cocoa conference: challenges in the 1990s. 1991.
- [32] Miyakawa H, Hashimoto I, Nakamura T, Ishibashi N, Shimamura S, Igoshi K. Purification and characterization of an X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* LHE-511. *Milchwissenschaft* 1994;49:670–3.
- [33] Miyakawa H, Kobayashi S, Shimamura S, Tomita M. Purification and characterization of an X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LBU-147. *J Dairy Sci* 1991;74:2375–81.
- [34] Guilloteau M, Laloí M, Michaux S, Bucheli P, McCarthy J. Identification and characterization of the major aspartic proteinase activity in *Theobroma cacao* seeds. *J Sci Food Agric* 2005;85:549–62.
- [35] Tishinov K, Stambolieva N, Petrova S, Galunsky B, Nedkov P. Purification and characterization of the sunflower seed (*Helianthus annuus* L.) major aminopeptidase. *Acta Physiol Plant* 2009;31:199–205.
- [36] Mercado-Flores Y, Noriega-Reyes Y, Ramírez-Zavala B, Hernández Rodríguez C, Villa-Tanaca L. Purification and characterization of aminopeptidase (pumAPE) from *Ustilago maydis*. *FEMS Microbiol Lett* 2004;234:247–53.
- [37] Davy A, Svendsen I, Sorensen S, Sorensen M, Rouster J, Meldal M, et al. Substrate specificity of barley cysteine endoproteases EP-A and EP-B. *Plant Physiol* 1998;117:255–61.
- [38] Kishimura H, Hayashi K, Ando S. Characteristics of carboxipeptidase B from pyloric of the starfish *Asterina pectinifera*. *Food Chem* 2006;95:264–9.
- [39] Cheng T, Ramakrishnan V, Chan S. Purification and characterization of cobalt-activated carboxipeptidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Protein Sci* 1999;8:2474–86.
- [40] Dong L, Cheng N, Wang M, Zhang J, Chang S, De-Xu Z. The leucyl aminopeptidase from *Helicobacter pylori* is an allosteric enzyme. *Microbiology* 2005;151:2017–23.
- [41] Bolumar T, Sanz Y, Aristoy MC, Todra F. Purification and properties of an arginyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. *Int J Food Microbiol* 2003;86:141–51.
- [42] Mohamed S, El-Badry M, Hamdy S, Abdel-Ghany S, Salah H, Fahmy A. Faschiola gigantea: purification and characterization of a leucine aminopeptidase. *J Appl Sci Res* 2009;5:905–13.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue desarrollado en el Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politécnico Nacional y en el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Biotecnología del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, bajo la dirección de la Dra. María Eugenia Jaramillo Flores y de la Dra. Consuelo del Carmen Bautista Muñoz.

Este proyecto contó con el apoyo financiero del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACyT) por la beca 217805 otorgada y PIFI; SNI/COFAA-IPN; EDI/IPN SIP/IPN SIP-20100386 y Proyecto SEP/CONACyT Ciencia Básica 46704.

La materia prima, cacao criollo genotipo almendra blanca, cultivado en la hacienda “La Joya” del municipio de Cunduacán, Tabasco fue otorgada por Sra. Clara Echeverría.

“El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir”.

Albert Einstein

DEDICATORIAS

A mi familia:

A mis padres Pedro y Epifanía, a quienes les debo todo lo que soy, por confiar en mí por apoyarme en todos mis proyectos, por su ejemplo de lucha y darme la fortaleza para cumplirlos. A mi hermana, por su tenacidad y superación; a mi hermano Pedro, por su paciencia y capacidad... quienes con su cariño iluminan mi vida y me alientan en cada momento.....por ellos y para ellos!

Con Amor

Luz

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial a la *Dra. María Eugenia Jaramillo Flores* por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Por su apoyo y confianza en mi trabajo, por guiar mis ideas, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador. Muchas gracias....

Quiero expresar también mi agradecimiento a la *Dra. Consuelo Bautista*, por creer en mí para este proyecto, por invitarme a vivir una experiencia tan importante como mi formación como investigador. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

Agradezco a mi comité tutorial, la *Dra. Lidia Dorantes Alvarez* por sus siempre valiosas aportaciones durante todo el desarrollo de la tesis, al *Dr. Gustavo F. Gutiérrez* por sus sugerencias para enriquecer los alcances de esta tesis, a el *Dr. Humberto Hernández* a quien además de sus acertadas aportaciones al trabajo, agradezco haber respondido con un “S” a mi llamada urgente desde Tabasco!!!. Gracias. A la *Dra. Claudia Benitez Cardoza* por sus atentas y acertadas sugerencias en mejora del trabajo.

Para mis compañeros de laboratorio, doctorandos y posdocs, tengo sólo palabras de agradecimiento. A Rocío Mtz por ser la primera en brindarme su amistad sincera y su apoyo incondicional desde mi llegada al D.F., gracias amiguita chilanga. A Rocío Nava, por su amistad, por su compañía y por escucharme en mis momentos de crissis, gracias maestra. A Yanet por su cálida y sincera amistad y compartir momentos tan divertidos, gracias amigui oaxaqueña. A Abril por estar siempre al pendiente de la amistad y mostrarme que a pesar de la diferencia podemos coincidir., gracias abrioleja. Graciasss.....amiguis!.

De igual manera a *Raquel*, por compartir sus experiencias y brindarme su valiosa amistad, gracias Raquelito; a *Juan Torruco*, por ser un gran amigo que me brindo todo su apoyo desde mi llegada al programa y esta ciudad, gracias maestro., a *Herry Permady*, por tu amistad y compartir tus fines de semana con una gran comida, gracias Herriaty, a *Maricarmen*, por ser la primer y gran amiga que Dios puso en mi camino en esta ciudad; a *Gisela*, por su amistad y compañerismo en el mundo de las proteínas, gracias Gis.

A mis compañeros y amigos que me han acompañado durante éstos 4 años: a *Juan Pablo, Alex, Laura, Ivonne, Fabián, Quintanilla, Freddy, David, Jacobo*, por su amistad y apoyo en esta etapa especial de mi vida....mil mil gracias!.

A mis amigos de siempre, *Ricardo*, por su amistad y cariño durante casi toda la vida, a *Sagrario* por su cariño incondicional y de quien siempre he recibido palabras de aliento; a mi amiga *Oralia* por todo su apoyo y amistad. A *Juan Carlos Pale* porque a pesar del tiempo y la distancia siempre estas al pendiente de mis logros.

Con cariño

Luz

INDICE

RESUMEN ABSTRACT

1. ANTECEDENTES	11
1.1 Aspectos generales del cultivo de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	11
1.1.1. Origen y taxonomía	11
1.1.2. Botánica	12
1.1.3. Diversidad	13
1.2. Proceso de germinación	16
1.3. Clasificación y nomenclatura de las enzimas	20
1.3.1 Endopeptidasas	22
1.3.2 Exopeptidasas.....	22
1.4. Xaa proil dipeptidil aminopeptidasas (Xaa-Pro-DAP's)	22
1.4.1 Clasificación	22
1.4.2. Acción	23
1.4.3. Sustrato sintético.....	23
1.4.4. Mecanismo catalítico.....	23
1.4.5. Propiedades moleculares.....	25
1.4.6. Distribución	27
1.4.7. Aspectos biológicos.....	27
1.5 Purificación de proteínas	30
1.6. Enzimas hidrolíticas descritas en la semilla de <i>Theobroma cacao</i> L. .	41
2. JUSTIFICACION	43
3. HIPOTESIS	44
4. OBJETIVOS	44
4.1 Objetivo General	44
4.2 Objetivos Particulares	44
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	45
6. MATERIALES Y METODOS	46
6.1 MATERIAL BIOLÓGICO	46
6.1.1 Muestreo	46
6.1.2 Condiciones de germinación	46
6.2 METODOS	46
6.2.1 Determinación de humedad (Método de termobalanza)	46
6.2.2 Determinación de actividad de agua (Aw)	46
6.2.3 Obtención de polvos secos cetónicos de cacao o polvos secos de acetona	47
6.2.4 Extracto enzimático	47

6.2.5 Purificación de la enzima Xaa-Pro-DAP	47
6.2.5.1 <i>Precipitación fraccionada con sulfato de amonio</i>	47
6.2.5.2 <i>Diálisis y concentración de proteínas</i>	48
6.2.5.3 <i>Determinación de actividad enzimática</i>	48
6.2.5.4 <i>Determinación de proteínas</i>	48
6.2.5.5 <i>Cromatografía de Intercambio iónico</i>	49
6.2.5.6 <i>Cromatografía de Interacción hidrofóbica</i>	49
6.2.6 PAGE-Nativa	50
6.2.7 Teñido de actividad Xaa-Pro-DAP en gel.....	50
6.2.8 Electroelución.....	50
6.2.9 Determinación de pesos moleculares mediante SDS-PAGE	50
6.2.10 Tamaño molecular mediante dispersión dinámica de luz.....	51
6.2.11 Purificación de la cisteín peptidasa de <i>T. cacao</i> (tcCys)	51
6.2.11.1 <i>Obtención del extracto enzimático</i>	51
6.2.11.2 <i>Proceso de purificación</i>	52
6.3. CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE EXTRACTOS ENZIMATICOS Y ENZIMA Xaa-Pro-DAP	53
6.3.1. Determinación de actividad peptidasa.....	53
6.3.2. Efecto de inhibidores y agentes reductores sobre la actividad enzimática	53
6.3.3. Efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática.....	54
6.3.4. Determinación de la agregación (polimerización) molecular mediante Dispersión dinámica de luz	54
6.4 CARACTERIZACION DE tcCys	54
6.4.1. Zimograma	54
6.4.2. Ensayo enzimático (Actividad proteolítica).....	55
6.4.3. Peso molecular relativo	55
6.4.4. Efecto de inhibidores y agentes reductores	55
6.4.5. Efecto del pH sobre la actividad enzimática.....	56
6.4.6. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática	56
6.4.7. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad	56
7. RESULTADOS Y DISCUSION	57
7.1. Germinación.....	57
7.2 Caracterización del extracto enzimático E1 y purificación de la enzima Xaa-Pro-DAP.	61
7.2.1 Purificación de la Xaa-Pro-DAP.	61
7.2.2 Determinación del peso molecular relativo y tamaño molecular por dispersión dinámica de luz	63
7.2.3 Actividades exopeptidasa en el extracto E1 de <i>T. cacao</i> L.	66
7.2.4 Efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática.....	69
7.2.5 Efecto de cationes divalentes sobre la actividad Xaa-Pro-DAP de <i>T. cacao</i> L.....	72

7.3 Caracterización del extracto enzimático E2	74
7.3.1 Determinación de peso molecular relativo de Xaa-Pro-DAP en el extracto enzimático E2.	74
7.3.2 Actividad enzimática en el extracto enzimático E2 de <i>T. cacao</i>	75
7.3.4. Efecto de cationes divalentes y sodio sobre la actividad Xaa-Pro-DAP en el extracto enzimático E2	81
7.3.5. Interacciones proteína-catión mediante dispersión dinámica de luz en el extracto enzimático E2	84
7.3.6. Efecto de la temperatura y cationes sobre la actividad enzimática en el extracto enzimático E2	89
7.4 Purificación de la cisteín peptidasa (tcCys)	94
7.5 Caracterización de la cisteín peptidasa (tcCys)	98
7.5.1 Efecto del pH y temperatura sobre la actividad tcCys	98
7.5.2 Efecto de la temperatura en la estabilidad de tcCys	100
7.5.3 Efecto de inhibidores y agentes sulfhidrilos	101
8. CONCLUSIONES	104
9. PERSPECTIVAS	106
10. BIBLIOGRAFIA	107

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diversidad de frutos y semillas de cacao..	15
Figura 2. Tipos de germinación.	17
Figura 3. Curva de absorción de agua de las semillas y las actividades metabólicas asociadas con las diferentes fases.....	19
Figura 4. Mecanismo catalítico de la serin peptidasa, quimiotripsina con el sustrato cromógeno N-succinil-L-fenilalanina 4-nitroanilida.....	25
Figura 5. Estructura de una Xaa-Pro-DAP (DPP-IV [1N1M] de origen humano) ejemplo de la subfamilia S9B..	26
Figura 6. Esquema de la cromatografía de exclusión molecular.	37
Figura 7. Diagrama esquemático de la cromatografía de intercambio iónico..	39
Figura 8. Esquema ilustrativo de la cromatografía de afinidad	40
Figura 9. a) Cambios visibles ocurridos durante los 15 días de germinación de semillas de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.), b) cambios en la actividad enzimática de Xaa-Pro-DAP, contenido de humedad y actividad de agua, durante la germinación de semillas de cacao genotipo criollo almendra blanca.	60
Figura 10. Purificación de la Xaa-Pro-DAP de semillas de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L).....	62
Figura 11. PAGE-Nativa. Actividad Xaa-Pro-DAP detectada con el sustrato Alanina-Prolina-4-metoxi-βeta-naftilamida (Ala-Pro-4μβNA) en el extracto enzimático E1 al 40 % de saturación con (NH ₄) ₂ SO ₄	64
Figura 12. Análisis de distribución de tamaño molecular mediante dispersión dinámica de luz.....	65
Figura 13. PAGE-Nativa. Actividad de Xaa-Pro-DAP detectada con el sustrato Alanina-Prolina-4-metoxi-βeta-naftilamida (Ala-Pro-4μβNA) en el extracto enzimático E2 al 80% de saturación (NH ₄) ₂ SO ₄	74

Figura 14. Efecto de la temperatura sobre el tamaño de distribución de las interacciones en el extracto enzimático E2 con los cationes Ba^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} y Na^{1+} a 1 mM a) 25 °C, b) 40 °C, c) 60 °C + (inserto $CuCl_2$ 1 mM), d) 80 °C + (inserto $CdCl_2$ 1 mM).....	86
Figura 15. Efecto de la temperatura sobre el tamaño de distribución de las interacciones en el extracto enzimático E2 con a) Cu^{2+} a 25-60 °C b) Cd^{2+} a 25-80 °C.....	87
Figura 16. Efecto de cationes divalentes y sodio en la desnaturalización térmica de Xaa-Pro-DAP en el extracto enzimático E2 a) cationes a 0.1 mM y b) cationes a 1mM.	88
Figura 17. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de Xaa-Proilil dipeptidil aminopeptidasa (Xaa-Pro-DAP) y sus interacciones con $CoCl_2$ y $CdCl_2$ a concentraciones de 0.1 mM y 1 mM.	90
Figura 18. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de aminopeptidasa (APE) y sus interacciones con $CoCl_2$ y $CdCl_2$ a concentraciones de 0.1 mM y 1 mM.....	92
Figura 19. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de carboxipeptidasa (CP) y sus interacciones con $CoCl_2$ y $CdCl_2$ a concentraciones de 0.1 mM y 1.0 mM.....	93
Figura 20. Zimograma del extracto enzimático de T. cacao.	94
Figura 21. Cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sepharosa.....	95
Figura 22. Análisis SDS-PAGE de las fracciones provenientes de la cromatografía de intercambio aniónico DEAE-Sepharosa.	96
Figura 23. Fraccionamiento de tcCys en cromatografía de intercambio catiónico en columna High S.	97
Figura 24. Análisis SDS-PAGE de las fracciones provenientes de la cromatografía de intercambio catiónico High S.	98
Figura 25. Determinación de pH óptimo de tcCys.	99
Figura 26. Perfil de actividad-temperatura de tcCys.....	100
Figura 27. Estabilidad térmica de tcCys.	101

Figura 28. Densitogramas provenientes de SDS-PAGE de la fracción HS1 en ausencia de agentes químicos (control) y en presencia de inhibidores (1 mM) y agentes reductores (10 mM). 103

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Técnicas de desintegración celular.....	34
Cuadro 2. Cromatografías clásicas para purificación de proteínas.....	36
Cuadro 3. Purificación de Xaa-Pro-DAP de la semilla de cacao T cacao L.....	61
Cuadro 4. Actividad exopeptidasas en <i>Theobroma cacao</i> frente a varios sustratos cromogénicos.....	68
Cuadro 5. Efecto de los inhibidores y/o activadores sobre la actividad exopeptidasa en <i>Theobroma cacao</i> L.....	71
Cuadro 6. Efecto de cationes metálicos sobre la actividad de exopeptidasa en <i>Theobroma cacao</i> L.....	73
Cuadro 7. Actividad de exopeptidasas frente a varios sustratos cromogénicos..	76
Cuadro 8. Efecto de inhibidores/activadores sobre la actividad exopeptidasa de <i>Theobroma cacao</i> L.....	78
Cuadro 9. Efecto de diversos inhibidores sobre la actividad peptidasa diferentes fuentes.	79
Cuadro 10. Comparación de los efectos de inhibidores /cationes y sustratos sobre la Xaa-prolil-dipeptidil aminopeptidasa de diversas fuentes.	81
Cuadro 11. Efecto de cationes divalentes y sodio sobre la actividad exopeptidasa de <i>Theobroma cacao</i> L.	83

RESUMEN

En el presente trabajo, se caracterizó parcialmente el sistema proteolítico de extractos enzimáticos de *Theobroma cacao*, identificándose enzimas unidas a membrana de tipo aminopeptidasa (APE), carboxipeptidasa (CP), cisteín peptidasa (Cys) y Xaa-Proil dipeptidil aminopeptidasa (Xaa-Pro-DAP). Este trabajo es el primer reporte sobre la actividad de la enzima Xaa-Pro-DAP (E.C. 3.4.14.5) en semillas de cacao geminado, encontrando la mayor actividad enzimática el día 10 de germinación. La Xaa-Pro-DAP fue aislada mediante precipitación con 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y purificada parcialmente con dos pasos cromatográficos. La actividad Xaa-Pro-DAP detectada en los extractos enzimáticos (E1 [40 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] y E2 [80 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]) con un peso molecular relativo de 80 kDa y 60 kDa respectivamente, sólo fue activa en estado nativo. Su actividad fue inhibida por los cationes Cu^{2+} y Cd^{2+} y en un 44 % y 48 % por EDTA y PMSF a 0.1 mM, indicando que la enzima Xaa-Pro-DAP parcialmente purificada es una serin metalopeptidasa. La enzima mostró especificidad por Ala-Pro-pNA como sustrato. También fue evaluado el efecto de los cationes y la temperatura en la agregación de las exopeptidasas en los extractos enzimáticos. De acuerdo a la técnica de dispersión dinámica de luz, en E2 en presencia de Cd^{2+} (1 mM) se detectó solo un grupo de proteínas de 53.48 nm, el cual puede ser atribuido a enzimas de tipo Xaa-Pro-DAP indicando termoestabilidad. Finalmente, la cisteín peptidasa de *T. cacao* (tcCys) detectada durante el proceso de caracterización de la Xaa-Pro-DAP, se aisló través de precipitación con 30 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y dos pasos de intercambio iónico. La tcCys tuvo un peso molecular relativo de 25 kDa, pH óptimo de 5.0, temperatura optima de 50°C y mostrando estabilidad térmica a 60°C. Su actividad proteolítica fue inhibida por PCMB, inhibidor tiol específico y recuperada por agentes reductores tales como glutatión, β ME y ditioneitol.

ABSTRACT

In the present work, the proteolytic system in the germinated *T. cacao* enzymatic extracts was partially characterized, identifying aminopeptidase (APE), carboxypeptidase (CP), cysteine peptidase (Cys) and Xaa-Prolyl dipeptidyl aminopeptidase (Xaa-Pro-DAP) membrane-bound enzymes. This work is the first report on the activity of Xaa-Pro-DAP enzyme (E.C. 3.4.14.5) in seeds germinated of cacao. The highest Xaa-Pro-DAP activity was found after 10 days of germination. Xaa-Pro-DAP was isolated by precipitation with 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and partially purified with two chromatographic steps. The Xaa-Pro-DAP activity detected in the enzymatic extracts (E1 [40 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] and E2 [80 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]), with a relative molecular weight of 80 kDa and 60 kDa respectively, was active in the native state. Its activity was inhibited by Cu^{2+} and Cd^{2+} , and 44% and 48% by EDTA and PMSF at 0.1 mM, indicating that the partially purified Xaa-Pro-DAP is a serine metallopeptidase. The enzyme showed specificity for Ala-Pro-*p*NA as a substrate. Besides, the effect of cations and temperature on the aggregation of exopeptidases in enzymatic extracts also was evaluated. According to the dynamic light scattering, in enzymatic extract (E2) only one protein group of 53.48 nm was detected in the presence of Cd^{2+} (1 mM), which can be attributed to a Xaa-Pro-DAP type enzyme indicating thermostability. Finally, the cysteine peptidase of *T. cacao* (tcCys) was partially characterized, through precipitation with 30 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ followed by two ion exchange chromatographic steps. The Cys had a relative molecular weight of 25 kDa, pH optimum at 5.0, temperature optimum of 50°C and showed thermal stability study, at 60°C. The proteolytic activity was inhibited by thiol-specific inhibitor, PCMB and recovered by reductor agents such as glutation, β ME and dithitritol.

1. ANTECEDENTES

1.1 Aspectos generales del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.)

Se presume que la palabra cacao tuvo su origen en las palabras mayas “Kaj” que significa amargo, y “Kab” cuyo significado es jugo. La fusión de estas palabras dio como resultado la palabra “Kajkab” a la que después de agregarse el sufijo “atl” que significa líquido, dio como resultado la palabra “Kajkabal” que posteriormente resultó en Kakauatl. Esta última expresión cambió para “cacahuatl”, para finalmente transformarse en “cacao” por facilidad de expresión (Barahona, 1987).

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una planta tropical de la región amazónica y domesticada por las culturas prehispánicas mesoamericanas que lo llamaban “alimento de los dioses”; los Mayas y Aztecas además de utilizarlo como bebida también empleaban sus granos como moneda. Cristóbal Colón llevó el grano del cacao a Europa pero su uso no trascendió en aquel entonces. Unos años más tarde, Hernán Cortés descubrió la bebida amarga consumida por los aztecas y envió los granos de cacao y la receta al Rey Carlos V. Los españoles cambiaron la receta, añadiendo azúcar y calentando los ingredientes para mejorar el sabor (Enríquez, 1983).

En 1828 se inventó la prensa para cacao que permitió la extracción de manteca de cacao. Hacia 1879, los suizos crearon el chocolate con leche y chocolate sólido. A partir de entonces comenzó a desarrollarse una de las industrias agroalimentarias más importantes del mundo.

1.1.1. Origen y taxonomía

El cacao es una planta que se originó en América del Sur, en el área del Alto Amazonas de acuerdo a los estudios de Pound, Chessman y otros. Debido al sistema de vida nómada que siempre llevaron los primeros habitantes de este

continente, es difícil decir a ciencia cierta cuál fue el lugar exacto de origen (Enríquez, 1983).

Theobroma cacao L., pertenece a la familia *Esterculiaceae*. El género *Theobroma* comprende 22 especies, todas originarias de los bosques húmedos tropicales de la América Ecuatorial (Mossu, 1990)

1.1.2. Botánica

Theobroma cacao fue el nombre dado por Linnaeus al árbol de cacao en la primera edición de *Species Plantarum*. El género *Theobroma* se divide en 6 secciones que contienen 22 especies, de estas *T. cacao* es la única que es cultivada ampliamente (Toxopeus, 1985).

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

Las condiciones agroecológicas óptimas para el cultivo del cacao son temperaturas medias-altas entre los 20 °C y 32 °C, con una temperatura óptima de 25 °C, y una humedad relativa alta es decir una precipitación anual de 1, 150 a 2, 500 mm. La humedad relativa también es importante debido a que puede contribuir a la propagación de algunas enfermedades del fruto. Para un buen desarrollo del cultivo deben evitarse las variaciones amplias de temperatura entre el día y la noche y los vientos excesivos.

El árbol de cacao crece hasta alcanzar hasta 20 metros de altura cuando está a la sombra de árboles forestales. Los árboles de cacao florecen dos veces al año, siendo el principal periodo de floración en junio y julio. En los meses de septiembre y octubre tiene lugar una segunda floración pero más pequeña. Así la

primera cosecha se concentra en los meses de octubre, noviembre y diciembre, y la segunda durante marzo y abril (López-Andrade y col., 2003).

El fruto – comúnmente llamado “mazorca de cacao” – es una baya elíptica de color amarillo, rojo, morado o café que puede alcanzar una longitud de 15 a 25 cm de largo por 7 a 10 cm de grueso. Cada fruto contiene entre 30 y 40 semillas, con cotiledones de color blanco, púrpura o marrón-rojizo dependiendo del genotipo y envueltas en una pulpa o mucílago muy húmedo, blanco y dulce; razón por la cual al cacao fresco o recién extraído de la mazorca se le denomina “cacao en baba”. La semilla de cacao se conoce también como haba, grano o almendra, tiene forma aplanada, ovoide, de 2 a 3 centímetros de longitud, 1.5 centímetros de ancho y con una fina testa. Los cotiledones, que forman la mayor parte de la semilla, son planoconvexos e irregularmente plegados. Tanto la testa como la almendra son de color pardo rojizo que varía en diversas variedades comerciales (López-Andrade y col., 2003).

1.1.3. Diversidad

Los árboles de cacao tienden a ser agrupados por tradición en tres grupos principales llamados Criollo, Forastero y Trinitario; de los cuales muchos híbridos han sido y continuarán siendo desarrollados (ITC, 2001) (Figura 1).

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

Los cacaos Criollos se caracterizan por tener frutos alargados, mazorcas de color rojo o amarillo en la madurez, los cotiledones frescos son de color blanco o violeta pálido. Requieren de un período corto para fermentar (2-3 días), es muy aromático y se los designa comercialmente como “cacao fino”. Este grupo se cultivo primeramente en Mesoamérica donde ya son muy raros, luego en

Suramérica, se cruzaron con poblaciones forasteras, dando origen al grupo Trinitario (León, 2000). Se ha reportado que los Criollos son extremadamente susceptibles a las enfermedades, especialmente a *Phytophthora spp* y *Ceratocystis* y no sobreviven a ataques persistentes de plagas (Toxopeus, 1985).

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

Los Forasteros son un gran grupo que comprende tipos cultivados, semi-cultivados y silvestres, se cree que tienen su origen en la Amazonía. Las variedades de Forastero son por mucho las que producen el mayor tonelaje de semilla cosechada, de las cuales las poblaciones de Amelonado son las más cultivadas (León, 2000; Toxopeus, 1985). Actualmente la mayoría de los árboles plantados de Forastero son híbridos, ya sea entre variedades de Forastero o una mezcla entre Criollo y Forastero. Estos híbridos son preferidos debido a la mayor resistencia a las enfermedades conocidas y a que tienen una mayor producción (ITC, 2001). En México los genotipos predominantes se clasifican como *Complejo Genético Trinitario* por ser producto de la hibridación natural de los criollos, nativos y forasteros (Foro Nacional Cacaotero, 2003).

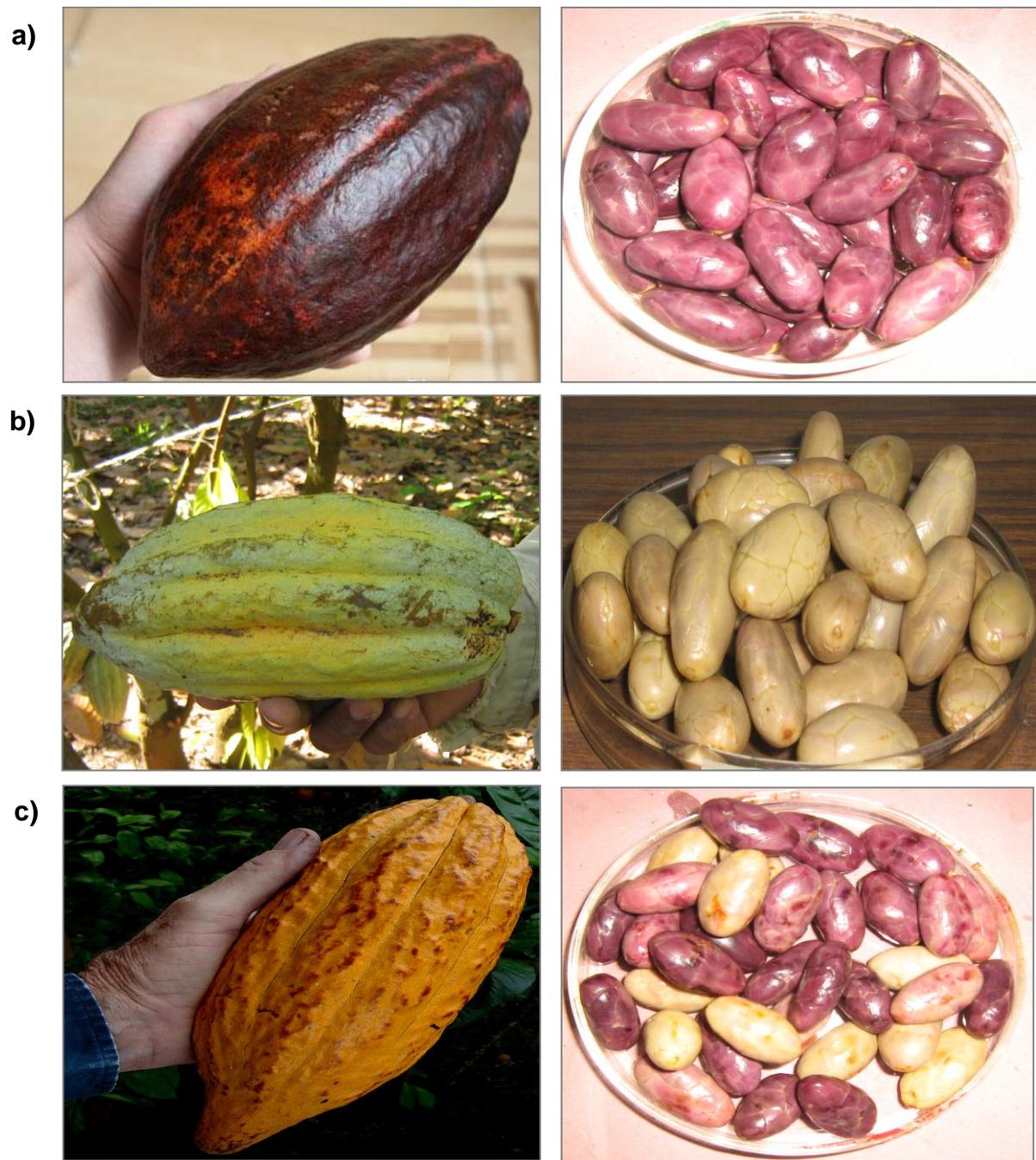


Figura 1. Diversidad de frutos y semillas de cacao. a) cacao forastero¹ b) cacao criollo c) trinitario¹.

¹<http://www.directoalpaladar.com/ingredientes-y-alimentos/el-cacao-en-la-gastronomía>.

1.2. Proceso de germinación

La germinación incorpora aquellos eventos que se inician con la absorción de agua por la semilla seca y terminan con la elongación del eje embrionario. El proceso concluye cuando la radícula penetra y atraviesa las estructuras que rodean al embrión, lo que frecuentemente se conoce como “germinación visible” (Herrera y col., 2006). Existen dos tipos de germinación, la germinación epigea y la hipogea. En las plántulas hipogreas, los cotiledones permanecen enterrados; únicamente la plúmula atraviesa el suelo. El hipocótilo es muy corto, prácticamente nulo. A continuación, el epicótilo se alarga, apareciendo las primeras hojas verdaderas, que son, en este caso, los primeros órganos fotosintetizadores de la plántula (Figura 2a). Este tipo de germinación lo presentan las semillas de los cereales (trigo, maíz, cebada, etc.) (Herrera y col., 2006).

La semilla de cacao posee un tipo de germinación epigea, en la cual ocurre un alargamiento del hipocótilo que lleva a los cotiledones y la yema embrionaria por encima del nivel del suelo. Presentan este tipo de germinación las semillas de cebolla, lechuga, mostaza, etc. (Figura 2b) (Bewley, 1997). Las semillas de cacao, una vez retiradas del fruto, germinan rápidamente, a los 4 ó 6 días después de la siembra. Emergen primero la raíz y el hipocótilo, lo que ocasiona que los cotiledones se eleven por encima del nivel del suelo (10 a 15 días después de la siembra). Los cotiledones abren exponiendo a la plúmula, la cual empieza a crecer al mismo tiempo que la raíz pero es mucho más pequeña. La primera fase de crecimiento termina con la maduración de las primeras hojas (López-Andrade y col., 2003).

En 1957, Evenari (Herrera y col., 2006) dividió el proceso de germinación en tres fases (Figura 3):

Fase I: imbibición. Con el ingreso de agua a la semilla durante la fase I, se producen en forma temporal, alteraciones estructurales importantes, en particular en las membranas. En la semilla seca, los componentes fosfolipídicos de la membrana se encuentran en fase de gel, por lo que no están en su condición

normal, lo que provoca una salida inicial mayor de solutos y de metabolitos de bajo peso molecular hacia la solución que rodea a la semilla. No obstante, con la rehidratación las membranas retornan rápidamente a un estado cristalino hidratado, condición más estable, por lo que prácticamente cesa la pérdida de solutos. La rehidratación permite que las enzimas y estructuras presentes en la semilla deshidratada, necesarias para el reinicio del metabolismo, se reactiven.

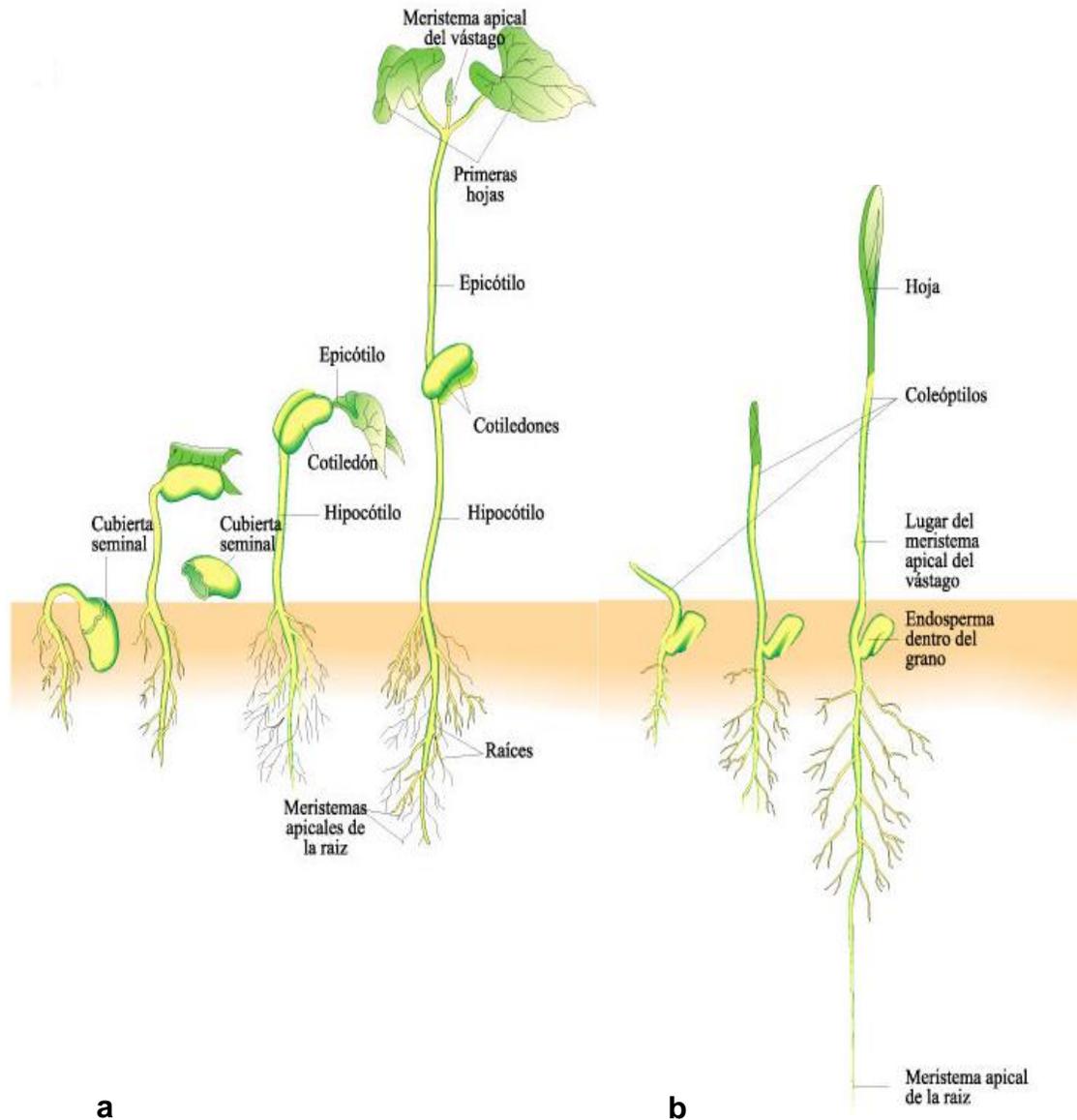


Figura 2. Tipos de germinación.¹ a) germinación epigea b) germinación hipógea

¹ <http://iescarin.educa.aragon.es>

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

Uno de los aspectos más importantes durante las primeras horas de la germinación es la reconstitución de las membranas. El organelo que sufre mayores perturbaciones es la mitocondria. Esta, presente en la semilla seca, no es funcional al inicio de la imbibición, ya que sus membranas no están completamente reformadas. Aún así, la curva de absorción de agua (Figura 3) coincide con la del proceso respiratorio.

Fase II: activación metabólica o germinación sensu stricto. A diferencia de la anterior, esta fase se caracteriza por un cese en la absorción de agua y una actividad respiratoria más reducida. Durante esta fase ocurre la síntesis, a partir de las reservas disponibles, de nuevas estructuras y compuestos necesarios para las fases siguientes del desarrollo. En este sentido, y contrario a la fase III, la germinación *sensu stricto* es principalmente anabólica y por lo tanto endergónica, consumiendo la energía disponible.

Previo a la aparición de la radícula, se producen cambios transcripcionales en la elongación y división celulares. En general, los genes que codifican para el proceso de elongación tienden a ser activados en forma temprana, en relación con la división celular.

Fase III: crecimiento de la radícula. Finalmente, en la fase III tiene lugar la emergencia de la radícula (crecimiento visible), concluyendo el proceso germinativo, ya que el crecimiento subsecuente se considera un proceso separado y marca el inicio del crecimiento de la plántula. Dentro de los requerimientos

ambientales necesarios para la germinación se consideran esenciales el agua, el oxígeno y la temperatura. En ausencia de alguno de estos factores, la mayoría de las semillas se mantendrían en un estado quiescente, aún sin reposo. En el caso de las semillas recalcitrantes, como el cacao, se produciría una rápida disminución de la longevidad de la semilla.

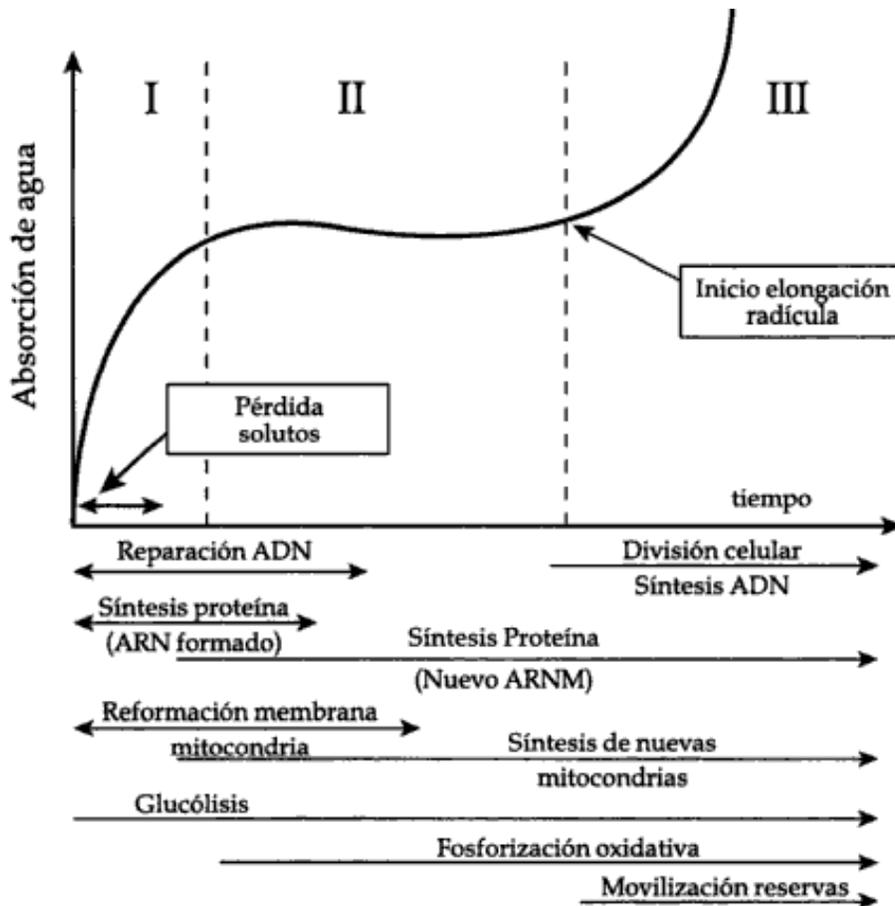


Figura 3. Curva de absorción de agua de las semillas y las actividades metabólicas asociadas con las diferentes fases. I = fase de imbibición; II = germinación sensu stricto; III = crecimiento radícula (Herrera y col., 2006).

Posterior a la hidratación de los distintos tipos de tejidos que conforman la semilla, tienen lugar en ellos una serie de reacciones metabólicas de hidrólisis que transforman las sustancias nutritivas de reservas en moléculas más sencillas y

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

1.3. Clasificación y nomenclatura de las enzimas

Las enzimas que catalizan la ruptura hidrolítica de un enlace peptídico se denominan hidrolasas, según la Lista de la Comisión de Enzimas, E.C. Esta primera lista, principalmente la parte encargada de las peptidasas (perteneciente a la clase 3, subclase 3.4), ha experimentado la mayor revisión, basada en las recomendaciones de un grupo de expertos del Comité de Nomenclatura de la Unión de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), (www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme.html).

Las peptidasas –según la base de datos MEROPS- se clasifican en familias. Una familia es un grupo de peptidasas homólogas en base a las similitudes de la secuencia de aminoácidos. Cada familia es identificada por una letra representando el tipo catalítico de las peptidasas junto con un número único. Algunas familias son divididas en subfamilias debido a la evidencia de una divergencia con la familia, por ejemplo S1A, S1B. Además, cada clase de enzimas posee inhibidores característicos, lo que permite su clasificación dentro de un determinado grupo (<http://merops.sanger.ac.uk>). Estas ocho clases de enzimas proteolíticas basados en la naturaleza de los grupos responsables de la catálisis son:

1. Aspartil peptidasas (A). Poseen uno o más grupos carboxilo (generalmente ácido aspártico) en su sitio activo. Inhibidas por pepstatina. Como ejemplo renina y pepsina.
2. Cistein peptidasas (C). Caracterizadas por poseer un grupo tiol (-SH) del aminoácido cisteína en su centro activo. Activadas por ditioneitol (DTT) e inhibidas por 4-cloromercuribenzoato.
3. Glutamil peptidasas (G). Caracterizadas por poseer ácido glutámico en su centro activo.
4. Metalopeptidasas (M). Poseen uno o dos iones metálicos en su centro activo (en la mayoría de los casos Zn^{2+}). Inhibidas por etilén-diamino-tetraacético (EDTA).
5. Asparagin peptidasas (N). Caracterizadas por poseer al menos un residuo de asparagina en su centro activo.
6. Serin peptidasas (S). Poseen al menos un residuo de serina en su centro activo y son inhibidas específicamente por diisopropil-fosforidato y otros organofosforados. Entre ellas tripsina, leucil endopeptidasa o prolil aminopeptidasa.
7. Treonin peptidasas (T). Poseen al menos un residuo de treonina en su centro activo.
8. Peptidasas no clasificadas (U) Se incluyen aquí peptidasas de mecanismo catalítico desconocido.

Clásicamente las enzimas proteolíticas se dividieron en exopeptidasas y endopeptidasas. Las primeras hidrolizan enlaces próximos (uno de dos residuos) a los extremos N ó C-terminal de la cadena polipeptídica, mientras que las endopeptidasas actuarían sobre los enlaces distantes de los extremos de la cadena.

1.3.1 Endopeptidasas

De acuerdo a su metabolismo catalítico en: aspartil peptidasas, cisteín peptidasas, glutamil peptidasas, metalopeptidasas, asparagin peptidasas, serin peptidasas, treonin peptidasas y peptidasas no clasificadas.

1.3.2 Exopeptidasas

Las exopeptidasas son enzimas hidrolíticas cuya acción se limita a uno u otro terminal de la cadena polipeptídica. Se clasifican de acuerdo a la especificidad que muestran por un determinado sustrato y se les suele asignar un nombre convencional que indica el extremo del péptido (grupo α -amino o α -carboxilo) frente al cual son activos y el tamaño del fragmento liberado (aminoácido, dipéptido o tripéptido aislado) (NC-IUBMB). Este grupo comprende:

- a) Las *aminopeptidasas* (L-aminoacil péptido hidrolasas EC 3.4.11.) que catalizan la reacción de liberación secuencial de aminoácidos del extremo amino terminal.
- b) Las *carboxipeptidasas* (Peptidil aminoácido hidrolasas EC 3.4.12) que catalizan la liberación secuencial de aminoácidos del extremo carboxilo terminal.
- c) Las *dipeptidasas* (Dipéptido hidrolasas EC 3.4.13) que hidrolizan dipéptidos con sus grupos amino y carboxilo libres.
- d) Las *dipeptidil aminopeptidasas* (Dipeptidil péptido hidrolasas EC 3.4.15) que liberan dipéptidos en el extremo amino terminal.

Dentro de éste último grupo de exopeptidasas, se encuentran las Xaa-prolil dipeptidil aminopeptidasas (Xaa-Pro-DAP), enzimas que en este trabajo han sido investigadas en cacao. Las características principales de este tipo de enzimas se describen en las páginas de la siguiente sección.

1.4. Xaa prolil dipeptidil aminopeptidasas (Xaa-Pro-DAP's)

1.4.1 Clasificación

- *Clasificación enzimática de la NC-IUBMB*: E.C 3.4.14.5
- *Clasificación de peptidasas*: Clan SC, familia S9, MEROPS ID: P27487.

1.4.2. Acción

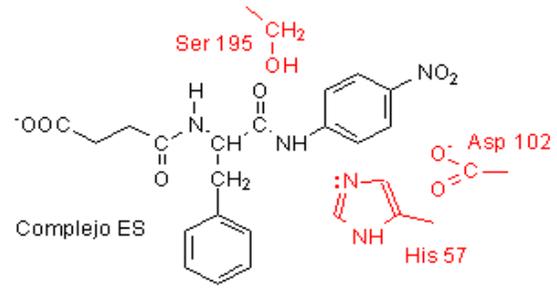
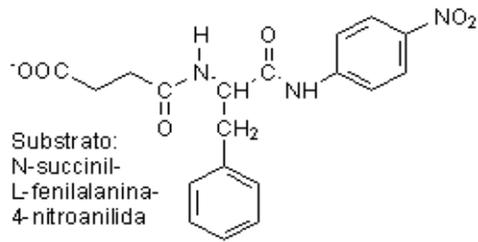
Libera dipéptidos de los extremos amino terminal, teniendo preferencia por Pro en la penúltima posición de oligopéptidos (Magboul y McSweeney, 2000).

1.4.3. Sustrato sintético

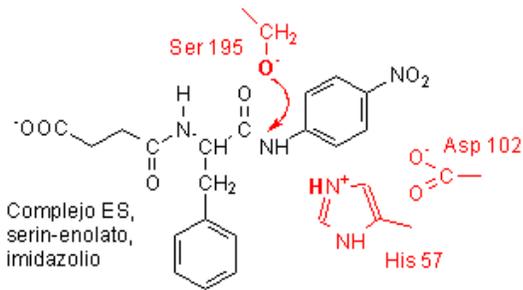
Los sustratos cromogénicos que se utilizan con más frecuencia para la evaluación de la actividad dipeptidil aminopeptidásica son los derivados de la *p*-nitroanilida (*p*NA), bien sean aminoácidos o bien dipéptidos. La enzima Xaa-Pro-DAP descrita por García-Alvarez y col. (1985) y posteriormente por Magboul y McSweeney, (2000), presente en las bacterias ácido lácticas, tiene mucha especificidad por el sustrato Ala-Pro-*p*NA, seguido de Arg-Pro-*p*NA y Gly-Pro-NA. La utilización de estos péptidos como sustratos resulta muy práctico, ya que la enzima actúa liberando el aminoácido correspondiente y la *p*-nitroanilina, un compuesto de color amarillo, que absorbe a 405 nm de longitud de onda. De la reacción se deduce que la enzima específicamente hidroliza enlaces peptídicos que involucran al grupo carbonilo de la prolina, colocada como segundo residuo amino (Gallo y col., 2005).

1.4.4. Mecanismo catalítico

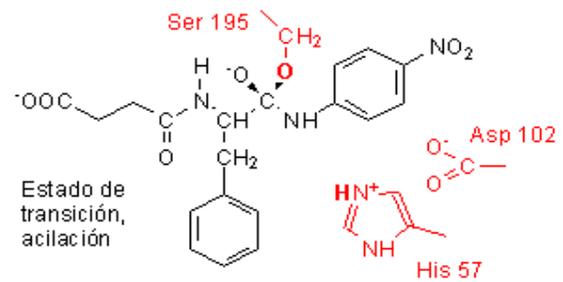
Al pertenecer al grupo de las serin peptidasas, la enzima Xaa-Pro-DAP comparte el mecanismo catalítico de estas enzimas. Este mecanismo consiste en una **fase de acilación** en la que se forma un intermediario covalente acilenzima, con liberación del primer producto, y una **fase de desacilación** en la que una molécula de agua rompe el intermediario con liberación del segundo producto. Todas estas enzimas tienen un centro activo, tres aminoácidos absolutamente conservados, Serina, Histidina y Aspartato, conjunto que recibe el nombre de tríada catalítica. Al centro activo de la enzima se une el sustrato. En este caso, se presenta como sustrato un cromógeno muy utilizado en los ensayos de quimiotripsina, la N-succinil-L-fenilalanina 4-nitroanilida (Figura 4). (Copeland, 2000).



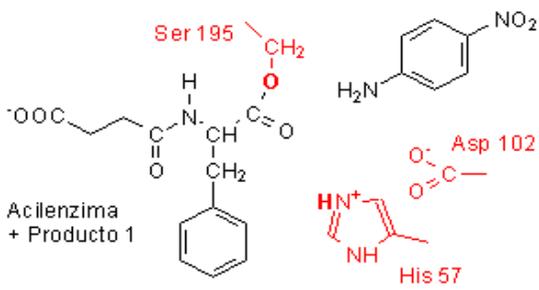
1



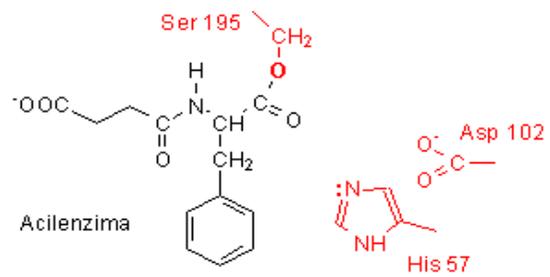
2



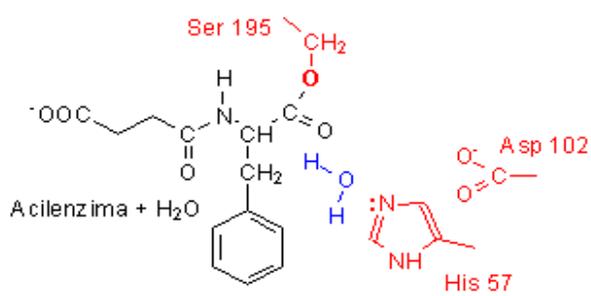
3



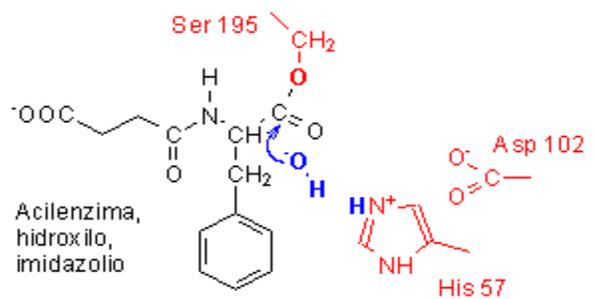
4



5



6



7

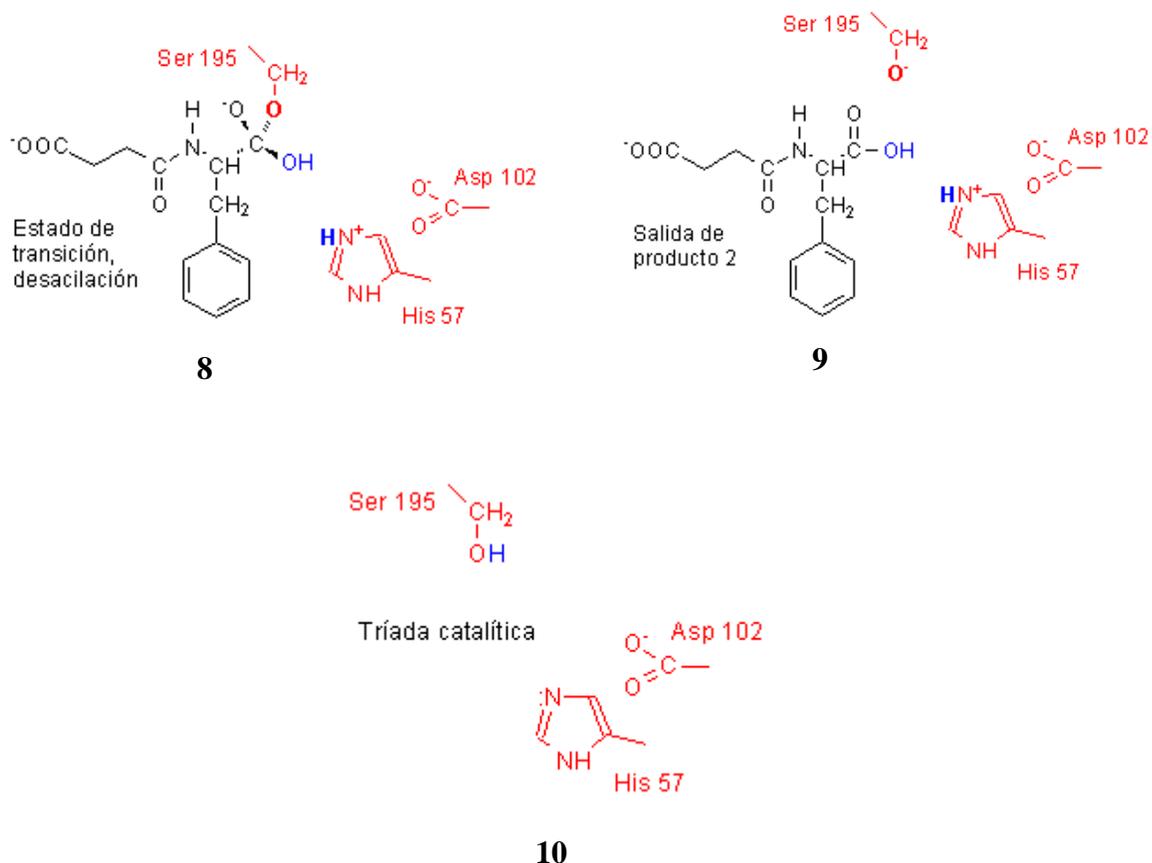
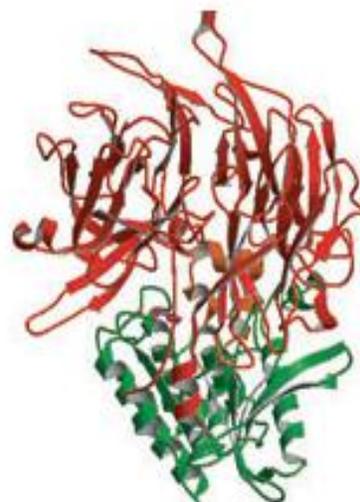


Figura 4. Mecanismo catalítico de la serin peptidasa, quimiotripsina con el sustrato cromógeno N-succinil-L-fenilalanina 4-nitroanilida. Los aminoácidos que conforman la triada catalítica (Ser, His y Asp) se muestran en color rojo (Copeland, R., 2000).

1.4.5. Propiedades moleculares

Es una serin peptidasa ya que contiene un residuo de serina en su sitio activo. De acuerdo a su estructura 3D, se ha reportado que esta enzima de origen eucariótica consiste en un dominio de 8 láminas β y un dominio α/β hidrolasa, el cual forma el dominio catalítico con dos pequeñas α -hélices de la secuencia N-terminal. Este dominio helicoidal, de todas las enzimas perteneciente al clan SC presenta residuos importantes para su especificidad enzimática (Figura 5) (Rasmussen y col, 2003; Engel y col., 2003).

Figura 5. Estructura de una Xaa-Pro-DAP (DPP-IV [1N1M] de origen humano) ejemplo de la subfamilia S9B. El dominio N-terminal esta de color rojo, el dominio catalítico es verde, el dominio helicoidal y más pequeño es naranja y la triada catalítica es magenta con una representación de esfera y palillos (Rasmussen y col., 2003).



En bacterias ácido lácticas, la Xaa-Pro-DAP se ha reportado con pesos moleculares relativos de 82 kDa en *Lactococcus lactis* (Pérez-Guzmán y col., 2006), en *Lactobacillus sakei* identificada con un peso molecular de 88 kDa, sugiriendo estar compuesta de dos subunidades de peso moleculares equivalentes, (Sanz y Toldrá, 2001), en *Lactobacillus curvatus* DPC2024 se reportó un peso molecular estimado de 97.4 kDa (Magboul y McSweeney, 2000), Miyakawa y col.(1991) identificaron un peso molecular de 90 kDa en *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LBU-147, la cual en condiciones nativas presentaba 270 kDa de PM, sugiriendo estar compuesta de tres subunidades de aproximadamente peso molecular equivalente. En mamíferos, Xaa-Pro-DAP ha sido reportada como un homodímero con una subunidad de peso molecular en el rango de 110 a 130 kDa (88 kDa después de la desglicosilación. En cebada fue identificada como una glicoproteína monomérica con un peso molecular estimado de 105 kDa (85 kDa después de la desglicosilación) (Davy y col., 2000).

Es inhibida por Fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), inhibidor específico de serin peptidasas y por el ácido p-cloromercuribenzoato (Magboul y McSweeney, 2000), en cebada se reportó la Diprotina A y B como inhibidores de su actividad

enzimática (Davy y col., 2000), en *Lactobacillus sakei* los cationes (Cu^{2+} , Zn^{2+} y Hg^{2+}) inhibieron fuertemente la actividad de Xaa-Pro-DAP y los agentes quelantes tales como EDTA y o-fenantrolina tuvieron poco efecto en la actividad de la enzima purificada (Sanz y Toldrá, 2001). Su pH óptimo ha sido reportado alrededor de pH 6.5-7.5 (Sanz y Toldra, 2001; Miyakawa y col., 1991, Magboul y McSweeney, 2000).

1.4.6. Distribución

La Xaa-Pro-DAP es la peptidasa específica de prolina más estudiada en bacterias ácido lácticas (Christensen y col., 1999; El-Soda, 1993). La enzima también es conocida como dipeptidil peptidasa IV, la contraparte en mamíferos (Sanz y col., 2001). Esta enzima inicialmente fue identificada en hígado de rata (Hopsu-Havu y Glenner, 1966) y consecuentemente purificada de varios tejidos de mamíferos (Cunningham y O'Connor, 1997). La actividad Xaa-Pro-DAP también ha sido reportada en insectos, levaduras (Bordallo y col., 1984) y plantas (Besanova y col., 1987; Stano y col., 1994b; Stano y col., 1997; Davy y col., 2000).

1.4.7. Aspectos biológicos

Hopsu-Have y Glenner en 1966 identificaron la actividad de Xaa-Pro-DAP en hígado de rata y en riñón de cerdo, reportando que esta enzima presenta habilidad de hidrolizar el extremo carboxilo terminal de la prolina en Gli-Pro-2-naftilamida, la cual generalmente no es hidrolizada por otras enzimas.

Consecuentemente Xaa-Pro-DAP fue purificada de varios tejidos de animales y de bacterias, reportándose estar involucrada en un número de procesos biológicos, tales como la asimilación intestinal, activación inmunológica de células T y B y el reciclamiento de péptidos con prolina en su estructura (Cunningham y O'Connor, 1997). Se ha encontrado en altas concentraciones en las membranas celulares de intestino e hígado, donde se cree estar involucrada en la absorción y reciclamiento de péptidos que contienen prolina en su estructura, ya que ratas deficientes de Xaa-Pro-DAP perdieron peso cuando

fueron alimentadas con gliadina, una proteína rica en prolina (Cunningham y O'Connor, 1997).

Las Xaa-prolil dipeptidil aminopeptidasas han sido identificadas en bacterias ácido-lácticas y un número de ellas han sido purificadas de cultivos de *Lactococcus* y *Lactobacillus* (Kunji y col., 1996; Law y Haandrikman, 1997). Los genes de X-prolil dipeptidil aminopeptidasa han sido secuenciados de *Lc lactis* ssp. *cremoris* P8-2-47 (Mayo y col., 1991), *Lc. lactis* ssp. *lactis* NCDO 763 (Nardi y col., 1991), *Lb. helveticus* 53/7 (Vesanto y col., 1995) y *Lb. helveticus* CNRZ 32 (Yüksel y col., 1996).

La función fisiológica de Xaa-prolil dipeptidil aminopeptidasa en bacterias ácido lácticas es facilitar la digestión de proteínas ricas en prolina, tales como la caseína, y liberar aminoácidos libres esenciales para su crecimiento en la leche. Las caseínas son proteínas ricas en residuos de prolina, los cuales por su estructura inusual modifican la conformación de los péptidos y restringen su escisión por endo y exopeptidasas comunes. Además, se ha reportado que los péptidos que contienen prolina están involucrados con el sabor amargo en el queso (Visser y col., 1983), mientras que la prolina liberada le imparte un sabor dulce (Biede y Hammond, 1979). Por lo tanto, ésta es necesaria para liberar la prolina de los péptidos amargos por la acción de peptidasas específicas. La Xaa-prolil dipeptidil aminopeptidasa exhibe altos niveles de actividad que otras enzimas específicas de prolina, y ha sido considerada una de las más importantes en los procesos de degradación de caseína, debido a su alta especificidad por este sustrato (Booth y col., 1990a).

La dipeptidil aminopeptidasa parece jugar un papel importante en conjunto con otras enzimas proteolíticas tales como proteinasas y aminopeptidasas de bacterias ácido lácticas en la formación de dipéptidos absorbibles en yogurt (Miyakawa y col., 1991).

En plantas, la función de Xaa-Pro-DAP no está claramente establecida, sin embargo esta actividad ha sido detectada en semillas de amapola (Besanova y col., 1987; Stano y col., 1997) y pepinillos (Stano y col., 1994b) y en callos de ginseng (Stano y col., 1994a), y se sugiere que juega un papel en la movilización y/o utilización de proteínas de reserva durante la germinación. La actividad de Xaa-prolil dipeptidil aminopeptidasa en pepino fue localizada principalmente en el tejido vacuolar y epidermis de raíces e hipocótilos, incrementándose durante la germinación (Stano y col., 1994b).

Davy y col., 2000, purificaron y caracterizaron la actividad de dipeptidil peptidasa IV en cebada (*Hordeum vulgare L.*) con una probable localización en el embrión o el escutelo. Durante la germinación, las proteínas de reserva, localizadas en el endospermo, son degradadas inicialmente por una combinación de endo y exopeptidasas secretadas de alrededor de la aleurona y tejido del escutelo (Koehler y Ho, 1990). Péptidos pequeños de dos o cinco residuos de aminoácidos se acumulan en el endospermo en concentraciones milimolares, y son subsecuentemente transportados por vía especializada al epitelio escutelar del embrión, donde son degradados a aminoácidos libres (Higgins y Payne, 1981). La mayor parte de los péptidos liberados por acción de ésta enzima tienen un residuo Pro en segunda y/o penúltima posición, basado en el conocimiento de su especificidad y patrón de escisión en la hordeína (proteína que contiene dominios ricos en Pro y Gln con secuencias repetitivas) (Davy y col., 1998). Así, la dipeptidil peptidasa IV podría estar involucrada en este último paso de movilización de proteínas de reserva liberando dipéptidos, tripéptidos y aminoácidos en el escutelo y/o embrión. Los di y tripéptidos liberados después podrían ser degradados a aminoácidos libres por aminopeptidasas y dipeptidasas (Sopanen, 1976) y carboxipeptidasas (Breddam y Sorensen, 1987), las cuales también están presentes en el embrión de cebada (Dal Degan y col., 1994).

1.5 Purificación de proteínas

1.5.1 Tendencias actuales sobre purificación de proteínas

El aislamiento y purificación de una proteína de interés es un primer paso esencial antes de investigar sus propiedades estructurales y funcionales. Los métodos cromatográficos tradicionales requieren con frecuencia varios pasos que consumen tiempo con procedimientos costosos. Bajo esta perspectiva, se han propuesto alternativas como la ***purificación de proteínas vía adsorbentes de membrana*** que ofrece una ventaja en rapidez y sencillez pero con un aislamiento efectivo. Los procedimientos de aislamiento utilizan las membranas con una estructura de poro favorable, permitiendo velocidades de flujo elevadas sin causar la caída de presión, y por consiguiente se evita el estrés a las estructuras proteicas (Suck y col., 2006). Además, la transferencia de masa se lleva a cabo a través de convección más que difusión, permitiendo procesos de separación rápidos, a diferencia de la columna empacada donde la difusión de los solutos en la matriz es lenta (Gosh, 2002). Las membranas específicas están disponibles con diferentes funcionalidades, incluyendo ligandos para intercambio iónico, cromatografía de agentes quelantes y afinidad (Suck y col., 2006).

Se han desarrollado protocolos de purificación más eficientes, tales como el uso de la cromatografía de afinidad en la cual metales quelantes (Li y col., 2001; Li y col., 2002) o ligandos específicos (Mills y col., 2006) son inmovilizados en resinas activadas y su unión selectiva es utilizada para separar las proteínas objetivo. Subsecuentemente la incorporación de marcadores específicos en las proteínas de interés cambió la cromatografía de afinidad de una técnica exótica a un protocolo de purificación de rutina (Schmitt y col., 1993; Lichty y col., 2005). Ahora las columnas diseñadas para reconocer específicamente estos marcadores ligados han llegado a convertirse en el método de elección e inicialmente sostienen la promesa de purificación del extracto celular crudo a una proteína homogénea en un solo paso. En realidad, alcanzar esta promesa es un evento raro, ya que por ejemplo, la unión no específica de proteínas con histidinas expuestas en la superficie del entorno celular frecuentemente resulta en que

varias proteínas coeluyen a través de las columnas de afinidad con la proteína de interés (Bolanos-García, 2006).

Además, también se ha mostrado que las proteínas unidas a iones metálicos pueden separarse en resinas con alta afinidad en ***cromatografías de afinidad metaloinmovilizada (IMAC*** por sus siglas en inglés, *immobilized metal affinity chromatography*) (Kung y col., 2009; Dalal y col., 2008; Mills y col., 2006). Han sido diseñados algunos métodos para eliminar las uniones no específicas (Westra y col., 2001; Franken y col., 2000) y separar las otras proteínas que se ligan a estas resinas de afinidad (Jiang y Hearn, 1996) dando algunas mejoras, pero aún no eliminan completamente éstos problemas. Como consecuencia, la purificación de las proteínas de interés frecuentemente requiere uno o más pasos cromatográficos acoplados a cromatografía de afinidad para alcanzar una proteína altamente pura (McCluskey y col., 2007; Coulombe y Meloche, 2002). Además, en algunos casos es posible la pérdida de información debido a la interferencia del marcador en el ensayo enzimático, demeritando la estructura y función de la proteína (Bonetta, 2006).

En los últimos años se han desarrollado diversos protocolos automatizados para el proceso de purificación de proteínas. Cada uno de estos protocolos es diseñado en torno a la purificación por cromatografía de afinidad, cada uno en un solo paso, ***sistema alto rendimiento/gran capacidad (high-throughput HT)*** (Fisher y col., 2006; Bonetta, 2006) o cromatografía de afinidad como primer paso en protocolos de columnas duales (Bhikhabhai y col., 2005; Sigrell y col., 2003). El uso de instrumentos como el BioOpix 10 (Teledyne Isco, Lincoln) ha sido diseñado para purificar en paralelo hasta 10 proteínas de fusión, considerando variables como pH, medios y gradientes (Fisher y col., 2006). También se han diseñado nuevos protocolos para obtener proteínas puras sin un marcador. Por ejemplo, es posible usar *aptámeros* para purificar proteínas pero ellos son extremadamente complejos, inciertos y aún no son apropiados para el sistema alto rendimiento (high-throughput) (Javaherian y col., 2009).

Todas esas aplicaciones están diseñadas para trabajar exclusivamente con proteínas marcadas, y también tienen poca flexibilidad de permitir al usuario seleccionar el tipo y el orden de los pasos cromatográficos. DeMarco y col. (2009) han diseñado un **protocolo totalmente automatizado para purificar proteínas marcadas y proteínas no marcadas** que permite al usuario seleccionar el tipo y la secuencia de los protocolos cromatográficos, permitiendo ajustar el criterio de selección de fracciones que son usados en cada protocolo. Se han probado métodos separados automatizando los pasos de carga de muestra, lavado de columna, elución de la muestra y colección de fracciones para cromatografías de intercambio iónico, afinidad por metales, interacción hidrofóbica y filtración en gel. Estos métodos individuales son diseñados para ser acoplados y corridos secuencialmente en cualquier orden para alcanzar un protocolo de purificación de proteínas flexible y totalmente automatizado (DeMarco y col., 2009).

El proceso de purificación sigue siendo aún muy empírico, y un método unificado para purificar proteínas sin un marcador de afinidad todavía no está disponible (Adhikari y col., 2010). Para la purificación de proteínas industrialmente importantes, principalmente en cuestiones genómicas, no es factible para las industrias el uso de marcadores (6 x His- o GST) debido al costo-efectividad y por el costo de las columnas. Adhikari y col. (2010) formularon un **método único de purificación de proteínas básicas**, específicamente en proteínas recombinantes de *E. coli*. Encontrando que si el pH del regulador es meramente una unidad de pH por debajo de punto isoeléctrico (pI) de las proteínas recombinantes, la mayoría de ellas pueden ser ligadas a una columna de intercambio catiónico. Específicamente el método podría funcionar para proteínas por debajo del criterio de $pI - 1 \geq 6.94$, siendo el primer protocolo de purificación de proteínas basado en predicciones teóricas y consecuente selección de pH del regulador de purificación y el pI de la proteína a purificar.

1.5.2 Purificación clásica de proteínas

Como se describió en la sección anterior existen muchas metodologías alternativas para la purificación de una proteína, sin embargo la metodología clásica sigue hoy en día empleándose con muy buenos resultados. A continuación se describen los protocolos más comúnmente aplicados y que fueron llevados a cabo en el presente trabajo de investigación.

- **Obtención del extracto crudo**

El primer paso de las técnicas de purificación de proteínas y enzimas, es la ruptura de las células y liberación de la enzima en un extracto acuoso. Existen muchos métodos de desintegración celular, para los diferentes tipos de células (Cuadro 1). Las células vegetales son generalmente más difíciles de desintegrar que las animales debido a la pared celular celulósica. No es recomendable el uso de un tratamiento de ruptura más vigoroso que el necesario, ya que las enzimas lábiles podrían inactivarse una vez liberadas en solución (López y Valadez, 2008).

Una vez que la proteína se ha extraído de su entorno natural está expuesta a muchos agentes que pueden dañarla. Los cambios bruscos de pH, ácidos y bases fuertes, temperaturas extremas y acción de las proteasas, son los principales factores que pueden desnaturalizar las proteínas. Para evitar o minimizar estos factores la manipulación de las proteínas durante el proceso de purificación suele llevarse a cabo en disoluciones tamponadas, a bajas temperaturas (4 °C) y se procura que el proceso sea lo más corto posible, además en ocasiones es necesario añadir el tampón de extracción agentes protectores de grupos específicos de la proteína o bien inhibidores de proteasas (Pérez y col., 2006).

El extracto es preparado después de la desintegración celular, mediante centrifugación para retirar el material insoluble. En el caso de tejidos vegetales, es importante el uso de algún agente que controle procesos indeseables durante la homogenización. Un problema particular con muchas plantas es su contenido de compuestos fenólicos, los cuales oxidan –principalmente bajo la influencia de

polifenol oxidasas endógenas- para formar compuestos oscuros. Estos pigmentos ligan a las proteínas y reaccionan covalentemente para inactivar muchas enzimas. Se recomiendan dos acciones para este problema. Primero, la adición de tiol compuestos tales como β -mercaptoetanol, minimiza la acción de fenol oxidasas. Segundo, la adición de polivinilpirrolidona es con frecuencia útil en la adsorción de compuestos fenólicos. Finalmente, para la extracción de proteínas de membrana es útil el empleo de un detergente para lograr su solubilización (Scopes, 1994).

Cuadro 1. Técnicas de desintegración celular (Scopes, 1994).

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

- **Precipitación con sulfato de amonio y diálisis**

Una vez solubilizadas, se someten a una purificación, comúnmente hecha con sulfato de amonio y a esto se le conoce como precipitación por sales. La precipitación por sales es la base de los procedimientos de purificación empleados más comúnmente y es la etapa inicial de los procesos de purificación de proteínas. Es una consecuencia primaria de la competencia entre los iones de la sal que se han añadido y los demás solutos disueltos por las moléculas de solvatación. Cuando las concentraciones de sal son altas, se hallan solvatados tantos iones que se han añadido que la cantidad del grueso de disolvente de que se dispone llega a ser insuficiente para disolver solutos. De aquí que las interacciones soluto-soluto se hacen más fuertes que las interacciones soluto-disolvente y el soluto precipita (Voet y Voet, 2006).

Posteriormente, las sales deben ser retiradas del precipitado mediante la **diálisis**. La diálisis es un proceso que separa moléculas de acuerdo con su tamaño, mediante el empleo de membranas semipermeables que contienen poros de dimensiones inferiores a las moleculares. Estos poros permiten que las moléculas pequeñas se difundan a través de la membrana pero bloqueen el tránsito de moléculas mayores. El acetato de celulosa y nitrocelulosa son los materiales de diálisis comúnmente usados (Voet y Voet, 2006).

Las proteínas pueden ser purificadas en forma activa con base a sus características, tales como la solubilidad, tamaño, carga y afinidad específica (Long y col., 2008). Los tipos de cromatografías generalmente usados en una purificación proteica se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Cromatografías clásicas para purificación de proteínas (Long y col., 2008).

Característica molecular	Tipo de cromatografía	Características	Aplicación
Tamaño	Filtración en gel	Resolución moderada para el fraccionamiento y buena para tampones intercambiadores. Capacidad limitada por el volumen de muestra.	El fraccionamiento es mejor en las últimas etapas de la purificación. En cualquier momento puede ser utilizado los intercambiadores y podrá existir una limitación respecto al volumen de la muestra.
Carga	Intercambiador iónico	La resolución puede ser alta. Capacidad alta no limitada por el volumen de la muestra. La velocidad puede ser muy elevada dependiendo de la matriz.	Es más efectiva en las primeras fases del fraccionamiento cuando se van a manipular grandes volúmenes.
Polaridad	Interacción hidrofóbica	Resolución buena. Capacidad muy alta y no limitada por el volumen de la muestra. Velocidad alta.	Puede ser utilizado en cualquier fase, pero es mejor aplicarla cuando la fuerza iónica es alta tras la precipitación con sales o después de un intercambiador iónico.
Afinidad	Afinidad	La resolución puede ser elevada. Capacidad puede ser alta o baja, dependiendo del ligando y no limitada por el volumen de la muestra. Velocidad elevada.	Puede emplearse en cualquier etapa, aunque normalmente no es recomendable en las primeras fases.

- **Cromatografía de exclusión molecular.**

La separación está basada en los diferentes volúmenes moleculares de los solutos. El tiempo de elución, es proporcional al peso molecular de los mismos, por lo que no es muy usada con compuestos de alto peso molecular. En este procedimiento se emplean geles no iónicos de partícula uniforme y porosa, como fase estacionaria (López y Valadez, 2008).

La separación de moléculas atendiendo su tamaño molecular y a su forma, utiliza las propiedades de tamiz molecular, construido con una gran variedad de materiales porosos. El término filtración en gel, se utiliza para describir la

separación de las moléculas de distinto tamaño, utilizando estos materiales con estructura de gel. Entre los materiales que se utilizan en mayor proporción, están los geles dextranos con enlaces cruzados (sephadex), agarosa (sepharosa, bio-gel A, sagavac), poliacrilamida (bio-gel P) (López y Valadez, 2008).

El principio general es sencillo, una columna de partículas de un gel o gránulos de vidrio poroso está en equilibrio con un disolvente adecuado para las moléculas que hay que separar. Las moléculas grandes, que son completamente excluidas de los poros, pasarán por entre los espacios intersticiales, mientras que las moléculas más pequeñas se distribuirán entre el disolvente del interior y del exterior del tamiz molecular y por lo tanto, pasarán por la columna a una velocidad inferior (Figura 6).

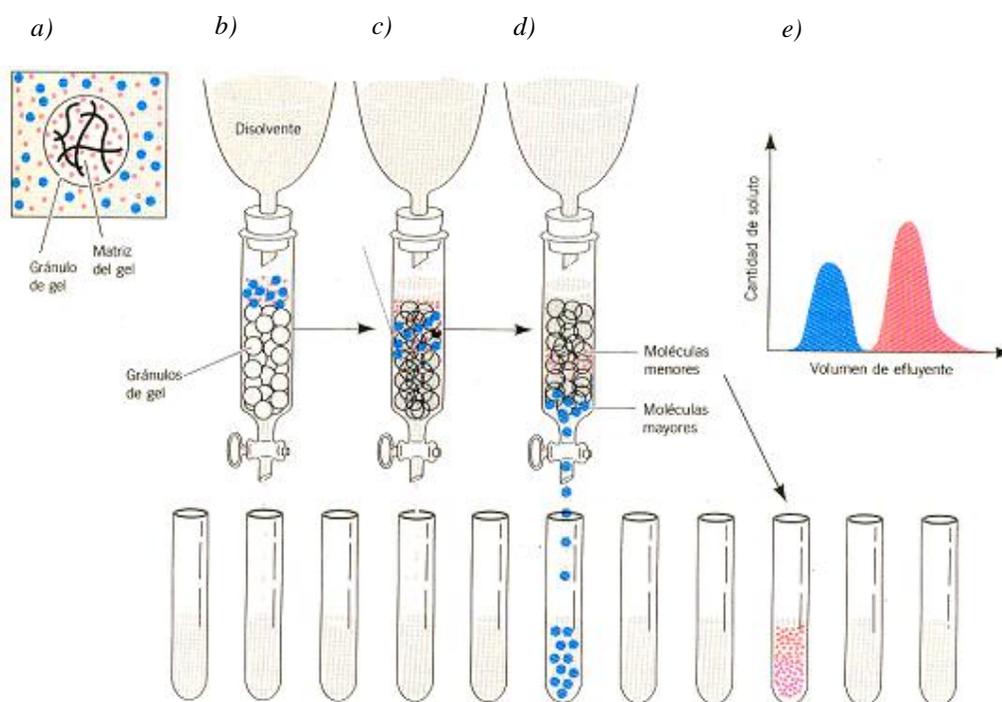


Figura 6. Esquema de la cromatografía de exclusión molecular. (a) Gránulo de gel cuya periferia se representa por una línea fina, constituido por la matriz del gel (*líneas gruesas onduladas*). Las moléculas más pequeñas (*puntos rojos pequeños*) penetran en el espacio interno del disolvente del gránulo del gel. Sin embargo, las moléculas de mayor tamaño (*puntos azules mayores*) son demasiado grandes para penetrar por los poros del gel. (b) La disolución de la muestra penetra en la columna del gel (los gránulos del gel se representan ahora por círculos). (c) Las moléculas menores pueden introducirse en el gel y por consiguiente, emigran a través de la columna con más lentitud que las moléculas mayores, que son excluidas del gel. (d) Las moléculas mayores emergen desde la columna y son recogidas separadamente de las moléculas menores que precisan de disolvente adicional para la elución desde la columna. (e) Diagrama de elución. (Voet y Voet, 2006).

- **Cromatografía de intercambio iónico**

La cromatografía de intercambio iónico es uno de los procedimientos más comunes para la purificación de proteínas. Basado en las interacciones carga-carga entre las proteínas en el extracto y las cargas inmovilizadas en la resina del intercambiador iónico. Las resinas son de dos tipos: intercambio catiónico e intercambio aniónico. Si la carga neta de la superficie de las proteínas es positiva, ellas se unen a la columna de intercambio catiónico. Por otra parte, el pH del regulador de unión debe ser por debajo del punto isoeléctrico (pI) de la proteína para una unión exitosa a la columna. Para eluir las proteínas retenidas en la columna, se suele ir subiendo la fuerza iónica de la fase móvil (comúnmente con NaCl), eluyendo primero las proteínas más débilmente retenidas y cuando la fuerza iónica sea mayor saldrán las proteínas más cargadas y por lo tanto más retenidas (Figura 7). Comúnmente las resinas de intercambio catiónico contienen derivados de sulfato (resinas-S), mientras que los intercambiadores aniónicos (resinas CM) contienen iones de derivados de carboxilato (Chern y col., 2009). Sin embargo, existen pocos reportes que muestren que 1 o 2 proteína (s) han sido purificadas en un solo paso de cromatografía de intercambio iónico debido a su baja especificidad (Chern y col., 2009; Adhikari y col., 2008). Las columnas de intercambio iónico son en general comparativamente menos caras que las columnas con marcadores de afinidad. Un costo menor es altamente deseable, pero la opción solo existe si es posible purificar las proteínas sin algún marcador de afinidad (Adhikari y col., 2010).

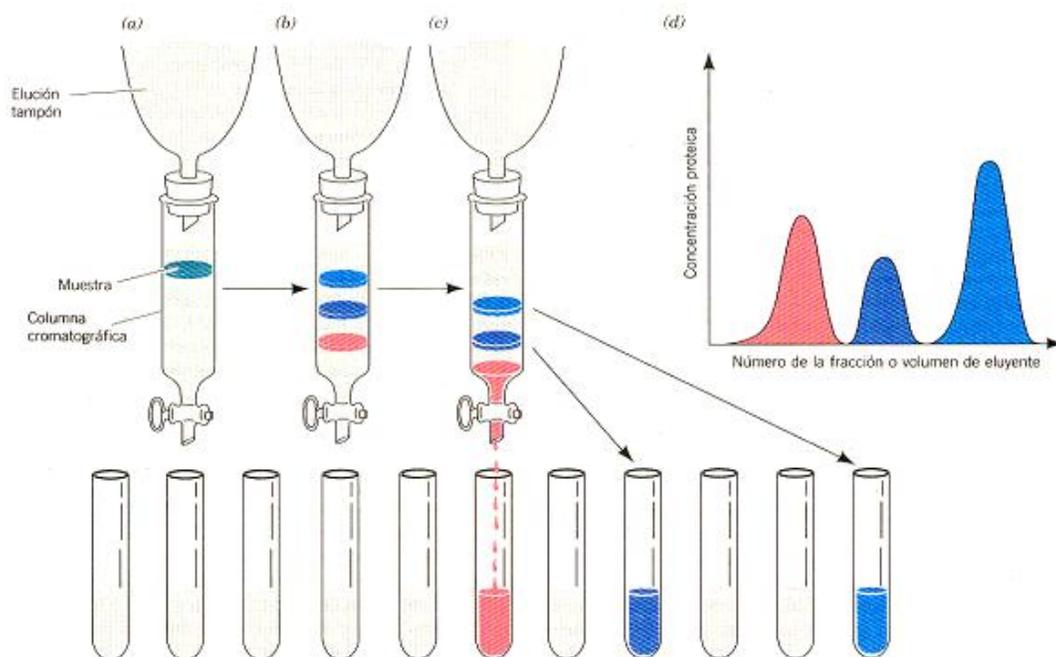


Figura 7. Diagrama esquemático de la cromatografía de intercambio iónico. El área sombreada representa al intercambiador iónico y las bandas coloreadas representan a las diversas proteínas. (a) La mezcla de proteínas se halla retenida por la porción superior de intercambiador en la columna cromatográfica. (b) A medida que progresa la elución, las diversas proteínas se separan en bandas definidas como consecuencia de sus diversas movilidades sobre el intercambiador bajo las condiciones que prevalecen en la disolución. (c) La primera banda de proteína se ha aislado como una fracción separada del efluente de la columna. (d) Diagrama de elución de la mezcla de proteínas procedentes de la columna (Voet y Voet, 2006).

- **Cromatografía de interacción hidrofóbica**

Se trata de un método similar al anterior con la única diferencia de que la fase estacionaria es apolar (hidrofóbica), es decir, la proteína se pega al soporte por los resto de aminoácidos apolares, cuanto más residuos de este tipo tenga en su superficie, más apolar será, más se retendrá en la columna y se eluirá más tarde. En este caso la elución se realiza aumentando la apolaridad de fase móvil. Mientras que solo las proteínas más hidrofóbicas se unen a cadenas alifáticas cortas inmovilizadas a baja concentración de sal, la cromatografía hidrofóbica puede ser extendida sobre todas las proteínas, ya que las interacciones hidrofóbicas incrementan con la fuerza e incremento de concentración de sal. En particular, el sulfato de amonio es uno de los de mayor interacción hidrofóbica, pero también son usados sales de cloruro (1-2 M). Las proteínas que son más

fuertemente absorbidas a bajas concentraciones de sal son generalmente aquellas con baja solubilidad de agua: globulinas, proteínas asociadas a membrana, y otras que precipitan a un rango bajo de saturación de sulfato de amonio (arriba de 40 % de saturación) (Scopes, 1994; Garret y Grisham, 2005).

- **Cromatografía de afinidad**

Todas las moléculas, particularmente las proteínas, poseen una estructura tridimensional compleja. Los ligandos que tienen la habilidad de reconocer una región estructural de una molécula, son usados en lo que se denomina cromatografía de afinidad. Esta interacción puede ser extremadamente específico y los ligandos podrán interaccionar con solo un tipo de moléculas, o el ligando puede ser diseñado de tal manera que reconozca un grupo de moléculas estructuralmente similares (Voet y col., 2008). En este caso también se utiliza el incremento de fuerza iónica para eluir las proteínas. En la Figura 8 se muestra de manera esquemática el fundamento de esta separación.

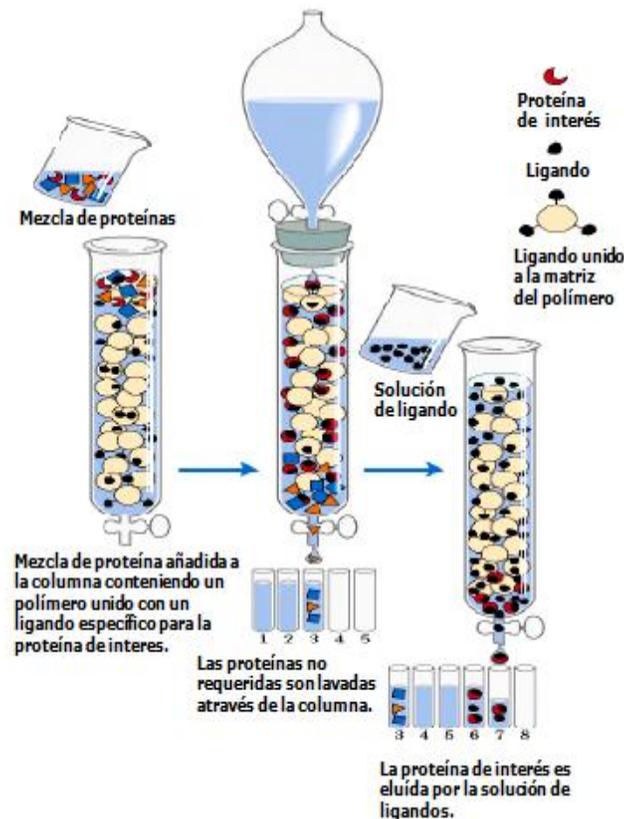


Figura 8. Esquema ilustrativo de la cromatografía de afinidad (Lenihnger, 2008)

Hasta ahora existen escasos reportes sobre el uso de éstas técnicas de purificación para el estudio de enzimas proteolíticas presentes en cacao, sin embargo éstas han sido investigadas y verificado su papel en la formación de los precursores del sabor del cacao.

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

En semillas maduras de cacao no germinado, se ha identificado actividad proteolítica predominante de una endoproteinasa aspártica (AP). Esta actividad se ha encontrado en niveles muy altos en la semilla de cacao, comparado con los niveles detectados en las semillas de otras plantas (Voigt y col., 1997). La actividad de esta enzima parcialmente purificada resultó ser óptima a pH muy bajo (pH 3.5) y es inhibida por pepstatina A (Biehl y col., 1993). Posteriormente, se purificó otra proteinasa aspártica, la cual resultó estar formada de dos péptidos (29 y 13 kDa) derivados de un único zimógeno precursor de 42 kDa (Voigt y Biehl, 1995). La enzima escinde sustratos proteínicos entre los residuos de aminoácidos hidrofóbicos para producir oligopeptidos con residuos de aminoácidos hidrofóbicos al final (Voigt y col., 1994). Mediante el uso de anticuerpos específicos para la aspartil proteinasa purificada, Voigt y Biehl (1995) demostraron que esta enzima se acumula en presencia de la globulina clase-vicilina (7S) durante la maduración del grano. A través de la germinación, su actividad permanece constante durante los primeros días de la germinación y no disminuye hasta antes del ataque de degradación de la globulina (Voigt y Biehl, 1995). Laloi y col., (2002) aislaron y caracterizaron dos genes codificantes de aspartil proteinasa (*tcAP1* y *tcAP2*) a partir de la semilla de cacao, ambos genes se expresan durante el desarrollo de la semilla. Estos genes son expresados en la etapa temprana del desarrollo y sus niveles de mRNA disminuyen hacia la etapa final de maduración de las semillas. *tcAP2* es expresado en niveles muchos más altos que *tcAP1*; sin embargo, el nivel del RNAm de *tcAP2* se incrementa levemente durante la germinación. Ambos genes comparten un 73 % de identidad. El hecho de que ambos genes tengan diferentes patrones de expresión, sugiere que ambas peptidasas pueden tener diferentes funciones en la maduración de las semillas y durante la germinación

(Laloi y col., 2002). También se ha identificado una actividad carboxipeptidasa, la cual es inhibida por PMSF y además pertenece a la clase de serin peptidasas. Ésta es estable sobre un amplio rango de pH con un máximo de actividad a pH 5.8. Esta enzima no degrada proteínas nativas pero preferencialmente rompe aminoácidos hidrofóbicos del carboxilo terminal de péptidos. Aún, péptidos con residuos de arginina, lisina o prolina en el carboxilo terminal son aparentemente resistentes a la degradación. Se ha encontrado que el grado de hidrólisis no solo es determinado por aminoácidos en el carboxilo terminal, sino también es afectado por el residuo de aminoácido vecino (Bytof y col., 1995).

De acuerdo a la patente 7122366 en la cual se han reportado endoproteinasas de cacao (Bucheli y col., 2004), se ha identificado la actividad de una cisteín endoproteinasa cuyo pH óptimo es de 5. Esta actividad enzimática se cree que no escinde las proteínas de almacenamiento nativas en semillas no germinadas. La actividad de cisteín endoproteinasa incrementa durante el proceso de germinación cuando la degradación de la proteína globular ocurre (Biehl y col., 1996). Hasta el momento, el papel de esta enzima en la generación del aroma de cacao no ha sido reportado. Hansen y col. (1998), realizaron estudios sobre la determinación de las actividades enzimáticas de endopeptidasa, aminopeptidasa y carboxipeptidasa presentes en la semilla de cacao durante la fermentación. La proteínasa aspártica o endopeptidasa conservó el 50 % de la actividad enzimática después de 4 días de fermentación, no se inactivó con el secado solar ni artificial, lo cual indicó una gran estabilidad durante todo el proceso de fermentación. La carboxipeptidasa resultó más estable que la aminopeptidasa, conservando entre el 50 y 15 % de su actividad, después de 3 o 4 días de fermentación respectivamente y no resultó inactivada por secado solar y artificial. La aminopeptidasa tuvo un pH óptimo de 7.0, y fue muy sensible a la fermentación, conservando solamente el 5 % de su actividad después de dos días de fermentación; sin embargo, fue estable al secado solar y artificial. Dichas enzimas permanecieron activas en la semilla seca (Hansen y col., 1998).

2. JUSTIFICACION

Se han reportado una gran cantidad de trabajos sobre la bioquímica de las aspartil proteinasas (AP), las cuales hidrolizan a las proteínas de reserva del cacao durante los procesos de germinación (para dar lugar al desarrollo de la plántula) y fermentación (generación de los péptidos y aminoácidos libres, precursores del sabor y aroma) de la semilla (Biehl y col., 1982b, Bucheli y col., 2001; Hansen y col., 1998, Laloi y col., 2002; Voigt y col., 1993). También se han purificado las aspartil peptidasas (AP), y se han caracterizado molecularmente al menos dos de los genes que codifican para dichas peptidasas (Laloi y col., 2002). Sin embargo, no se han reportado estudios sobre la presencia de enzimas tipo Xaa-prolil dipeptidil aminopeptidasa (Xaa-Pro-DAP), así como su posible participación en el proceso de germinación en las semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) en conjunto con otras enzimas tales como las cisteín peptidasas, éstas últimas con potenciales aplicaciones en la industria alimentaria.

De acuerdo a lo anterior, en este trabajo se propone la purificación y caracterización bioquímica de la actividad de Xaa-Pro-DAP, así como la caracterización parcial del sistema proteolítico del cacao (*T. cacao* L.) criollo almendra blanca, poniendo de manifiesto las diferentes actividades exopeptidasas durante el proceso de germinación, destacando el aislamiento de cisteín peptidasas.

Debido a que la enzima Xaa-Pro-DAP no ha sido detectada previamente en cacao, la purificación y caracterización de esta enzima contribuirá a los esfuerzos para el entendimiento del sistema proteolítico de *T. cacao* y el papel de estos sistemas en el proceso de germinación.

3. HIPOTESIS

La enzima Xaa-Pro-DAP está presente durante el proceso de germinación de la semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) y en conjunto con otras enzimas de tipo cisteín peptidasas, participa en la degradación de las proteínas de reserva. Los niveles de actividad enzimática detectados, permitirán aislar, purificar y caracterizar bioquímicamente a la enzima Xaa-Pro-DAP.

4. OBJETIVOS

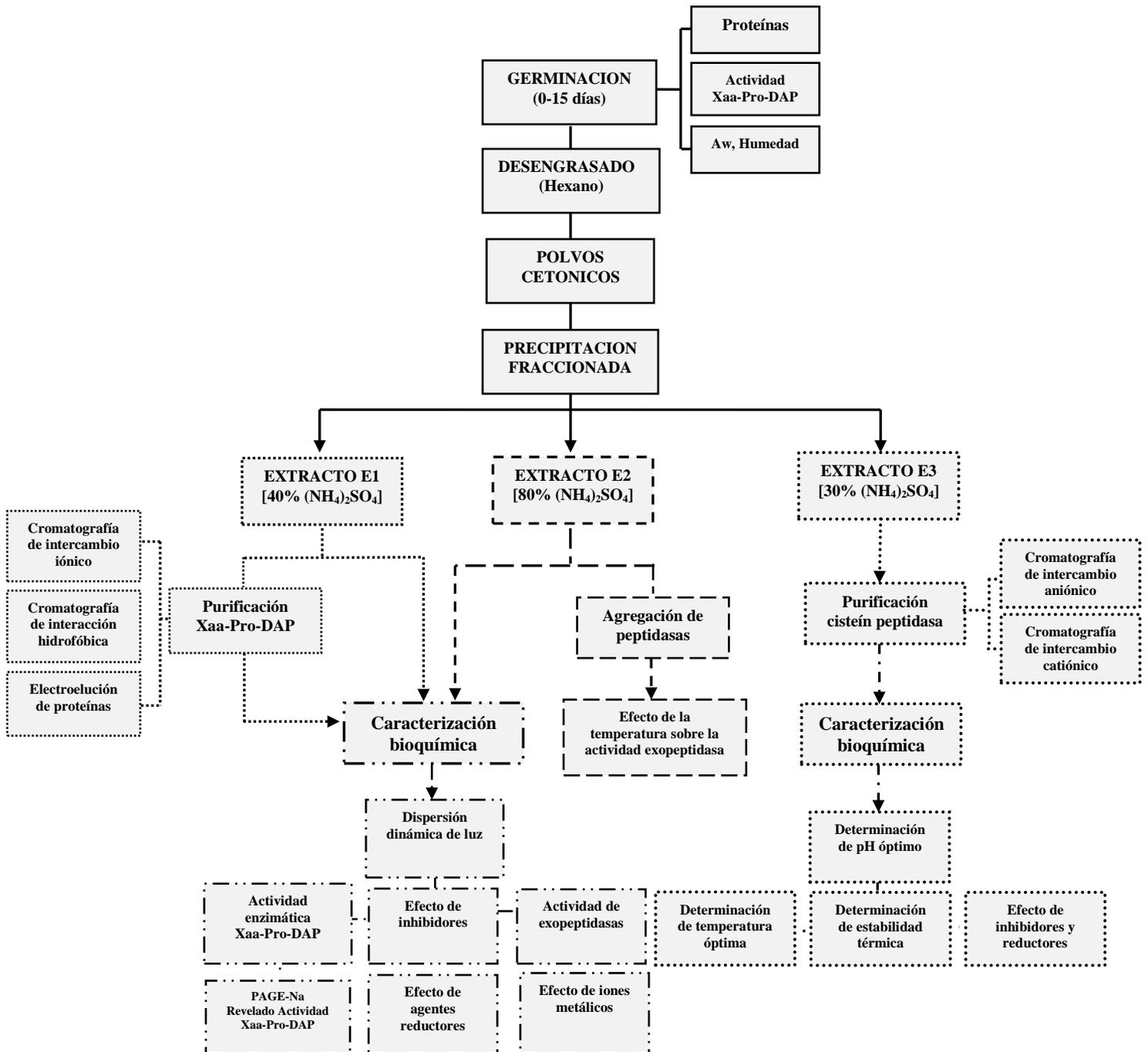
4.1 Objetivo General

Realizar una caracterización bioquímica de la actividad de Xaa-Pro-DAP, así como el aislamiento de enzimas de tipo cisteín peptidasas en semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) germinado.

4.2 Objetivos Particulares

- 4.2.1 Evaluar los niveles de la actividad de Xaa-Pro-DAP en la semilla de cacao (*T. cacao* L.) durante el proceso de germinación.
- 4.2.2 Obtener extractos enzimáticos de la semilla de cacao germinado mediante precipitación fraccionada y realizar su caracterización bioquímica.
- 4.2.3 Identificar actividad de exopeptidasas en los extractos enzimáticos obtenidos de la semilla de cacao germinado.
- 4.2.4 Purificar la enzima con actividad de Xaa-Prolil dipeptidil aminopeptidasa (Xaa-Pro-DAP) identificada en el proceso de germinación.
- 4.2.5 Caracterizar bioquímicamente a la(s) peptidasa (s) con actividad de Xaa-Pro-DAP, presente(s) durante el proceso de germinación de la semilla de *T. cacao* L.
- 4.2.6 Estudiar el efecto de agregación de peptidasas en los extractos enzimáticos en presencia de iones metálicos y su relación con su estabilidad térmica.
- 4.2.7 Purificar la enzima de tipo cisteín peptidasa identificada en cacao germinado.
- 4.2.8 Realizar la caracterización bioquímica de la enzima cisteín peptidasa presente en el cacao germinado.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL



6. MATERIALES Y METODOS

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

6.1.1 Muestreo

Se trabajó con semillas de cacao (*Theobroma cacao L.*) provenientes de plantas del genotipo criollo almendra blanca, cultivado en el Rancho “La Joya” ubicada en la Ranchería Río Seco 1a. Sección del Municipio de Cunduacán, Tabasco, la cual exporta a Suiza e Italia principalmente. El muestreo se llevó a cabo durante segunda cosecha de los meses de marzo y abril del 2007.

6.1.2 Condiciones de germinación

Se usaron semillas frescas desprovistas del mucílago, las cuales fueron lavadas con hipoclorito de sodio al 1% y lavadas tres veces con agua destilada estéril. Las semillas fueron puestas a germinar sobre agrolita húmeda en charolas germinativas a 25 °C con un periodo de luz/oscuridad de 12 horas. Las semillas germinadas fueron colectadas cada 24 horas durante 15 días después de la imbibición (Laloi y col., 2002). Durante todo el período de germinación se monitoreó la actividad enzimática de Xaa-Pro-DAP (UAE), el contenido de agua (X) y la actividad de agua (Aw).

6.2 METODOS

6.2.1 Determinación de humedad (Método de termobalanza)

El contenido de humedad de las semillas fue determinado midiendo la pérdida de masa a 100 ° C, durante 2 h. utilizando una termobalanza (Brainweigh, modelo MB300, USA) (Cruz-Silveira y col., 2010).

6.2.2 Determinación de actividad de agua (Aw)

Las semillas de aproximadamente 2 g, fueron trituradas a homogeneidad y colocadas en pequeños recipientes para la determinación de actividad de agua (Aw) por medio del equipo Aqualab 4TE de Decagon Device Inc. (Pullman, WA, USA) de acuerdo con las especificaciones del manual del fabricante (Método 978.18, AOAC, 2005).

6.2.3 Obtención de polvos secos cetónicos de cacao o polvos secos de acetona

Los polvos secos de acetona (PDA-Power Dry Acetone) se obtuvieron de acuerdo al método descrito por Hansen y col. (1998). La grasa fue removida del polvo por adición de 10 ml/g de hexano a 4 °C y agitación constante durante 2 h. Finalmente, el solvente fue eliminado de la muestra y éste fue secado a 30 °C. Para remover los polifenoles, el polvo de la semilla desengrasada fue extraído cinco veces con solución de acetona al 80 % (v/v) y las últimas tres veces con acetona al 100 %. Las suspensiones fueron centrifugadas a 4 °C durante 5 min a 5000 x *g* y 20,000 x *g* para las tres últimas extracciones. Finalmente, el solvente fue evaporado de la pasta resultante a temperatura ambiente. Ésta fue molida hasta obtener un polvo homogéneo. Los polvos secos de color blanco/ligeramente amarillo fueron almacenados a -20 °C hasta su posterior análisis.

6.2.4 Extracto enzimático

El extracto enzimático fue obtenido de acuerdo a Davy y col., (2000) con algunas modificaciones como a continuación se describe. A partir de una relación de 15 mg de PDA y 30 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) en 900 µl de regulador de fosfato 0.1 M (pH 7.0) conteniendo 1 % de tritón X-100. La mezcla fue agitada durante 30 min a 37 °C y después centrifugada a 20,000 x *g* durante 10 minutos a 4 °C.

6.2.5 Purificación de la enzima Xaa-Pro-DAP

6.2.5.1 Precipitación fraccionada con sulfato de amonio

El sobrenadante obtenido en 6.2.4 fue precipitado a 40 % de saturación de sulfato de amonio. El precipitado fue colectado mediante centrifugación a 17,000 x *g* durante 20 min a 4 °C y el precipitado obtenido fue disuelto en un volumen mínimo de regulador de fosfato de sodio 20 mM (pH 7.0) y dializado durante 24 h a 4 °C con el mismo regulador (Davy y col., 2000). Este extracto enzimático (E1) se caracterizó bioquímicamente y a partir de éste se llevo a cabo el aislamiento y purificación de la enzima Xaa-Pro-DAP así como su caracterización correspondiente.

Del sobrenadante obtenido al precipitar al 40 % de saturación con sulfato de amonio, se continuó con la precipitación fraccionada al 80 % de saturación de sulfato de amonio y se obtuvo el extracto enzimático (E2) que también se caracterizó bioquímicamente y en el cual se realizó el estudio de agregación de las peptidasas presentes.

6.2.5.2 Diálisis y concentración de proteínas

Las fracciones de proteína obtenidas por precipitación con sulfato de amonio fueron dializadas en Membranas de celulosa Spectra/Por 6 de 10,000 MWCO contra regulador de fosfatos 20 mM (pH 7.0). Los dializados fueron concentrados por ultrafiltración empleando una membrana de 10 kDa de corte de peso molecular (Amicon® Millipore) y enseguida se les determinó concentración de proteínas y actividad enzimática (Gallo y col., 2005).

6.2.5.3 Determinación de actividad enzimática

La actividad de Xaa-Pro-DAP, fue determinada mediante el uso de Alanina-prolina-*p*-nitroanilida (Ala-Pro-*p*NA; Bachem, Bubendorf, Switzerland) como sustrato. La mezcla de reacción incluyó 250 µl de regulador fosfato 0.1 M (pH 7.0) conteniendo 1 % de tritón X-100; 120 µl de agua destilada, 30 µl de la solución de sustrato (10 mM en agua) y 100 µl de extracto enzimático. Después de 30 min de incubación a 37 °C, la reacción fue detenida con 400 µl de ZnSO₄ (5 % w/v) y 100 µl de Ba (OH)₂ (7.5 % w/v), seguido de centrifugación a 15,000 x *g* durante 10 min. La absorbancia de la *p*-nitroanilina liberada por la reacción fue medida a 405 nm. Una unidad de Xaa-Pro-DAP (U) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1µmol de *p*-nitroanilina del sustrato por minuto bajo las condiciones de ensayo descritas (Mercado-Flores, 2004; Sánchez-Mundo y col., 2010).

6.2.5.4 Determinación de proteínas

La concentración de proteína fue determinada durante el curso de la purificación de la enzima mediante el método de Folin-Lowry modificado por Markwell y col. (1978) usando albumina sérica bovina como estándar y midiendo la absorbancia a 280 nm. Se agregaron 100 µl de extracto enzimático con 200 µl

agua destilada. Posteriormente, se agregaron en agitación constante, 1000 µl de reactivo A (Na_2CO_3 al 2 %, NaOH al 0.4 %, SDS al 1 %, Tartrato de sodio y potasio al 0.16 %) mas reactivo B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ al 4 %) en una proporción de 100:1, se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación se agregaron en agitación constante, 100 µl del reactivo Folin-Ciocalteu diluido 1:1. La mezcla fue agitada en vortex e incubada a 37 °C durante 45 min. Los péptidos revelados se leyeron a una longitud de onda de 660 nm.

6.2.5.5 Cromatografía de Intercambio iónico

La fracción proteica (E1) obtenida mediante precipitación con sulfato de amonio fue aplicada a una columna High Q Macro-Prep® (1.5 cm X 18 cm, Biorad, Hercules, CA 94547, USA) previamente equilibrada con regulador de fosfato 20 mM (pH 7.0). Se colectaron fracciones de 2 ml con el mismo regulador; la elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de 0-1.0 M NaCl en regulador de fosfato de sodio a 20 mM (pH 7.0) a un flujo de 0.2 ml/min, con monitoreo a 280 nm (FPLC-Econo Pump, Biorad, Hercules, CA 94547, USA). La concentración de proteínas y la actividad con Ala-Pro-pNA fueron medidas. Las fracciones con mayor actividad enzimática fueron mezcladas, dializadas con regulador de fosfato de sodio 20 mM (pH 7.0) a 4°C y concentradas por ultrafiltración con una membrana de 10 kDa de corte de peso molecular (Amicon ® Millipore) (Sánchez-Mundo y col., 2010).

6.2.5.6 Cromatografía de Interacción hidrofóbica

Las fracciones activas de la High Q Macro-Prep® fueron ajustadas a 1.5 M de sulfato de amonio y cargadas a una columna Octyl-Sepharosa CL-4B (1.5 cm x 18 cm, GE Healthcare SE-751 25 Uppsala, Sweden), previamente equilibrada con regulador de fosfato de sodio 50 mM (pH 7.0), conteniendo 1.5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las proteínas ligadas fueron eluidas con un gradiente lineal 1.5-0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en regulador de fosfato de sodio 50 mM (pH 7.0), a un flujo de 0.2 ml/min y un volumen de fracción de 2 ml, monitoreado a 280 nm (FPLC-Econo Pump, Biorad, Hercules, CA, USA). Las fracciones con actividad enzimática más alta fueron colectadas, dializadas contra regulador de fosfato de sodio 20mM (pH 7.0) a 4 °C, concentradas por ultrafiltración y usadas para la caracterización de la enzima.

Todos los pasos de purificación fueron realizados a 4 °C (Sánchez-Mundo y col., 2010).

6.2.6 PAGE-Nativa

Se realizaron geles mediante electroforesis en condiciones nativas de acuerdo a Laemmli (1970). La concentración de acrilamida en el gel concentrador y separador fue del 4 y 10 % (p/v) respectivamente. Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo a 50 V (voltaje constante) durante 5 h.

6.2.7 Teñido de actividad Xaa-Pro-DAP en gel

La detección post electroforética de la actividad de la enzima fue realizada de acuerdo a la técnica descrita por Benoist y Schwencke (1990) y Degraeve y Martial-Gros (2003) con ligeras modificaciones. El gel fue equilibrado con 10 ml de regulador de fosfato de sodio 0.1 M (pH 7.0) y 2 ml del sustrato Alanina-Prolina-4-metoxi-βeta-naftilamida (Ala-Pro-4MβNA.HCl; Bachem, Bubendorf, Switzerland) 10 mM disuelto en Dimetilsulfóxido-(DMSO) al 30 %. El gel fue incubado a 37 °C en una mezcla fresca de 2 ml de Fast Garnet GBC (11 mg/ml en DMSO al 50 %) (Sigma Chemical, USA) hasta la aparición de bandas naranjas, las cuales indican la presencia de la actividad Xaa-Pro-DAP.

6.2.8 Electroelución

Después de que la proteína fue separada mediante electroforesis bajo condiciones nativas como anteriormente fue descrita, se visualizó la banda de interés y fue cortada para ser electroeluída mediante el uso de un electroelutor (Biorad Modelo 422 con membrana de 10 kDa de corte de peso molecular) siguiendo las indicaciones del fabricante; se mantuvieron constantes 60 mA durante aproximadamente 8 horas. A la fracción electroeluída se le determinó la actividad enzimática Xaa-Pro-DAP (Sánchez-Mundo y col., 2010).

6.2.9 Determinación de pesos moleculares mediante SDS-PAGE

La purificación de la peptidasa fue monitoreada por electroforesis en gel en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de acuerdo a Laemmli (1970). La concentración de acrilamida en el gel concentrador y separador fue del 4 y 12

% (p/v) respectivamente. Para su realización se tomaron 15 µl de las muestras para ser cargadas en cada carril del gel. La migración fue llevada a cabo a 110 V durante 3 h. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie G250 y con plata usando el Kit comercial Silver Stain Plus (BioRad, USA). Los geles teñidos con azul de Coomassie y el desteñido del gel se realizó mediante lavado con agitación constante durante 1 h 15 min con etanol al 50 %, se continuó el lavado con una solución de etanol/ácido; acético/agua en una proporción 3:7; 6:3 (v/v). La tinción con plata fue realizada de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Silver Stain Kit, Sigma). Finalmente los geles fueron secados para su posterior análisis.

Los pesos moleculares de las fracciones proteicas fueron calculados usando estándares de Amersham Pharmacia Biotech de bajo peso molecular conteniendo Fosforilasa B (97 kDa), Albúmina (66 kDa), Ovoalbúmina (45 kDa), Anhidrasa Carbónica (30 kDa), Inhibidor de tripsina (20 kDa), α -lactoalbúmina (14.4 kDa). El peso molecular de la enzima estudiada se determinó por interpolación en una curva estándar.

6.2.10 Tamaño molecular mediante dispersión dinámica de luz

El análisis de distribución de diámetro hidrodinámico de la proteína parcialmente purificada fue determinado mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) en un Malvern Zetasizer Nano Series S-90 (Malvern Instruments, Malvern England) bajo las siguientes condiciones: una temperatura de 25 °C y una concentración de proteína 0.1416 mg/ml de acuerdo a la Norma ISO 13321 (International Standard ISO 13321; Kaszuba y col., 2007; Jachimaska y col., 2008).

6.2.11 Purificación de la cisteín peptidasa de *T. cacao* (tcCys)

6.2.11.1 Obtención del extracto enzimático

Los extractos crudos de PDA fueron preparados de acuerdo a Rajeswari y col. (2009) con ligeras modificaciones. Los polvos de cacao fueron mezclados con cuatro volúmenes de regulador de Tris-HCl 0.05 M, pH (7.2), conteniendo 1 % de tritón X-100, 2 mM β -mercaptoetanol, 1 mM de EDTA, 1mM PMSF y 200 g of

polivinilpolipirrolidona (PVPP). El extracto fue filtrado a través de cuatro capas de tela y el filtrado fue centrifugado a 10, 000 rpm durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante fue utilizado para el aislamiento de la enzima tcCys. Todos los procedimientos de separación fueron llevados a cabo a 4 °C, a menos que se indique en otra parte.

6.2.11.2 Proceso de purificación

El extracto crudo de la enzima (endoproteinasa) fue preparado como se describió previamente a partir de 100 g de PDA y fue sometido a precipitación con sulfato de amonio. El precipitado obtenido a 30 % de saturación con sulfato de amonio fue colectado y disuelto en un cantidad mínima de regulador de extracción y dializada contra regulador Tris-HCl 0.01 M (pH 7.2), conteniendo 2 mM β -mercaptoetanol, 1 mM EDTA y 1mM PMSF a 4 °C (en una relación de volumen 1:200 con cambios cada 2 h durante 12 h) (Rajeswari y col., 2009; Ramakrishna, 2007).

Para la purificación de la enzima tcCys, se realizaron cromatografías de intercambio aniónico y catiónico. El dializado fue cargado a una columna de DEAE-celulosa (1.5 cm x 18 cm, Pharmacia Biotech, Uppsala Sweden) previamente equilibrada con regulador Tris- HCl 0.01 M (pH 7.0) conteniendo 2 mM β -ME y 1 mM de los inhibidores EDTA y PMSF utilizando el sistema FPLC (FPLC-EconoPum, Biorad, Hercules, CA 94547, USA). Las proteínas ligadas fueron eluidas con un gradiente lineal de incremento de fuerza iónica de NaCl (0.5M) en el regulador de equilibrio y las fracciones (2 ml) fueron colectadas, dializadas y concentradas por ultrafiltración con una membrana de 10 kDa de corte de peso molecular (Amicon® Millipore). Las fracciones con mayor actividad enzimática fueron mezcladas y cargadas en la columna Macro-Prep® High-S Support (1.5 cm x 18 cm, Biorad, Hercules, CA, 94547) previamente equilibrada con regulador de acetato de sodio 0.02 M (pH 5.5) conteniendo 2 mM β -ME, inhibidores EDTA y PMSF a 1 mM. Las fracciones fueron colectadas (2 ml) y almacenadas a -20 °C. El criterio de pureza de cada estado fue monitoreado mediante SDS-PAGE al 10 % (Rajeswari y col., 2009).

6.3. CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE EXTRACTOS ENZIMATICOS Y ENZIMA Xaa-Pro-DAP

6.3.1. Determinación de actividad peptidasa

La actividad de la enzima Xaa-Pro-DAP frente a sustratos derivados de la *p*-nitroanilida fue determinada de acuerdo con las condiciones de ensayo de actividad enzimática descrita previamente en 6.2.5.3, tanto en los extractos (E1 y E2) y en fracción parcialmente purificada. Los sustratos cromogénicos usados en el análisis fueron los siguientes: Arginina-prolina-*p*-nitroanilida (Arg-Pro-*p*NA), Glicina-prolina-*p*-nitroanilida (Gly-Pro-*p*NA), Alanina-alanina-prolina-*p*-nitroanilida (Ala-Ala-Pro-*p*NA) y Alanina-*p*-nitroanilida (Ala-*p*NA) en ambas concentraciones 1 y 10 mM para analizar la actividad Xaa-Pro-DAP. La actividad aminopeptidasa fue ensayada con Ala-*p*NA, lisina-*p*-nitroanilida (Lys-*p*NA) y Leucina-*p*-nitroanilida (Leu-*p*NA) y la actividad tipo-carboxipeptidasa fue probada con benzoil-tirosina-*p*-nitroanilida (Bz-Tyr-*p*NA) (Mercado-Flores y col., 2004, Pérez-Guzmán y col., 2006).

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

Los efectos de diferentes inhibidores y agentes reductores sobre la actividad enzimática fueron estudiados en los extractos enzimáticos (E1 y E2) y en la enzima parcialmente purificada, utilizando 4-(2-aminoetil) bencenosulfonil fluoruro (AEBSF), fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), ácido etilén-diamino-tetraacético (EDTA), *p*-cloromercuricobenzoico (PCMB), ditioneitol (DTT), leupeptina, pepstatina, bestatina, diprotina, pefabloc, β -mercaptoetanol y cisteína a concentraciones de 0.1 y 1.0 mM. La enzima fue incubada en presencia de cada inhibidor durante 30 min a 37 °C seguida del ensayo enzimático con Ala-Pro-*p*NA como sustrato. La actividad de la enzima ensayada en ausencia de inhibidores fue tomada como el 100 % (Haddar y col., 2009; Sanz y Toldrá, 2001; Gallo y col., 2005).

6.3.3. Efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática

Los efectos de varios iones metálicos sobre la actividad enzimática también fueron investigados los extractos enzimáticos (E1 y E2) y en la enzima parcialmente purificada. La muestra fue pre-incubada con los iones metálicos a 0.1 y 1.0 mM a 37 °C durante 30 min. Los iones metálicos empleados fueron los siguientes: Ba²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Cd²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ y Na⁺. La actividad de la enzima Xaa-Pro-DAP fue determinada como se indicó previamente usando Ala-Pro-pNA como sustrato. La actividad de la enzima en ausencia de los iones metálicos fue considerada como 100 % (Haddar y col., 2009).

6.3.4. Determinación de la agregación (polimerización) molecular mediante Dispersión dinámica de luz

Los cambios en la distribución del diámetro hidrodinámico de proteínas en los extractos enzimáticos (E1 y E2) debido a la temperatura y a los cationes ensayados en 6.3.3 fueron determinados mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) en un Malvern Zetasizer Nano Series S-90 (Malvern Instruments, Malvern England) bajo las siguientes condiciones: a 25 °C y un intervalo de temperatura de 30 °C a 80 °C con incrementos graduales de 10 °C, una concentración de proteína en E1 de 0.019 mg/ml y 0.017 mg/ml en E2 de acuerdo a la Norma ISO 13321 (International Standard ISO 13321; Kaszuba y col., 2007; Jachimaska y col., 2008).

Durante el experimento realizado en el extracto enzimático (E2) se tomaron muestras en cada temperatura de ensayo y se les determinó la actividad enzimática de Xaa-Pro-DAP así como la actividad de las enzimas aminopeptidasa y carboxipeptidasa.

6.4 CARACTERIZACION DE tcCys

6.4.1. Zimograma

El zimograma se realizó partir de electroforesis en condiciones nativas en geles de poliacrilamida para identificar la presencia de actividad proteolítica. Después de la electroforesis en gel se incubó en caseína al 2 % (en regulador de

fosfatos 20 mM pH 7.0). Después los geles se tiñen con azul de coomassie para detectar las áreas no teñidas del gel que nos indican la presencia de actividad proteolítica (Chung y Yang, 2008).

6.4.2. Ensayo enzimático (Actividad proteolítica)

Cada una de las fracciones de las columnas fue colectada y monitoreada para tcCys como a continuación se describe. La actividad endopeptidasa fue medida mediante el uso del sustrato cromogénico, azocaseína (Sigma A2765, USA), siguiendo el método descrito por Afaf y col. (2004). Se incubaron 50 µl de extracto enzimático con 500 µl de acetato de sodio 100 mM (pH 4.5) y 100 µl de azocaseína al 3 % y ajustados a 1 ml con agua destilada. El ensayo fue llevado a cabo a 37 °C durante 1 h, después se detuvo con la adición de 200 µl de ácido tricloroacético al 20 % (v/v). Después la proteína precipitada fue removida por centrifugación (12,000 g durante 5 min a temperatura ambiente) y la absorbancia del sobrenadante fue leída a 440 nm contra el testigo de reactivos. Una unidad de actividad proteolítica fue definida como µg de caseína hidrolizada por hora bajo las condiciones de ensayo definidas.

6.4.3. Peso molecular relativo

El peso molecular fue estimado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acuerdo a Laemmli (1970). Los geles fueron teñidos con azul Brillante de Coomassie. Los densitogramas fueron diseñados con el programa 1Dscan EX 3.1.

6.4.4. Efecto de inhibidores y agentes reductores

El efecto de inhibidores específicos sobre la actividad proteolítica fue determinada mediante la pre-incubación de la preparación de peptidasa con un inhibidor o reductor durante 20 min y monitoreada en SDS-PAGE al 10 %. Los inhibidores de Cisteín peptidasas (*p*-cloromercuribenzoato [PCMB] y leupeptina), inhibidores de Serín peptidasas (fenilmetilsulfonil fluoruro [PMSF]) y de metalo peptidasas (ácido etilenediaminotetracético [EDTA]) a concentración de 1 mM; los agentes reductores (βME, glutation, cisteína y DTT) a 10 mM (Afaf y col., 2004; Rajeswari y col., 2009).

6.4.5. Efecto del pH sobre la actividad enzimática

El efecto del pH sobre la actividad enzimática fue determinada llevando a cabo el experimento a diferentes pH's usando regulador de acetato de sodio 100 mM (pH 4-5), fosfato de sodio 100 mM (pH 6-7) y Tris-HCl 100 mM (pH 8-9). La actividad enzimática fue realizada como se describió anteriormente en 6.4.2 utilizando azocaseína al 3 % como sustrato.

6.4.6. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

La actividad enzimática, se determinó siguiendo el método descrito en 6.4.2 incubándose la mezcla de reacción a diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70 y 80 °C) siguiendo la técnica de Muzziotti, 2008 con ligeras modificaciones. Se utilizó el regulador acetato de sodio 100 mM (pH 4.5) en la mezcla de reacción.

6.4.7. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad

El extracto fue pre-incubado a distintas temperaturas (30, 40, 50, 60, 70 y 80 °C) durante 1 h. Al finalizar el período de incubación la muestra se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Posteriormente se inició el ensayo enzimático descrito en 6.4.2 usando regulador de acetato de sodio 100 mM (pH 4.5) (Muzziotti, 2008).

7. RESULTADOS Y DISCUSION

A continuación se describen los resultados y discusión presentados en 4 partes: la primera correspondiente al estudio de actividad enzimática Xaa-Pro-DAP durante el proceso de germinación de cacao; la segunda que describe la caracterización bioquímica del extracto enzimático (E1) así como la purificación y caracterización bioquímica de la enzima Xaa-Pro-DAP; la tercera sección correspondiente a la caracterización bioquímica del extracto enzimático (E2) así como el estudio de agregación de peptidasas realizado en el mismo y finalmente la última sección referente a la purificación y caracterización de la cisteín peptidasa (tcCys).

7.1. Germinación

Durante el estudio se observaron tres etapas de germinación con la presencia de máximos de contenido de agua y actividad enzimática durante el proceso germinativo.

I.- La primera etapa (I) comprendida entre los días 1 y 7 de germinación. Etapa en la cual se detectaron contenidos de humedad de alrededor de 0.58 gH₂O/gds. Durante este período, se observó que a partir del tercer día de imbibición de la semilla, los cotiledones emergen del sustrato debido al crecimiento del hipocótilo, así mismo desaparece el color blanco de la semilla tornándose a color verde claro, éste cambio se atribuye a la diferenciación de los cloroplastos en los cotiledones, transformándolos en órganos fotosintéticos actuando como si fueran hojas, correspondiente al tipo de germinación epígea que presenta el cacao. En el día 7, al final de la etapa (I) se identificaron los valores más bajos de humedad (0.28 gH₂O/gds) y de actividad de agua (0.9695), sin embargo existe una actividad de agua considerable para que la semilla continúe el proceso germinativo y por otra parte las enzimas también comienzan a incrementar su actividad (3.55 UAE) que es más evidente en los próximos días.

II.- En la segunda etapa (II) comprendida entre 8-10 días de germinación, se detectó un incremento en la actividad enzimática, específicamente el día 10 del

proceso con valores de actividad Xaa-Pro-DAP de 13 UAE que también coinciden con los valores máximos contenido de agua y de actividad de agua, 1.32 gH₂O/gds y 0.98 respectivamente. Estos resultados indican que de acuerdo a las condiciones de germinación de este tipo de cacao criollo, en el día 10 existe una actividad proteolítica estimulada por los niveles de humedad y agua disponible para las reacciones propias del proceso del proceso germinativo. Por otra parte, los resultados podrían estar relacionados con los cambios drásticos en las proteínas vacuolares, como se ha observado mediante microscopía electrónica después de los días 10-13 de germinación de las semillas de cacao; período en el cual las proteínas vacuolares incrementaron su tamaño y se fusionaron en una vacuola central la cual se observó ópticamente vacía (Biehl y col., 1982b). Durante este período se observó que la radícula penetra y atraviesa la cubierta del cotiledón, en algunos casos alcanza la ruptura del mismo, dando paso en los días siguientes al desarrollo del epicótilo.

III.- Una tercera etapa (III) fue observada con los días 10-14 de germinación en la cual se observó una disminución en la actividad enzimática (4.44 UAE) y en el contenido de agua (0.96 gH₂O/gds) y visualmente se aprecia el desarrollo del epicótilo. Finalmente, en el día 15 la actividad enzimática y el contenido de agua incrementaron marcadamente, posiblemente debido al inicio del siguiente proceso, el desarrollo de la plántula, esto coincide visualmente con la aparición de las primeras hojas (Figura 9a y b).

Es notable que se detectaron concurrentemente valores máximos y mínimos de actividad enzimática y del contenido de agua, lo cual sugiere la existencia de diferentes niveles de interacción agua-proteína durante el proceso completo de germinación, lo anterior se refleja en los diferentes niveles de actividad proteolítica detectados. De acuerdo con los resultados, el hecho de que los mayores niveles de actividad de la Xaa-Pro-DAP fue observado durante la última etapa del periodo de germinación sugiere que la enzima en conjunto con otras peptidasas, juega un posible papel en la degradación de las proteínas de

reserva durante la germinación de semillas de cacao, participando en la movilización de los aminoácidos necesarios para el crecimiento del embrión, dicha función ha sido atribuida en otras plantas (Ramakrishna, 2007; Stano y col., 1997; 1994b). Dado que ésta última etapa corresponde a la iniciación de cambios morfológicos visibles, tales como la elongación del eje embrionario y emergencia de la radícula; la enzima puede estar involucrada en el desarrollo de la planta y expresada en otros órganos además de los cotiledones.

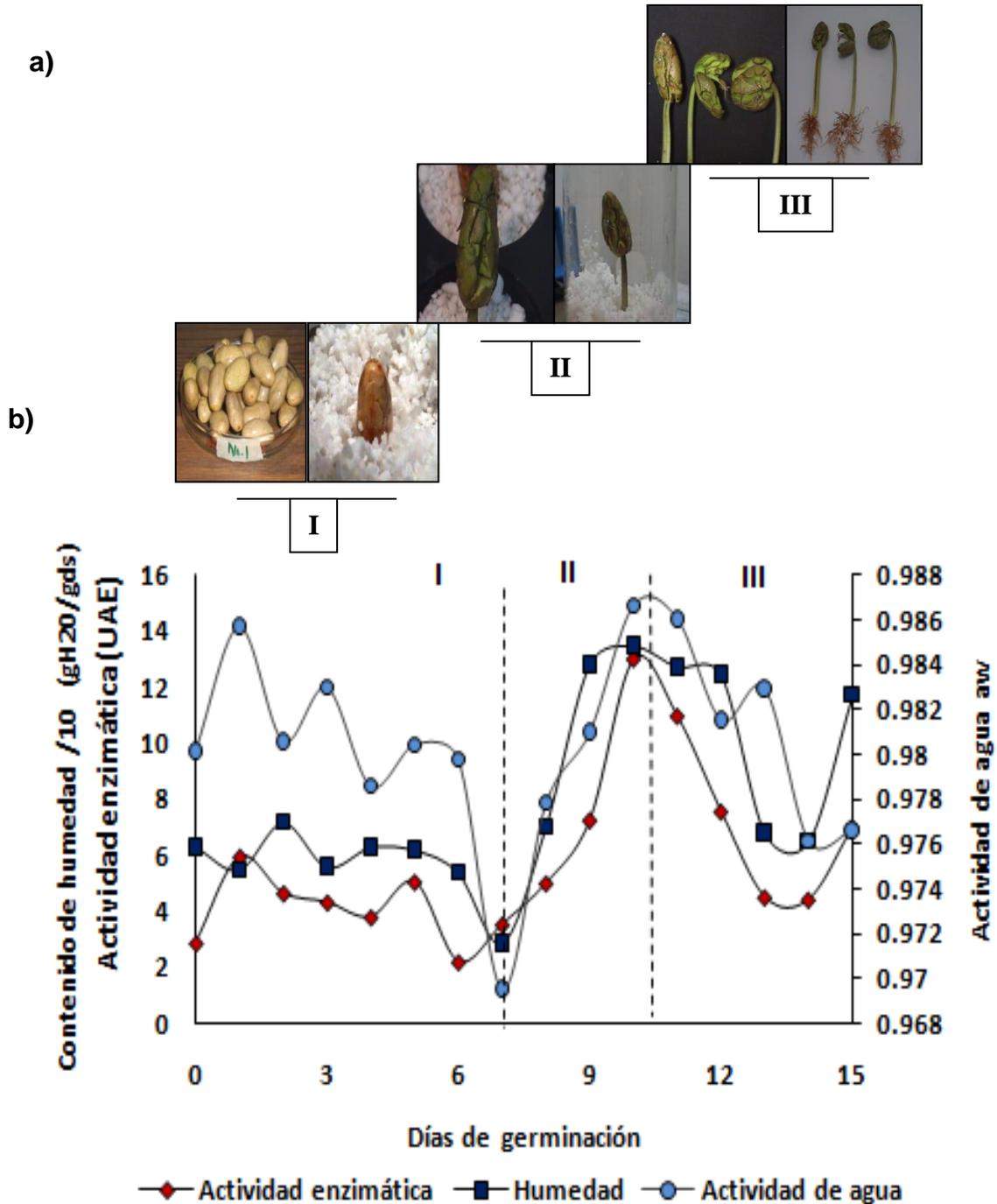


Figura 9. a) Cambios visibles ocurridos durante los 15 días de germinación de semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.), b) cambios en la actividad enzimática de Xaa-Pro-DAP, contenido de humedad y actividad de agua, durante la germinación de semillas de cacao genotipo criollo almendra blanca.

7.2 Caracterización del extracto enzimático E1 y purificación de la enzima Xaa-Pro-DAP.

7.2.1 Purificación de la Xaa-Pro-DAP.

El perfil de elución de la cromatografía de intercambio iónico mostró tres picos (HQP1, HQP2 y HQP3) que presentaron actividad Xaa-Pro-DAP (Figura 10a). El pico HQP1 (fracciones 6-8) eluyó antes que el gradiente salino iniciara. La elución del pico HQP2 (fracciones 10-13) fue observada a 0.3 M NaCl, y por lo tanto la fracción fue retenida débilmente por la columna, posiblemente debido a una baja concentración de residuos de aminoácidos con una carga neta negativa. Finalmente, el pico HQP3 (fracciones 30-32) fue retenido fuertemente en la columna, eluyendo a 1 M NaCl. El pico 2 (HQP2) mostró la mayor actividad enzimática y se sometió a cromatografía de interacción hidrofóbica en una columna de Octyl-Sepharosa CL-4B, del cual se generaron tres picos con actividad Xaa-Pro-DAP (Figura 10b). El pico OSP1 (fracciones 1-3) eluyó a 1.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El pico OSP2 (fracciones 20-23) eluyó a 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El último pico (OSP3) tuvo la mayor actividad enzimática. Después del último paso de purificación, la enzima fue purificada 37.53 veces con un rendimiento de 21.97 % y una actividad específica de 16.66 UAE/mg proteína. Los resultados del procedimiento de purificación son resumidos en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Purificación de Xaa-Pro-DAP de la semilla de cacao *T cacao L.*

Estado de Purificación	Proteína Total (mg)	Actividad Total (U^a)	Actividad Específica (UAE/mg)	Factor Purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	9.7684	4.3376	0.4440	1.00	100.00
Precipitación con sulfato de amonio (40%)	4.9118	4.1433	0.8435	1.89	95.00
Intercambio Iónico con HQ Sepharosa	0.1460	1.796	12.3013	27.70	41.50
Interacción Hidrofóbica con Octyl-Sepharosa	0.0572	0.9533	16.6660	37.53	21.97

^a Una unidad de enzima está definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar una mol μPNA por min, usando Ala-Pro- μPNA como sustrato.

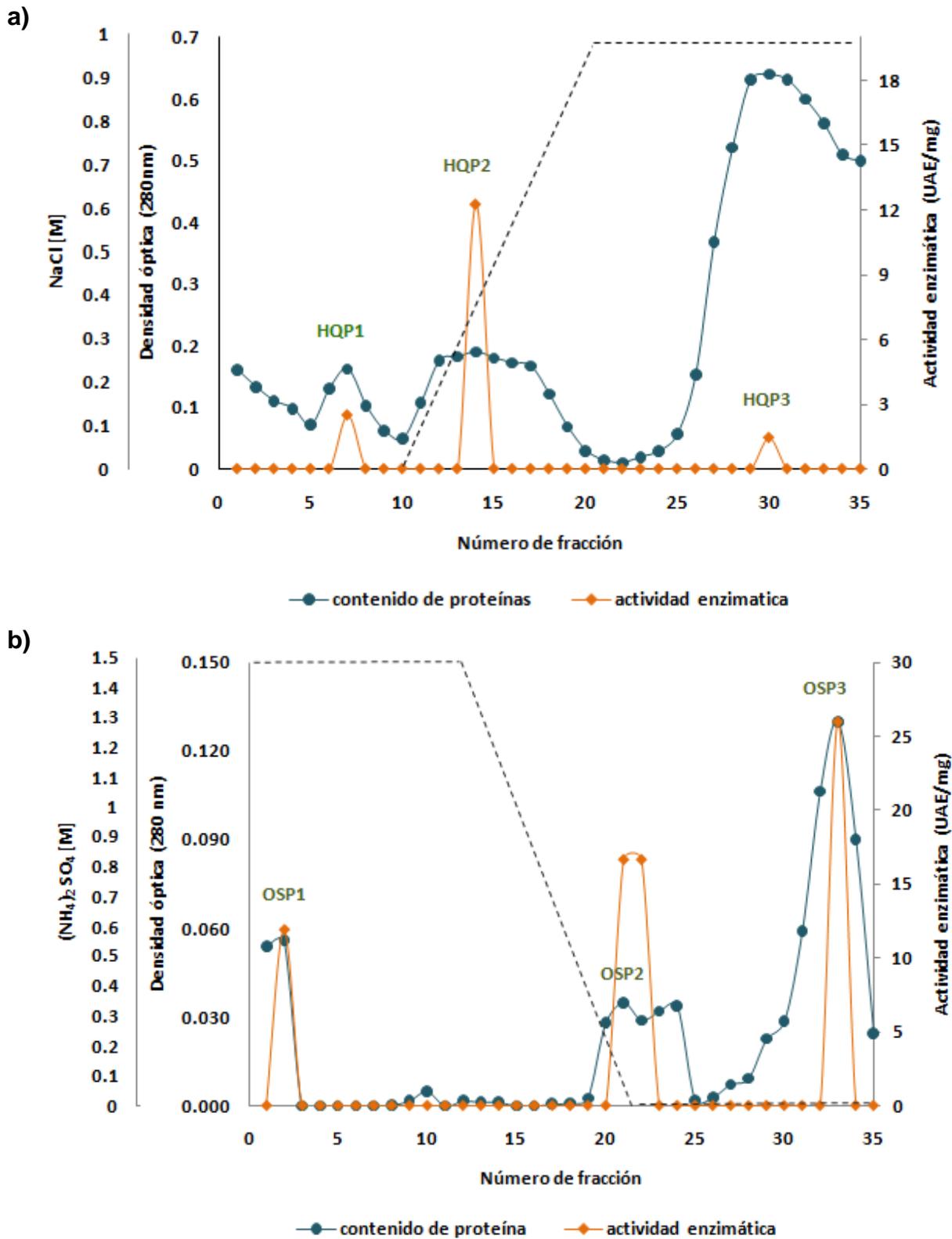


Figura 10. Purificación de la Xaa-Pro-DAP de semillas de cacao (*Theobroma cacao* L). a) Cromatografía de intercambio iónico en HQ-Sepharosa; b) cromatografía de interacción hidrofóbica en Octyl-Sepharosa CL-4B.

7.2.2 Determinación del peso molecular relativo y tamaño molecular por dispersión dinámica de luz

El peso molecular relativo de la proteína nativa fue estimado en 80 kDa (Figura 11). La enzima no mostró actividad en presencia de SDS, y por tanto debe encontrarse en un estado polimérico para ser activa (ésta es activa solo en estado nativo). Esto es debido a la naturaleza cooperativa del proceso de agregación y también porque a ciertas concentraciones de proteína resulta favorable para la molécula agregarse, debido a un incremento en las interacciones intermoleculares entre monómeros que resulta en un estado de baja energía comparada con el monómero solo. A través del estudio de dinámica molecular en una solución del extracto enzimático (E1) a una concentración de 0.09-0.019 mg/ml, se observó que el monómero tiene una fuerte tendencia a agregarse bajo condiciones nativas (Figura 12a). A 25 °C, coexisten un tetrámero y un agregado de alto peso molecular (inserto en Figura 12a), el tetrámero formó un 97.3 % de la población en la distribución de peso molecular. Conforme la temperatura incrementa, el tetrámero se desdobra en dímeros con la presencia de un polímero de muy alto peso molecular (mostrado en el inserto de la Figura 12a), el cual indica el inicio del proceso de desnaturalización. A 40 °C, se observaron octámeros y dímeros, mientras que 50 °C coexisten pentámeros y monómeros, y finalmente a 80 °C únicamente se observaron monómeros de la proteína. Estos monómeros tienen un diámetro de 33.28 nm y un índice de polidispersidad (Pdl) de 0.072 en un sistema mono-disperso (Figura 12b).

La enzima parcialmente purificada a una concentración de 0.1416 mg/ml mostró una sola especie de 166 nm de diámetro molecular (Figura 12b).

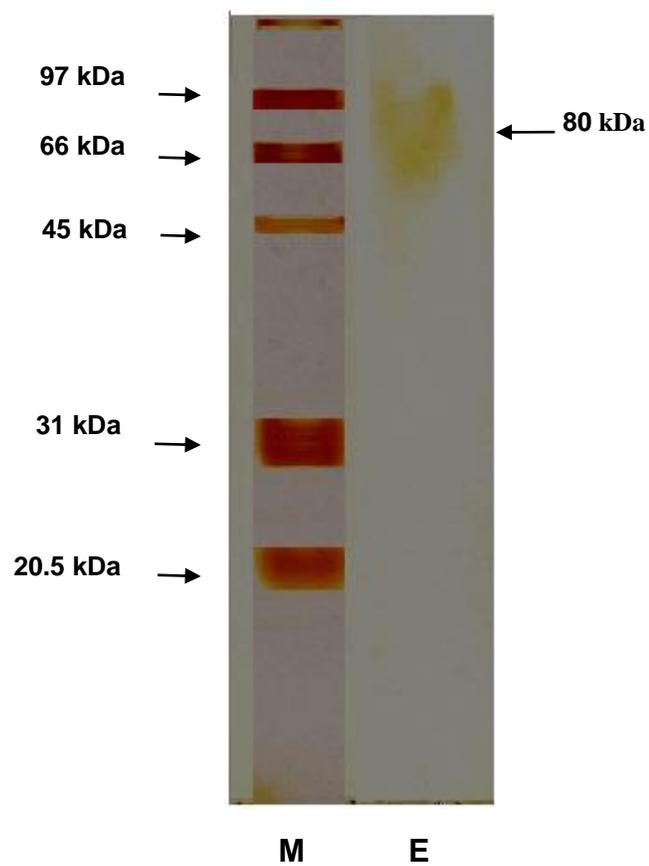
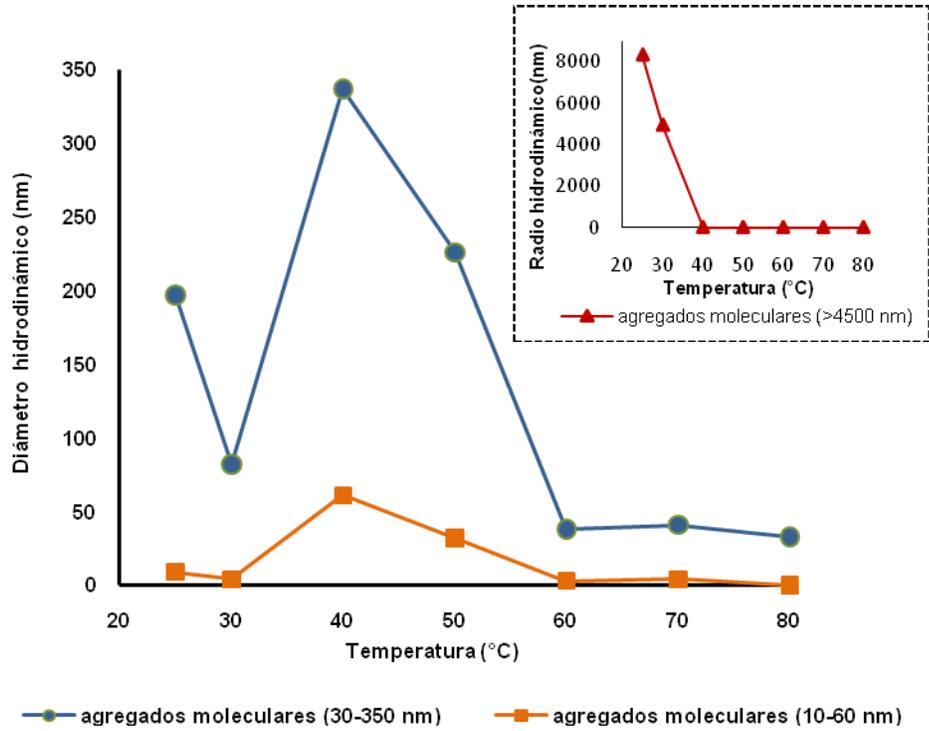


Figura 11. PAGE-Nativa. Actividad Xaa-Pro-DAP detectada con el sustrato Alanina-Prolina-4-metoxi-βeta-naftilamida (Ala-Pro-4μβNA) en el extracto enzimático E1 al 40 % de saturación con (NH₄)₂SO₄. Donde M= Marcador de bajo peso molecular. E= extracto enzimático E1.

a)



b)

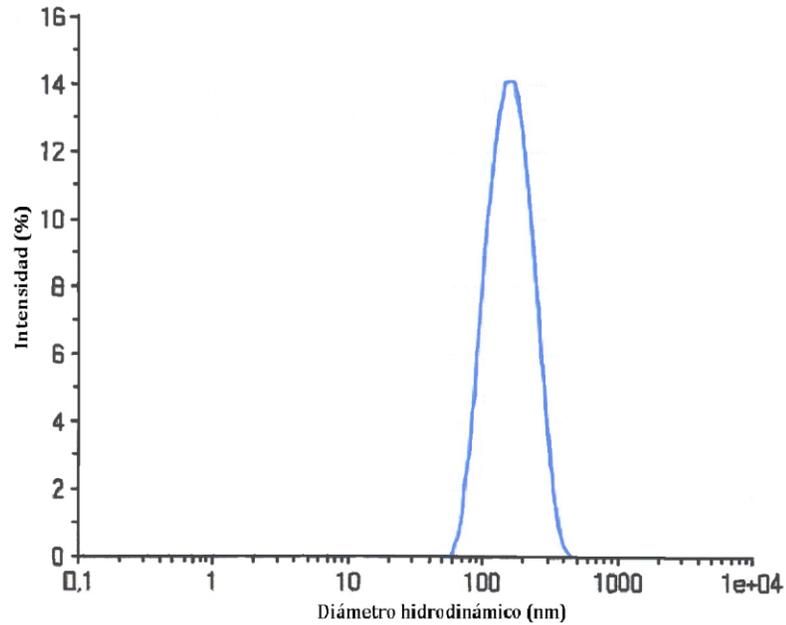


Figura 12. Análisis de distribución de tamaño molecular mediante dispersión dinámica de luz. a) Promedio de la distribución de tamaño molecular durante el tratamiento térmico de Xaa-Pro-DAP y b) distribución de tamaño molecular en condiciones nativas at 25 °C. de la Xaa-Pro-DAP parcialmente purificada

7.2.3 Actividades exopeptidasa en el extracto E1 de *T. cacao* L.

Las peptidasas identificadas en el proceso de purificación fueron solubilizadas a pH neutro usando 1 % de tritón X-100, indicando que son enzimas ligadas a membrana. Una de las razones de la escasa información disponible sobre las propiedades de las enzimas de cacao es probablemente la dificultad de lograr su completa solubilización. Los resultados de las pruebas de la actividad enzimática sobre diferentes sustratos se muestran en el Cuadro 4. Con respecto a los diferentes sustratos probados, el grado de hidrólisis de los sustratos a concentraciones de 10 mM fue la siguiente, en orden decreciente: Ala-pNA > Gly-Pro-pNA > Ala-Pro-pNA > Leu-pNA > Ala-Ala-Pro-pNA > Arg-Pro-pNA > Bz-Tyr-pNA > Lys-pNA. La actividad más alta frente a los sustratos con X-Pro como secuencia N-terminal se detectó con Gly-Pro-pNA, seguido por Ala-Pro-pNA, Ala-Ala-Pro-pNA y Arg-Pro-pNA. La actividad relativa frente a estos sustratos mostró que el residuo N-terminal ejerce un efecto en la especificidad de la enzima con el siguiente orden de preferencia: glicina, alanina y arginina.

La actividad aminopeptidasa (APE) también fue identificada y los valores más altos fueron encontrados con el sustrato Ala-pNA seguido de Leu-pNA, ambos a 10 mM. La aminopeptidasa no específica (Tipo N) (E.C. 3.4.11.1) es una aminopeptidasa con amplia especificidad de sustrato que ha sido encontrada en numerosas cepas de bacterias ácido lácticas, siendo muy activa con Lys-pNA, Leu-pNA (Gómez de la Cruz, 1996) y Ala-pNA (Magboul y McSweeney, 2000). APE ha sido reportada como la segunda enzima más prevaleciente después de la peptidasa aspártica (AP) (E.C. 3.4.23) en semillas de cacao fermentadas. Por consiguiente, el sustrato Lys-pNA también probado, tuvo un bajo grado de hidrólisis comparado con Ala-pNA y Leu-pNA a 10 mM. Con respecto a Lys-pNA, se observó mayor actividad a 1 mM que a 10 mM, lo cual sugiere un fenómeno de inhibición por sustrato frente a la enzima APE.

El sustrato Bz-Tyr-pNA fue hidrolizado a una mayor proporción a 10 mM que a 1 mM, confirmando la presencia de actividad carboxipeptidasa (CP) (E.C.

3.4.17). Se ha reportado una actividad sinérgica entre la aspartil peptidasa y carboxipeptidasa durante la fermentación de cacao (Biehl y Voigt, 1994). De manera similar, Xaa-Pro-DAP de *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1 y una aminopeptidasa no-específica (Tipo N) mostraron un efecto sinérgico en el incremento del grado de hidrólisis del gluten (Byun y col., 2001). Por tanto, los resultados obtenidos muestran que estas enzimas trabajan de manera concertada durante el proceso de germinación para degradar las proteínas de reserva, un proceso requerido en la formación de las plántulas.

La enzima Xaa-Pro-DAP es importante en cacao porque las semillas de cacao contienen un grupo de proteínas que tienen prolina en su estructura (en concentraciones de 0.72-1.97 %), las cuales son los sustratos naturales de la enzima (Kalvatchev y col., 1997). Como se muestra en el Cuadro 4, la especificidad de la enzima Xaa-Pro-DAP parcialmente purificada de *T. cacao* fue observada con sustratos de *p*-NA. Los máximos rangos de hidrólisis fueron obtenidos cuando la prolina estaba en N-penúltima posición en los sustratos ensayados. Entre los sustratos colorimétricos, Ala-Pro-*p*NA fue hidrolizado en la mayor proporción, lo cual indica una alta preferencia por el aminoácido Ala adyacente a prolina, seguido por Gly-Pro-*p*NA, Arg-Pro-*p*NA y Ala-Ala-Pro-*p*NA. El grado de hidrólisis incrementó en todos los sustratos con secuencia X-Pro en N-terminal comparado con el extracto (E1), indicando alta actividad Xaa-Pro-DAP debida al proceso de purificación, el cual también disminuyó la concentración de actividad de tipo aminopeptidasa y carboxipeptidasa. Una preferencia de sustrato similar fue reportada para la enzima purificada de *L. sakei*, la cual hidrolizó casi exclusivamente sustratos con secuencia X-Pro amino terminal (Bordallo y col., 1984) mostrando preferencia por Ala, Arg y Gly, en orden decreciente (Sanz y Toldrá, 2001).

Por otra parte, también fue detectada la hidrólisis de los sustratos Leu-*p*NA (1 y 10 mM), Lys-*p*NA y Bz-Tyr-*p*NA (10 mM), indicando que las enzimas aminopeptidasa y carboxipeptidasa estaban aún presentes en las fracciones de la

enzima parcialmente purificada, aunque sus actividades fueron bastante bajas comparadas con la actividad de Xaa-Pro-DAP detectada en la enzima parcialmente purificada. Leu-pNA mantuvo el nivel de hidrólisis detectado en el extracto enzimático (E1), mientras que Lys-pNA y Bz-Tyr-pNA disminuyeron sus actividades hasta casi la mitad de los detectados en el extracto enzimático (E1). El sustrato Ala-pNA no fue hidrolizado, indicando la ausencia de aminopeptidasa no-específica. Es claro, sin embargo que la actividad Xaa-Pro-DAP incrementó casi 10 veces comparada con la actividad encontrada en el extracto enzimático (E1) durante el curso de la purificación. Hasta ahora, se contaba con escasa información sobre las características bioquímicas de aminopeptidasas y carboxipeptidasas presentes en cacao.

Cuadro 4. Actividad exopeptidasas en Theobroma cacao frente a varios sustratos cromogénicos.

Sustrato ^a	Actividad específica (UAE ^b /mg) (valor promedio \pm S.D. (n=3))	
	1 mM	10 mM
Extracto enzimático E1		
Ala-pNA	1.51 \pm 0.022	2.35 \pm 0.017
Gly-Pro-pNA	0.93 \pm 0.003	1.91 \pm 0.001
Ala-Pro-pNA	0.88 \pm 0.030	1.73 \pm 0.011
Leu-pNA	0.70 \pm 0.016	1.62 \pm 0.000
Ala-Ala-Pro-pNA	0.81 \pm 0.001	1.30 \pm 0.023
Arg-Pro-pNA	0.52 \pm 0.009	1.14 \pm 0.005
Bz-Tyr-pNA	0.59 \pm 0.007	0.90 \pm 0.060
Lys-pNA	0.90 \pm 0.001	0.73 \pm 0.009
Xaa-Pro-DAP parcialmente purificada		
Ala-Pro-pNA	4.81 \pm 0.001	24.06 \pm 0.001
Gly-Pro-pNA	2.84 \pm 0.002	6.41 \pm 0.002
Arg-Pro-pNA	1.09 \pm 0.002	4.37 \pm 0.001
Ala-Ala-Pro-pNA	0.65 \pm 0.001	2.18 \pm 0.002
Leu-pNA	0.65 \pm 0.001	1.33 \pm 0.001
Bz-Tyr-pNA	0.24 \pm 0.001	0.54 \pm 0.003
Lys-pNA	n.d.	0.45 \pm 0.002
Ala-pNA	n.d.	n.d.

n.d. = No detectada.

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

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

7.2.4 Efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática

El Cuadro 5 muestra los efectos de los inhibidores sobre la actividad Xaa-Pro-DAP en el extracto enzimático (E1) de *T. cacao*. Los mejores inhibidores a 0.1 mM fueron PMSF, PCMB y pepstatina, los cuales causaron una disminución de 54, 40 y 39 % del máximo de actividad, respectivamente. Incrementos en el poder inhibitorio directamente proporcional a la concentración solo fueron observados con leupeptina (12-29 %), diprotina (18-29 %) y PCMB (40-49 %). Los químicos que reaccionan con grupos sulfhidrilos, β -mercaptoetanol, cisteína y ditioneitol no tuvieron efecto. La incubación con PCMB causó una inactivación considerable de la actividad de Xaa-Pro-DAP. Esto indica el posible involucramiento del grupo (s) funcional sulfhidrilo en o cerca del sitio activo de la enzima, lo cual confirma la presencia de cisteín peptidasa, la cual ha sido previamente aislada (Biehl y col., 1991). Estos autores mencionan que es muy probable que ésta no participe en la hidrólisis de proteínas de reserva en semillas no germinadas. Por otro lado, su actividad se incrementa durante el proceso de germinación cuando ocurre la degradación de proteínas globulares de reserva. Sin embargo, todas las Xaa-Pro-DAP provenientes de bacterias ácido lácticas citadas en la literatura son consideradas como serin peptidasas; muchos autores han reportado que los grupos sulfhidrilos también podrían ser importantes para la actividad de la enzima (Miyakawa y col., 1994; Miyakawa y col., 1991).

Con respecto a los inhibidores específicos de serin peptidasas probados tales como leupeptina, AEBSF, pefabloc y PMSF, solo leupeptina y PMSF tuvieron un efecto inhibitorio. La presencia de una carboxipeptidasa ha sido reportada en cacao, la cual ha sido caracterizada como una serin peptidasa que actúa sobre aminoácidos hidrofóbicos y es inhibida por PMSF. Las diferencias observadas entre los diferentes inhibidores de serin peptidasas mostraron que la sulfonilación de la proteína es un mecanismo de inhibición más efectivo que la acilación. La actividad de Xaa-Pro-DAP fue reducida un 39 % por 0.1 mM de pepstatina A, un inhibidor de peptidasa aspártica. Se sabe que la actividad de AP permanece constante durante los primeros días de la germinación y no disminuye antes de la

degradación de globulina (Guilloteau y col., 2005). Los inhibidores de metalopeptidasas analizados en el presente estudio mostraron inhibición en el rango de 0-14 % para bestatina, 18-29 % para diprotina A y 11-21 % para EDTA. De acuerdo con estos resultados, el extracto enzimático (E1) de *T. cacao* germinado contiene una cisteín metalopeptidasa además de las enzimas aminopeptidasa y carboxipeptidasa. Las enzimas carboxipeptidasa y aminopeptidasa fueron originalmente identificadas en cacao y otras plantas como metalopeptidasas (Tishinov y col., 2009; Mercado-Flores y col., 2004).

Para determinar las propiedades bioquímicas de la Xaa-Pro-DAP parcialmente purificada, la actividad enzimática fue medida en presencia de diferentes inhibidores enzimáticos (Cuadro 5). Uno de los inhibidores enzimáticos fue el agente quelante EDTA (0.1 mM), el cual causó una disminución de 44 % de la actividad original, indicando que los iones metálicos están involucrados en la función o estabilidad de la enzima. Esto significa que la Xaa-Pro-DAP parcialmente purificada es una metaloenzima. Estos resultados difieren de los reportes de Xaa-Pro-DAP de *Lactobacillus helveticus* ITG LH1 (Degraeve y Martial-Gros, 2003), la cual no fue inactivada por agentes quelantes tales como el EDTA o 1, 10 fenantrolina. La actividad de Xaa-Pro-DAP parcialmente purificada fue reducida un 25 % por bestatina a 0.1 mM, un inhibidor de leucina aminopeptidasa, pero este efecto sobre la actividad disminuyó a 1 mM, debido probablemente a la inactivación de la aminopeptidasa presente, reflejándose en una menor o nula acción proteolítica de la aminopeptidasa sobre la Xaa-Pro-DAP. Esta enzima fue ligeramente inhibida por un inhibidor de dipeptidil aminopeptidasa (diprotina A a 0.1 mM). La pepstatina A, un inhibidor de peptidasa aspártica, no tuvo efecto en su actividad enzimática (Cuadro 5). Bajo las mismas condiciones, la enzima fue inhibida un 48 % y 36 % por inhibidores de serin peptidasas, PMSF a 0.1 mM y leupeptina a 1.0 mM. El efecto de AEBSF y pefabloc; otros inhibidores de serin peptidasas, fue insignificante (Cuadro 5). Los resultados de estos inhibidores de serin peptidasa corroboran que la Xaa-Pro-DAP es una serin peptidasa.

Adicionalmente, los agentes reductores ditioneitol, cisteína y β -mercaptoetanol, así como el agente de grupos sulfhidrilos PCMB, no tuvieron algún efecto sobre su actividad. Estos resultados sugieren que la Xaa-Pro-DAP parcialmente purificada no pertenece a la familia de cisteín peptidasa. La actividad de cisteín peptidasa identificada en el extracto enzimático (E1) no fue detectada en la Xaa-Pro-DAP sema-purificada, debido probablemente a su eliminación durante el proceso de purificación.

Cuadro 5. Efecto de los inhibidores y/o activadores sobre la actividad exopeptidasa en *Theobroma cacao* L.

Inhibidor ^b	Actividad relativa ^a (%)			
	Extracto Enzimático E1		Xaa-Pro-DAP parcialmente purificada	
	0.1 mM	1.0 mM	0.1 mM	1.0 mM
Diprotina A	82	71	76	86
PMSF	46	68	52	83
EDTA	89	79	56	61
PCMB	60	51	115	99
Leupeptina	80	76	92	64
Pepstatina A	61	80	82	84
Bestatina	86	154	75	126
AEBSF	102	112	91	97
Pefabloc	115	131	92	101
Cisteína	109	104	64	92
β -mercaptoetanol	72	115	74	97
Ditioneitol	85	109	62	70
Blanco	100	100	100	100

^a Expresada como un porcentaje de hidrólisis de Ala-Pro-pNA en la ausencia de cualquier agente químico añadido, a el cual fue dado el valor de 100%.

^b PMSF, fenil metil sulfonil fluoruro; EDTA, ácido etilen diamino tetracético; PCMB, *p*-cloro mercuribenzoato, AEBSF, 4-(2-aminoetil) bencenosulfonil fluoruro.

7.2.5 Efecto de cationes divalentes sobre la actividad Xaa-Pro-DAP de *T. cacao* L.

El Cuadro 6 muestra el efecto de iones metálicos sobre la actividad de Xaa-Pro-DAP en el extracto enzimático (E1) y en la enzima parcialmente purificada. Se ha reportado que los iones de Ca^{2+} y Mg^{2+} incrementan la actividad de cisteín peptidasa (Davy y col., 1998); la ausencia de este efecto sobre Xaa-Pro-DAP corrobora la conclusión que ésta es una serin peptidasa más que una cisteín peptidasa. Co^{2+} y Ca^{2+} (1 mM) inhibieron la actividad enzimática un 52 y 51 % respectivamente, mientras que otros cationes divalentes probados causaron un 31-48 % de inhibición. De acuerdo con algunos autores, los cationes Cu^{2+} , Hg^{2+} y Zn^{2+} son fuertes inhibidores de la actividad Xaa-Pro-DAP en bacterias tales como *L. helveticus* CNRZ 32, *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* y *L. acidophilus*. En *Lactobacillus sakei* estos cationes no tuvieron efecto inhibitorio significativo (Sanz y Toldrá, 2001). La actividad de Xaa-Pro-DAP disminuyó al incrementar la fuerza iónica por el efecto del NaCl en el extracto enzimático.

La actividad de Xaa-Pro-DAP parcialmente purificada fue inhibida un 44 % y 67 % por la presencia de 1.0 mM de Cu^{2+} y Cd^{2+} , respectivamente. Una inhibición similar por Cu^{2+} y Cd^{2+} fue encontrada para Xaa-Pro-DAP de *L. sanfranciscensis* CB1 (Gallo y col., 2005). Los otros cationes divalentes probados tuvieron poco o nulo efecto sobre la enzima parcialmente purificada (Cuadro 6). Los iones de cobalto a 0.1 mM incrementaron la actividad enzimática un 34 %, pero esto no sucede cuando la concentración de sal fue de 1 mM. Este efecto es debido probablemente a la escisión proteolítica de Xaa-Pro-DAP por la enzima residual cobalto-activada carboxipeptidasa y aminopeptidasa. Algunos estudios sobre el efecto del cobalto en carboxipeptidasas (Kishimura y col., 2006; Cheng y col., 1999) y aminopeptidasas (Dong y col., 2005; Bolumar y col., 2003) reportaron incrementos de 1.7 a 50 veces la actividad original usando de 4 μM a 1 mM CoCl_2 . Sin embargo, no toda la actividad aminopeptidasa citada en la literatura es considerada cobalto-activada y algunos autores han reportado fuerte inhibición de

una leucina-aminopeptidasa por Co^{2+} a 10 mM (Mercado-Flores, 2004; Mohamed y col., 2009).

Finalmente, la diferencia causada por adición de NaCl a 0.1 mM no tuvo efecto sobre la actividad de la enzima parcialmente purificada, mientras que el incremento de la fuerza iónica disminuyó la actividad enzimática (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto de cationes metálicos sobre la actividad de exopeptidasa en *Theobroma cacao* L.

Sal Metálica	Actividad relativa ^a (%)			
	Extracto Enzimático		Xaa-Pro-DAP parcialmente purificada	
	0.1 mM	1.0 mM	0.1 mM	1.0 mM
BaCl ₂	74	69	84	76
CoCl ₂	117	48	134	75
ZnCl ₂	70	59	77	85
CaCl ₂	104	49	96	82
CuCl ₂	74	52	63	56
MgCl ₂	89	115	72	98
CdCl ₂	97	55	98	33
NaCl	108	75	103	84

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

7.3 Caracterización del extracto enzimático E2

7.3.1 Determinación de peso molecular relativo de Xaa-Pro-DAP en el extracto enzimático E2.

En la Figura 13 se muestra la Xaa-Pro-DAP proveniente del extracto enzimático en PAGE-Nativa revelado con Ala-Pro-4 μ β NA, obteniéndose un peso molecular relativo de 60 kDa. Basado en ensayos en geles SDS-PAGE, en presencia de SDS, la enzima no presenta actividad enzimática.

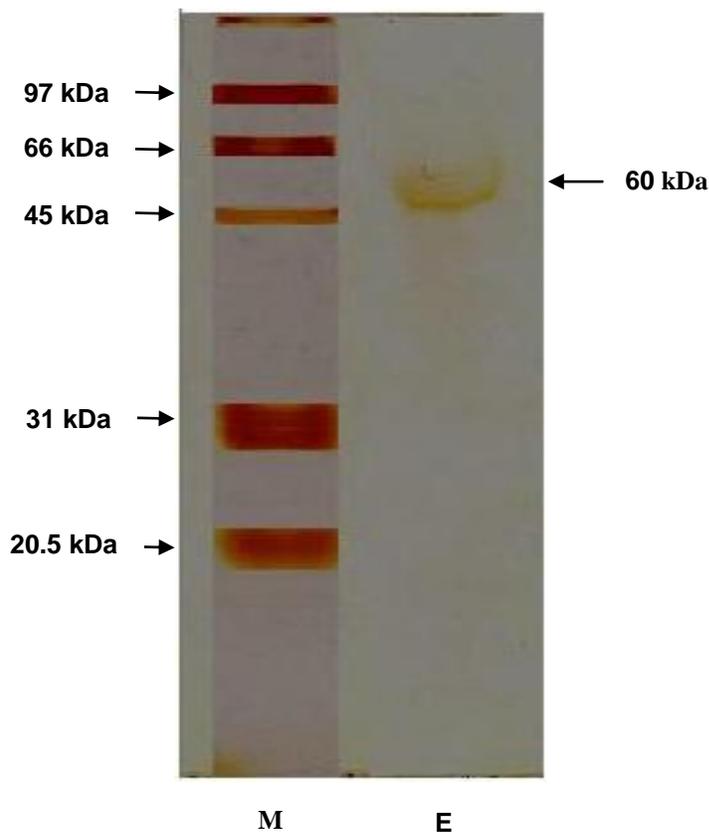


Figura 13. PAGE-Nativa. Actividad de Xaa-Pro-DAP detectada con el sustrato Alanina-Prolina-4-metoxi-beta-naftilamida (Ala-Pro-4 μ β NA) en el extracto enzimático E2 al 80% de saturación $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Donde M= Marcador de bajo peso molecular y E: Extracto enzimático E2.

7.3.2 Actividad enzimática en el extracto enzimático E2 de *T. cacao*

Los resultados de la actividad enzimática sobre los diferentes sustratos ensayados se muestran en el Cuadro 7. El grado de hidrólisis en orden decreciente, a una concentración de sustrato de 10 mM fue a continuación: Gly-Pro-pNA > Ala-Pro-pNA > Leu-pNA > Lys-pNA > Arg-Pro-pNA > Ala-pNA > Ala-Ala-Pro-pNA > Bz-Tyr-pNA. De los sustratos con prolina en la N-penúltima posición, el mayor grado de hidrólisis se obtuvo con Gly-Pro-pNA a 10 mM, seguido de Ala-Pro-pNA, Arg-Pro-pNA y Ala-Ala-Pro-pNA, lo que muestra la preferencia de la Xaa-Pro-DAP por el aminoácido Gly adyacente a la prolina, seguido por alanina y finalmente arginina.

Al aumentar la concentración de sustrato se incrementó la actividad, tal que con Gly-Pro-pNA se obtuvo un incremento de actividad de 8.7 veces en 10 mM con respecto a 1 mM, mientras que con Leu-pNA el incremento fue de 2.2 veces, y para Ala-Pro-pNA fue de 1.7 veces, para los restantes las variaciones fueron muy pequeñas o no sufrieron cambios. Las actividades más altas de Xaa-Pro-DAP en bacterias lácticas han sido reportadas contra sustratos con N-terminal no cargados (Ala o Gly) o residuos básicos (Arg) (Sanz y Toldrá, 2001). Dada la presencia de éstas enzimas durante la germinación de la semilla de cacao, y su especificidad por prolina (aminoácido que representa un 0.72-1.97 % de las proteínas de cacao), el papel que probablemente juegan en conjunto con otras peptidasas es participar en la hidrólisis de las proteínas de reserva.

De acuerdo a la actividad frente a Leu-pNA, sustrato para aminopeptidasas y por la acción inhibitoria presentada por bestatina, se identificó actividad aminopeptidasa (APE), con los mayores grados de hidrólisis con Leu-pNA seguido de Lys-pNA a 10 mM (Cuadro 7). De igual forma, se ensayó el sustrato Ala-pNA, encontrándose un menor grado de hidrólisis en comparación con Leu-pNA y Lys-pNA a 10 mM. La aminopeptidasa no específica Tipo N [EC 3.4.11.1] identificada en una gran número de bacterias lácticas, presenta una gran actividad frente a Lys-pNA, Leu-pNA (Gómez de la Cruz, 1996) y Ala-pNA (Magboul y McSweeney,

2000). En cacao fermentado, la actividad aminopeptidasa es considerada la segunda enzima mayoritaria después de la aspartil peptidasa (AP) [EC 3.4.23] (Hansen y col., 1998). Debido a la hidrólisis del sustrato Bz-Tyr-pNA, reportado como específico para enzimas tipo carboxipeptidasas con preferencia por aminoácidos hidrofóbicos en el extremo carboxilo terminal, se confirmó la presencia de actividad carboxipeptidasa (CP)[EC 3.4.17].

Cuadro 7. Actividad de exopeptidasas frente a varios sustratos cromogénicos.

Substrato ^a	Actividad específica (UAE ^b /mg) (valor promedio ± S.D. (n=3))	
	1 mM	10 mM
Gly-Pro-pNA	0.092 ± 0.001	0.796 ± 0.006
Ala-Pro-pNA	0.315 ± 0.001	0.542 ± 0.007
Leu-pNA	0.221 ± 0.008	0.493 ± 0.006
Lys-pNA	0.275 ± 0.005	0.366 ± 0.001
Arg-Pro-pNA	0.249 ± 0.007	0.293 ± 0.001
Ala-pNA	0.278 ± 0.009	0.285 ± 0.009
Ala-Ala-Pro-pNA	0.249 ± 0.001	0.277 ± 0.008
Bz-Tyr-pNA	0.194 ± 0.001	0.254 ± 0.003

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

^b Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar una mol de pNA por min.

7.3.3. Efecto de inhibidores/activadores sobre la actividad enzimática en el extracto enzimático E2 de *T. cacao*.

El Cuadro 8 muestra el efecto de diferentes inhibidores sobre la actividad de la enzima Xaa-Pro-DAP revelando que a 0.1 mM los mejores inhibidores fueron bestatina, PCMB y diprotina A, con 52, 48 y 47 % de inhibición respectivamente; mientras que a 1 mM, los mejores inhibidores fueron AEBSF, pefabloc y diprotina, con ésta última se obtuvo un 44 % de actividad relativa. Diprotina A (Ile-Pro-Ile) ha

sido identificada como un potente inhibidor competitivo de peptidasas con actividad de dipeptidil peptidasa IV (DPP IV) (Rigolet y col., 2005). En cebada, se ha reportado una actividad relativa del 3 % con diprotina A a 0.1 mM (Cuadro 9) (Davy y col., 2000) y en *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* LBU-147, una actividad relativa del 15 % con la secuencia Ile-Pro-Ile de diprotina A (Miyakawa y col., 1991).

La reducción del 48 % de la actividad Xaa-Pro-DAP en presencia de PCMB a 0.1 mM, así como la recuperación de la actividad enzimática por agentes reductores (β -mercaptoetanol y cisteína) sugieren la presencia de una cisteín peptidasa. Mediante estudios de dicroísmo circular (CD) (datos no mostrados) se encontró baja estructura secundaria ó de tipo “random coil”, lo que sugiere la presencia de cisteín peptidasas en el extracto E2 de cacao. En *S. marcescens*, se ha estudiado que la actividad endonucleasa, la cual posee grupos-SH, es afectada bajo la influencia de PCMB mostrando cambios en la estructura secundaria en el espectro CD (Filimonova y col., 2001).

Los inhibidores de metalo-peptidasas, bestatina y EDTA redujeron un 52 % y 29 % la actividad Xaa-Pro-DAP a concentraciones de 0.1 mM. Estos niveles de inhibición indican la presencia de una metalo-proteína. Los inhibidores tal como PMSF, bestatina, EDTA en concentración de 1.0 mM ejercieron un menor efecto inhibitorio sobre la actividad de Xaa-Pro-DAP. Esto debido a la presencia de diferentes peptidasas en el extracto enzimático, las cuales también son inhibidas por los diferentes compuestos, reflejándose en una menor acción proteolítica, incrementando indirectamente la actividad Xaa-Pro-DAP en estudio; éste es el caso de la enzima aminopeptidasa reportada como serin peptidasa (Haddar, y col., 2009).

En el Cuadro 9 se muestra la especificidad de cada uno de los inhibidores probados así como el efecto inhibitorio sobre las enzimas identificadas en este estudio, entre ellas las carboxipeptidasas y aminopeptidasas de tipo

metalopeptidasas. En general, las Xaa-Pro-DAP's de diferentes especies de *Lactobacillus* y *Lactococcus* han sido identificadas como serin y cisteín peptidasas debido a su inhibición con PMSF y PMCB respectivamente. En cebada (*Hordeum vulgare*), uno de los pocos reportes al respecto en plantas, la DPP IV presenta perfiles de inhibición similares para Xaa-Pro-DAP de cacao, sensibles a AEBSF y diprotina, inhibidores de serin peptidasas específicas de prolina.

Cuadro 8. Efecto de inhibidores/activadores sobre la actividad exopeptidasa de *Theobroma cacao* L.

Inhibidor ^b	Actividad relativa ^a (%)	
	0.1 mM	1.0 mM
Leupeptina	76	94
Pepstatina A	55	53
Bestatina	48	79
Diprotina A	53	44
AEBSF	89	48
Pefabloc	84	44
PMSF	76	81
EDTA	71	83
PCMB	52	78
β-mercaptoetanol	69	84
Cisteína	53	90
Ditiotreitol	70	77

^a Expresada como un porcentaje de hidrólisis de Ala-Pro-pNA en la ausencia de cualquier agente químico añadido, a el cual fue dado el valor de 100 %.

^b PMSF, fenil metil sulfonil fluoruro; EDTA, ácido etilen diamino tetracético; PCMB, p-cloro mercuribenzoato, AEBSF, 4-(2-aminoetil) bencenosulfonil fluoruro.

Cuadro 9. Efecto de diversos inhibidores sobre la actividad peptidasa diferentes fuentes.

Inhibidor de peptidasas	Especificidad del inhibidor	Enzimas/Origen	Referencias
AEBSF ^a	Inhibidor irreversible de serin peptidasas. Inhibe por acilación el sitio activo de la enzima.	Xaa-Pro-DAP ^e / <i>Theobroma cacao</i> DPP IV ^f : <i>Hordeum vulgare</i>	Presente estudio Davy y col.,(2000)
Pefabloc	Soluble en agua y relativamente no tóxico, inhibidor irreversible de trombina y otras serin peptidasas. Inhibe por acilación del sitio activo de la enzima.	Xaa-Pro-DAP / <i>Theobroma cacao</i> Xaa-Pro-DAP/ <i>Lb. curvatus</i> DPC2024	Presente estudio Magboul y McSweeney (2000)
PMSF ^b	Inhibe irreversiblemente serin peptidasas por sulfonilación del residuo de serina del sitio activo de la peptidasa. No inhibe metalo-, aspartil y la mayoría de las cisteín peptidasas.	Xaa-Pro-DAP/ <i>Lc. lactis</i> <i>ssp. cremoris</i> NRRL634 CP ^g : <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Pérez-Guzman y col.,(2006) Ramírez-Zavala y col., (2004)
Bestatina	Inhibidor de metalopeptidasas. Inhibe aminopeptidasas (notablemente B) de superficie celular y leucina-aminopeptidasa.	APE ^h : <i>Ustilago maydis</i>	Biehl y col., (1991)
Pepstatina	Pentapeptido derivativo. Inhibidor reversible de peptidasas aspárticas (AP)	AP ⁱ : <i>Theobroma cacao</i>	Guilloteau y col., (2005)
Leupeptina	Aldehído tripeptido. Inhibidor competitivo de serin y cisteín peptidasas.	CP: <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Ramírez-Zavala y col., (2004) Hook y col., (1984)
PCMB ^c	Agente con alta especificidad por grupos sulfhidrilos.	Xaa-Pro-DAP / <i>Lb. sanfranciscensis</i> CB1 Xaa-Pro-DAP / <i>Lb. curvatus</i> DPC 2024	Gallo y col., (2005) Magboul y col., (2000)
EDTA ^d	Inhibidor de metalopeptidasas	APE: <i>Ustilago maydis</i>	Mercado-Flores y col., (2004)
Diprotina	Inhibidor reversible de la metalo-peptidasa dipeptidil aminopeptidasa IV	DPP IV: <i>Hordeum vulgare</i> Xaa-Pro-DAP / <i>Theobroma cacao</i>	Davy y col., (2000) Presente estudio

^a AEBSF: 4-(2-aminoetil) bencenosulfonil fluoruro

^b PMSF: fenil metilsulfonil fluoruro

^c PCMB: *p*-cloromercuribenzoato

^d EDTA: ácido etilenediaminetetraacético

^e Xaa-Pro-DAP: Xaa- Prolil dipeptidil aminopeptidasa

^f DPP IV: Dipeptidil aminopeptidasa IV

^g CP: Carboxipeptidasa

^h APE: Aminopeptidasa

ⁱ AP: Aspartil peptidasa

Los agentes bloqueadores de serin peptidasas, AEBSF y pefabloc inhibieron un 52 % y 56 % la actividad enzimática, sugiriendo que residuos de serina podrían estar participando en la catálisis de la enzima, como ocurre con otras Xaa-Pro-DAP de origen microbiano (Cuadro 10) (Magboul y McSweeney, 2000). Sin embargo, otro inhibidor de serin peptidasas, PMSF a 0.1 mM sólo redujo un 24 % la actividad de Xaa-Pro-DAP, la leupeptina, la cual también inhibe cisteín peptidasas, tuvo el mismo efecto sobre la actividad enzimática. Las diferencias mostradas por los diversos inhibidores de serin peptidasas revelaron que el mecanismo de acilación del sitio activo de la enzima es más efectivo que la sulfonilación, en contraste de la Xaa-Pro-DAP obtenida con precipitación al 40 % de saturación (Sánchez-Mundo y col., 2010).

El Cuadro 8 resume la especificidad de los diferentes inhibidores enzimáticos con su correspondiente mecanismo de inhibición, los cuales han sido usados en diversas peptidasas de diferentes fuentes de plantas y microorganismos, entre ellas las enzimas Xaa-Pro-DAP, APE, CP y AP. En general, AEBSF, pefabloc y PMSF, inhibidores de serin peptidasas, han mostrado efecto sobre las Xaa-Pro-DAP de origen bacteriano así como en DPP IV de cebada, siendo ésta última también afectada por diprotina A, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio. Asimismo, el PCMB también ha inhibido la actividad Xaa-Pro-DAP de origen bacteriano, como lo hizo con la Xaa-Pro-DAP de nuestro caso de estudio. Por otra parte, bestatina, EDTA y leupeptina han tenido efecto inhibitorio sobre APE y CP de diferentes orígenes y las detectadas en este estudio.

Los resultados revelaron la presencia de al menos tres características estructurales de las peptidasas Xaa-Pro-DAP en el extracto enzimático E2 de *T. cacao*: a) una de tipo serin-peptidasa, b) otra tipo cisteín-peptidasa y c) carácter metálico, además de una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa. Las enzimas aminopeptidasa y carboxipeptidasa han sido reportadas como metalo-peptidasas (Tishinov y col., 2009; Biehl y col., 1991; Ramírez-Zavala y col., 2004).

Cuadro 10. Comparación de los efectos de inhibidores /cationes y sustratos sobre la Xaa-Prolil-dipeptidil aminopeptidasa de diversas fuentes.

Origen	Sustrato Cromogénico	Inhibidor		Referencia
		Cationes divalentes	Agentes	
<i>Theobroma cacao</i> L.	Gly-Pro-pNA, Ala-Pro-pNA	Cu ²⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺	PCMB ^a , AEBSF ^b , Diprotina A	Presente estudio
<i>Hordeum vulgare</i> L.	n.d	n.d	PMSF ^d , AEBSF ^b Diprotina A	Davy y col., (2000)
<i>Lb. helveticus</i> ITG LH1	Ala-Pro-pNA, Arg-Pro-pNA	Sn ²⁺ , Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Fe ²⁺	PCMB ^a , NEM ^e , PMSF ^d , EDTA ^c	Degraeve y Martial-Gros, (2003)
<i>Lb. sanfranciscensis</i> CB1	Gly-Pro-pNA	Zn ²⁺ , Hg ²⁺ , Mn ²⁺	PCMB ^a , 3,4Dicloroisocumarina,	Gallo y col., (2005)
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> LBU 147	Ala-Pro-pNA, Arg-Pro-pNA Gly-Pro-pNA	Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Fe ³⁺	PCMB ^a , PMSF ^d , Diprotina A	Mercado-Flores y col., (2004)
<i>Lb. sakei</i> CECE 4808	Ala-Pro-pNA, Arg-Pro-pNA	Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺	PMSF ^d	Sanz y Toldra (2001)
<i>Lb. curvatus</i> DPC 2024	Ala-Pro-pNA, Arg-Pro-pNA, Gly-Pro-pNA	Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , Cd ²⁺ , Zn ²⁺	PCMB ^a , PMSF ^d , EDTA ^c	Magboul y McSweeney (2000)
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> NRRL 634	Arg-Pro-pNA, Lys-Pro-pNA	n.d.	PMSF ^d	Pérez-Guzman y col., (2006)

n.d.: No determinado.

^a PCMB: *p*-cloromercuribenzoato

^b AEBSF: 4-(2-aminoetil) bencenesulfonil fluoruro

^c EDTA: ácido etilenediaminotetraacético

^d PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro

^e NEM: *N*-etilmaleimida

7.3.4. Efecto de cationes divalentes y sodio sobre la actividad Xaa-Pro-DAP en el extracto enzimático E2

El Cuadro 11 describe el efecto de los cationes divalentes y el sodio sobre la actividad enzimática. La presencia de Cu²⁺ a 0.1 mM disminuyó la actividad 46 %; los cationes Ba²⁺, Mg²⁺ y Ca²⁺ a 0.1 mM disminuyeron la actividad un 38, 34 y 30 % respectivamente. Los cationes restantes disminuyeron la actividad en niveles

de 27 % con Cd^{2+} y de 20 % con Co^{2+} . Los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} causaron un 46 % de inhibición a 1mM y el Zn^{2+} un 30 %, mientras que se observó un ligero efecto (10-14%) en presencia de Na^+ y Ba^{2+} . Al incrementar la concentración de los cationes (Ba^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Na^+ y Co^{2+}) a 1 mM, su poder inhibitorio fue bajo, resaltando el caso del Co^{2+} que indujo la recuperación completa de la actividad enzimática Xaa-Pro-DAP. Estos resultados probablemente debido a las interacciones entre peptidasas con menor especificidad por el sustrato empleado, tales como AP, APE y CP, de tal manera que la actividad de Xaa-Pro-DAP es favorecida indirectamente. Para la APE de *U. maydis*, la presencia de Cu^{2+} , Hg^{2+} y Zn^{2+} a 1 mM indujeron la inhibición completa en la enzima purificada. Otros cationes, tales como Co^{2+} , Ni^{2+} y Mn^{2+} tuvieron un fuerte efecto inhibitorio sobre la APE (Mercado-Flores y col., 2004). Los cationes Cu^{2+} , Hg^{2+} y Zn^{2+} , han sido reportados como fuertes inhibidores de la actividad Xaa-Pro-DAP de *L. helveticus* ITG LH1 y *L. delbrueckii subsp bulgaricus*. En *Lactobacillus sakei*, estos cationes causaron un 53 % a 78 % de inhibición, mientras que otros cationes no tuvieron efecto inhibitorio sobre la actividad (Sanz y Toldrá, 2001). El efecto de la fuerza iónica debida al cloruro de sodio reveló que la actividad aumenta al incrementarse la fuerza iónica en el medio. La coordinación de cationes monovalentes juega un papel influyente en muchas reacciones catalizadas por enzimas (Di Cera, 2006; Page y Di Cera, 2006). Debido a las limitadas propiedades electrostáticas, el Na^+ y K^+ son los agentes óptimos para la estabilización del estado conformacional activo de una enzima o facilitando las interacciones electrostáticas entre enzima y sustrato (Page y Di Cera, 2008).

El Cuadro 10 describe una comparación del efecto de inhibidores/cationes y especificidad de sustratos de Xaa-Pro-DAP de diferentes orígenes. Los datos obtenidos en el presente trabajo es uno de los pocos reportes de Xaa-Pro-DAP en plantas, además de su estudio en cebada, en contraste a los abundantes estudios en bacterias ácido-lácticas, las cuales utilizan sustratos ricos en prolina para su crecimiento. Estos estudios comparten características con la Xaa-Pro-DAP de cacao en este estudio: sensibilidad a inhibidores de serin peptidasas (PMSF,

AEBSF), inhibición por diprotina A y PCMB, y en algunos casos, reducción de la actividad por agentes quelantes. Asimismo, la inhibición por los iones Cu^{2+} y Hg^{2+} es la reportada más frecuentemente. Finalmente, la Xaa-Pro-DAP de estudio mostró preferencia por sustratos Gly-Pro-pNA y Ala-Pro-pNA, este último hidrolizado en la mayoría de las Xaa-Pro-DAP de origen bacteriano.

Cuadro 11. Efecto de cationes divalentes y sodio sobre la actividad exopeptidasa de *Theobroma cacao* L.

Sal metálica	Actividad relativa (%)	
	0.1 Mm	1.0 mM
BaCl ₂	62	90
CoCl ₂	80	102
CdCl ₂	73	76
ZnCl ₂	81	70
CuCl ₂	54	74
NaCl	51	86
CaCl ₂	70	54
MgCl ₂	66	54

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

7.3.5. Interacciones proteína-catión mediante dispersión dinámica de luz en el extracto enzimático E2

Los efectos de las sales sobre la agregación de la proteína fueron monitoreados por dispersión dinámica de luz debido a su alta sensibilidad, por lo que la hace una herramienta útil para este tipo de estudios. Los valores de la intensidad del diámetro promedio en nanómetros y el índice de polidispersidad (Pdl) (un estimado del amplio de la distribución) fueron determinados como se define en ISO13321 (1996).

Con respecto a el extracto enzimático (E2), la intensidad de distribución de tamaño a 25 °C reveló tres grupos proteicos de alrededor de 8.281 nm, 151.4 nm y 4987 nm de diámetro, mostrando un mayor estado de asociación en el intervalo de 151.4 nm con una intensidad de 73.1 %. Las interacciones (proteína-catión) del extracto enzimático con los diferentes cationes probados ambos, a concentraciones de 0.1 y 1 mM a 25 °C revelaron, de acuerdo a la distribución de diámetros hidrodinámicos, tres grupos de agregación (≤ 10 nm; $10 \leq 100$ nm; $100 \leq 4000$ nm). La observación de un alto porcentaje de intensidad en la señal, pone en evidencia que las interacciones proteína-catión más importantes fueron para CdCl_2 y CuCl_2 a 0.1 mM, presentando para CdCl_2 tres grupos con diámetros hidrodinámicos de 12.7 nm (20 %), 141 nm (76 %) y 5021 nm (4 %) y para CuCl_2 de 9.9 nm (8 %), 104.9 nm (90 %) y 4801 nm (2 %). Son notables las interacciones con CaCl_2 a 0.1 mM y 1 mM, las cuales alcanzaron la mayor intensidad de los cationes probados con un diámetro hidrodinámico de 153.1-131.6 nm. Esta distribución de tamaño es multi-modal, es decir, revela la presencia de diferentes grupos proteicos, indicando agregación proteica que se refleja en pérdida de actividad enzimática de Xaa-Pro-DAP (Cuadro 11). Al incrementar la fuerza iónica en el medio con la adición de las sales a 1 mM (Figura 14a) se induce una menor variación en la distribución de tamaño, pero con el mismo comportamiento multi-modal, indicando que la agregación inducida por los cationes a 1 mM podría deberse a la unión de un ión metálico en un sitio específico de la proteína. Existe evidencia de que iones metálicos pueden acelerar el proceso de agregación de

diversas proteínas como ocurre en el proceso de desnaturalización y agregación de β -lactoglobulina A (BLG-A) en la presencia de los iones metálicos de Cu^{2+} y Zn^{2+} (Stirpe y col., 2008). Sin embargo, destacan las interacciones con el CuCl_2 y el CdCl_2 , en las cuales los tamaños de distribución son monomodales, con diámetros hidrodinámicos de 158.5 y 119 nm con un índice de polidispersidad (Pdl) = 0.242 y 0.211 respectivamente, indicando una tendencia de tamaño molecular homogéneo o de polidispersidad media; lo anterior está relacionado con el incremento en la actividad enzimática de Xaa-Pro-DAP debido a una menor agregación proteica produciendo desnaturalización inducida por los iones. El CoCl_2 favoreció la agregación de varios grupos con diferentes tamaños moleculares, en contraste con su efecto sobre la actividad, la cual es restablecida a 1 mM.

Los incrementos de temperatura revelaron una mayor variación en la distribución de diámetros hidrodinámicos generados en las interacciones con las sales en estudio; sin embargo, la formación de agregados moleculares (interacción proteína-cation) se observaron entre 10 nm y 70 nm (Figura 14b), esto es muy evidente a 0.1 mM a 40 °C y 50 °C.

A 40 °C, con 0.1 y 1.0 mM, se observaron agregados mayores que 5000 nm (Figura 14b), que llegan a desnaturalizarse a temperaturas superiores a 50 °C (Figura 14c), generando agregados de gran tamaño, excepto los formados con MgCl_2 , indicando que probablemente le confiere estabilidad térmica a los polímeros. Para CuCl_2 a 1 mM, el comportamiento monomodal se mantiene hasta los 60 °C con un tamaño promedio de 154.9 nm y Pdl=0.224 (inserto Figura 14c; Figura 15a). Una distribución similar es obtenida con CdCl_2 a 1 mM (inserto Figura 14d; Figura 15b), pero ésta se mantiene hasta 80 °C, es decir, estos cationes favorecen la estabilización proteica, ya que no hay un incremento evidente en los tamaños de las proteínas subsecuente al proceso de desnaturalización.

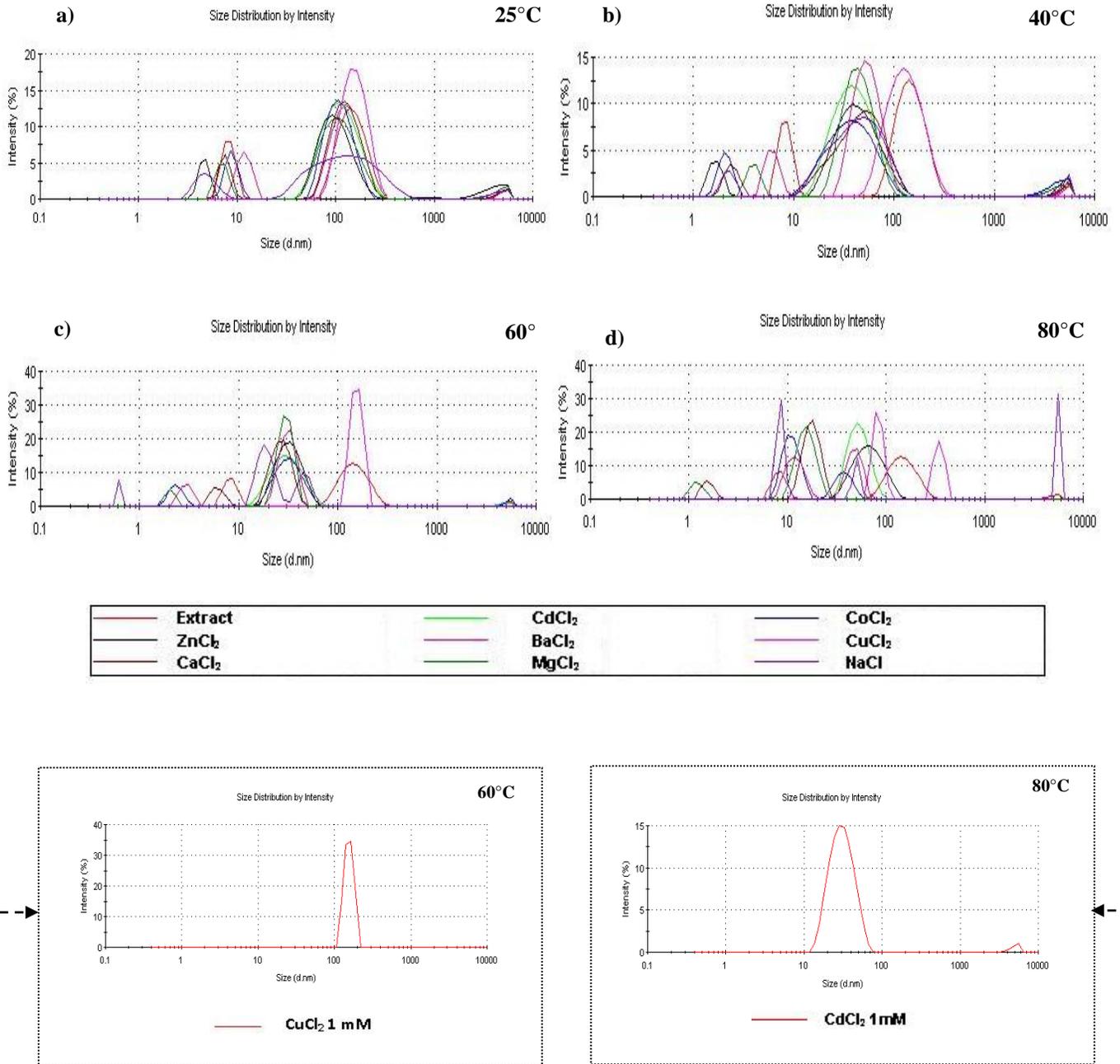


Figura 14. Efecto de la temperatura sobre el tamaño de distribución de las interacciones en el extracto enzimático E2 con los cationes Ba²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Cd²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ y Na¹⁺ a 1 mM a) 25 °C, b) 40 °C, c) 60 °C + (inserto CuCl₂ 1 mM), d) 80 °C + (inserto CdCl₂ 1 mM).

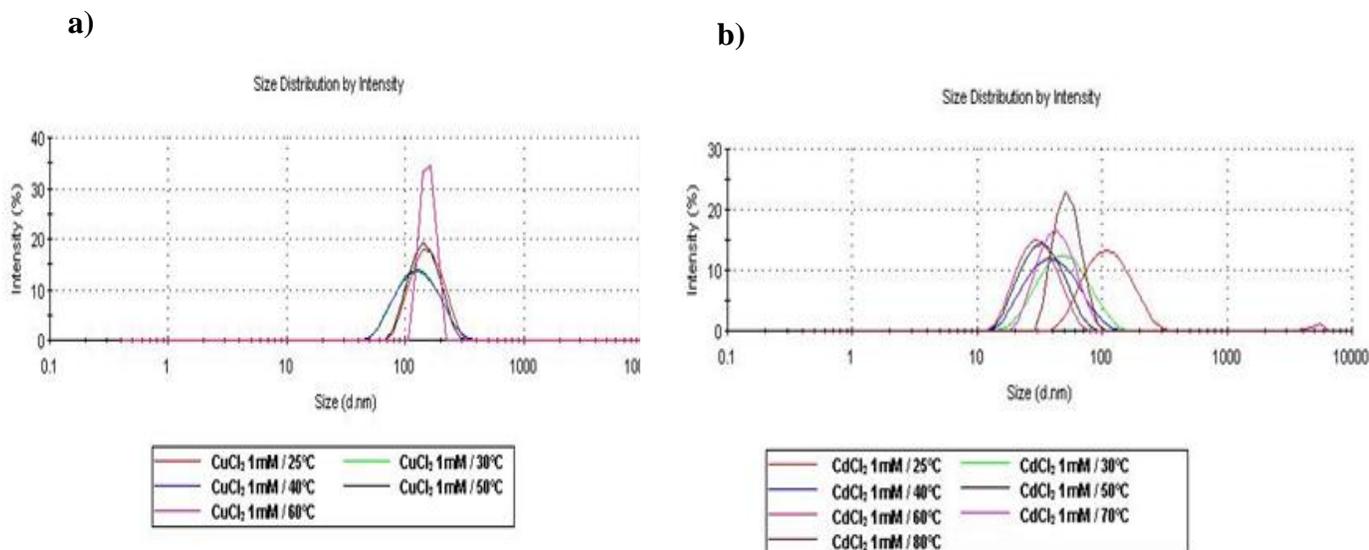


Figura 15. Efecto de la temperatura sobre el tamaño de distribución de las interacciones en el extracto enzimático E2 con a) Cu²⁺ a 25-60 °C b) Cd²⁺ a 25-80 °C.

Como se observa en la Figura 16a, los diferentes cationes probados, comparados con la proteínas nativas, forman agregados de mayor tamaño molecular a 25 °C, mientras que a 30 °C sólo CaCl₂, ZnCl₂ y BaCl₂ formaron agregados de mayor tamaño que las proteínas nativas. En contraste, con incremento de temperatura, se formaron polímeros de gran tamaño con la proteína en ausencia de cationes, mostrando que éstos protegen la enzima contra la desnaturalización térmica.

Con respecto a la fuerza iónica, a temperaturas superiores de 70 °C, ésta favorece la desnaturalización de la proteína. Con el aumento de la concentración de cationes a 1 mM (Figura 16b), CuCl₂ mantuvo las proteínas en agregados de mayor tamaño desde 25 °C hasta 60 °C, comparado con la proteína nativa. Por arriba de 70 °C, se formaron polimeros de alrededor de 264 nm, pero de menor tamaño que la proteína en ausencia de cationes (353 nm). La fuerza iónica no tuvo efecto sobre el proceso de agregación hasta 70 °C, después de la cual, se favoreció la desnaturalización de las proteínas.

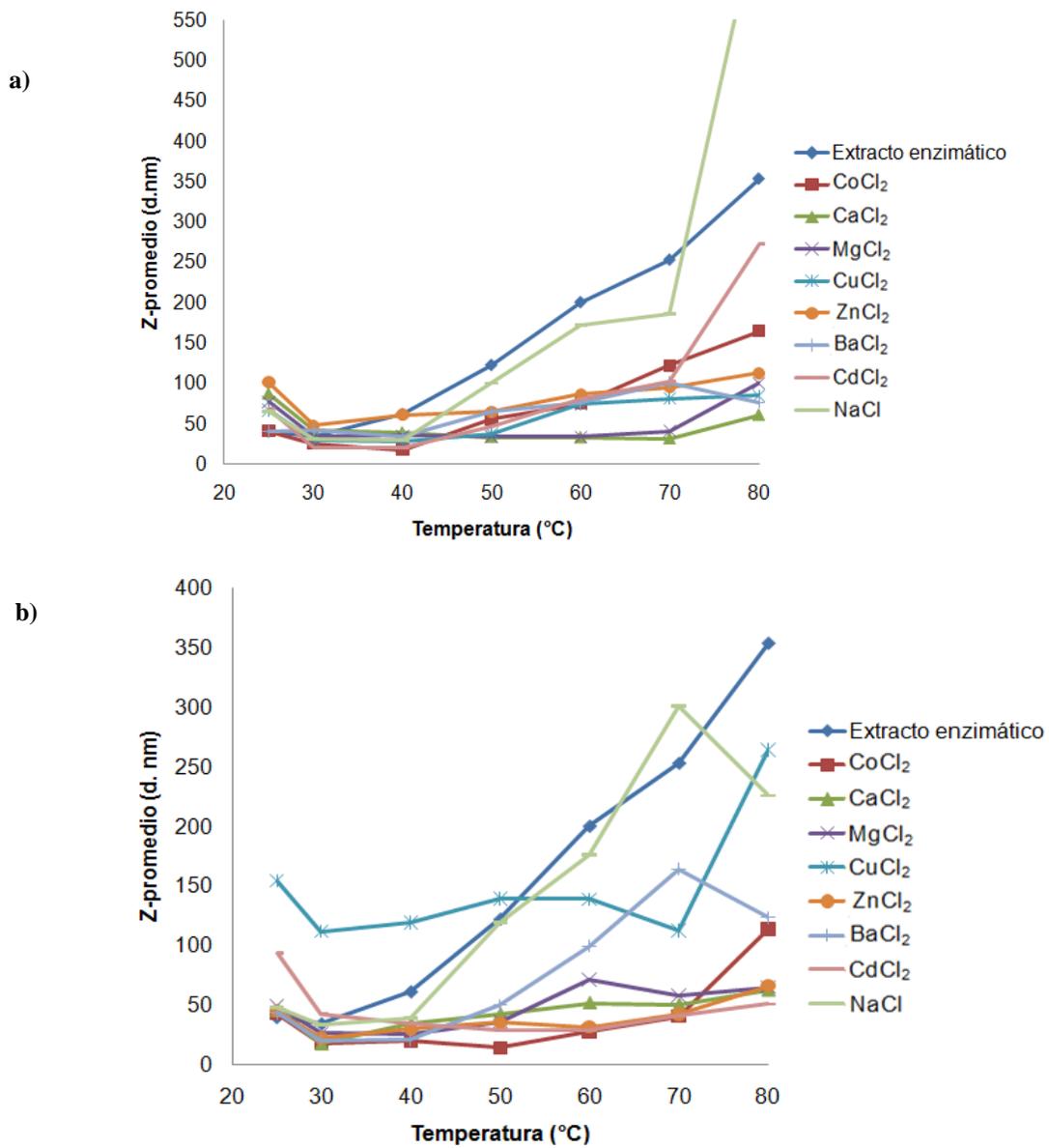


Figura 16. Efecto de cationes divalentes y sodio en la desnaturalización térmica de Xaa-Pro-DAP en el extracto enzimático E2 a) cationes a 0.1 mM y b) cationes a 1mM.

7.3.6. Efecto de la temperatura y cationes sobre la actividad enzimática en el extracto enzimático E2

A 25 °C, se detectaron 1.6 UAE de Xaa-Pro-DAP, la cual se incrementó, iniciando a 50 °C con 2.9 UAE y continuó en ascenso hasta 19.7 UAE a 80 °C, indicando activación por temperatura (Figura 17a). En presencia de CoCl_2 a 0.1 mM, la actividad presentó el mismo comportamiento y, al aumentar la concentración a 1 mM, se alcanzó una actividad máxima de 25.7 UAE a 70 °C, disminuyendo a 19.74 UAE al final del ensayo (80 °C) (Figura 17b); sin embargo la adición de CdCl_2 a 1.0 mM logra una mayor estabilidad térmica de la enzima Xaa-Pro-DAP a 80 °C, obteniendo 28 UAE (Figura 17c). A 0.1 mM, el efecto de CdCl_2 es muy similar. De acuerdo a lo anterior, enzimas de tipo Xaa-Pro-DAP pueden ser atribuidas como el único grupo proteico detectado en DLS en presencia de CdCl_2 , correspondiente a 34,87 nm a 50 °C hasta los 80 °C con 53,48 nm (Figura 15b).

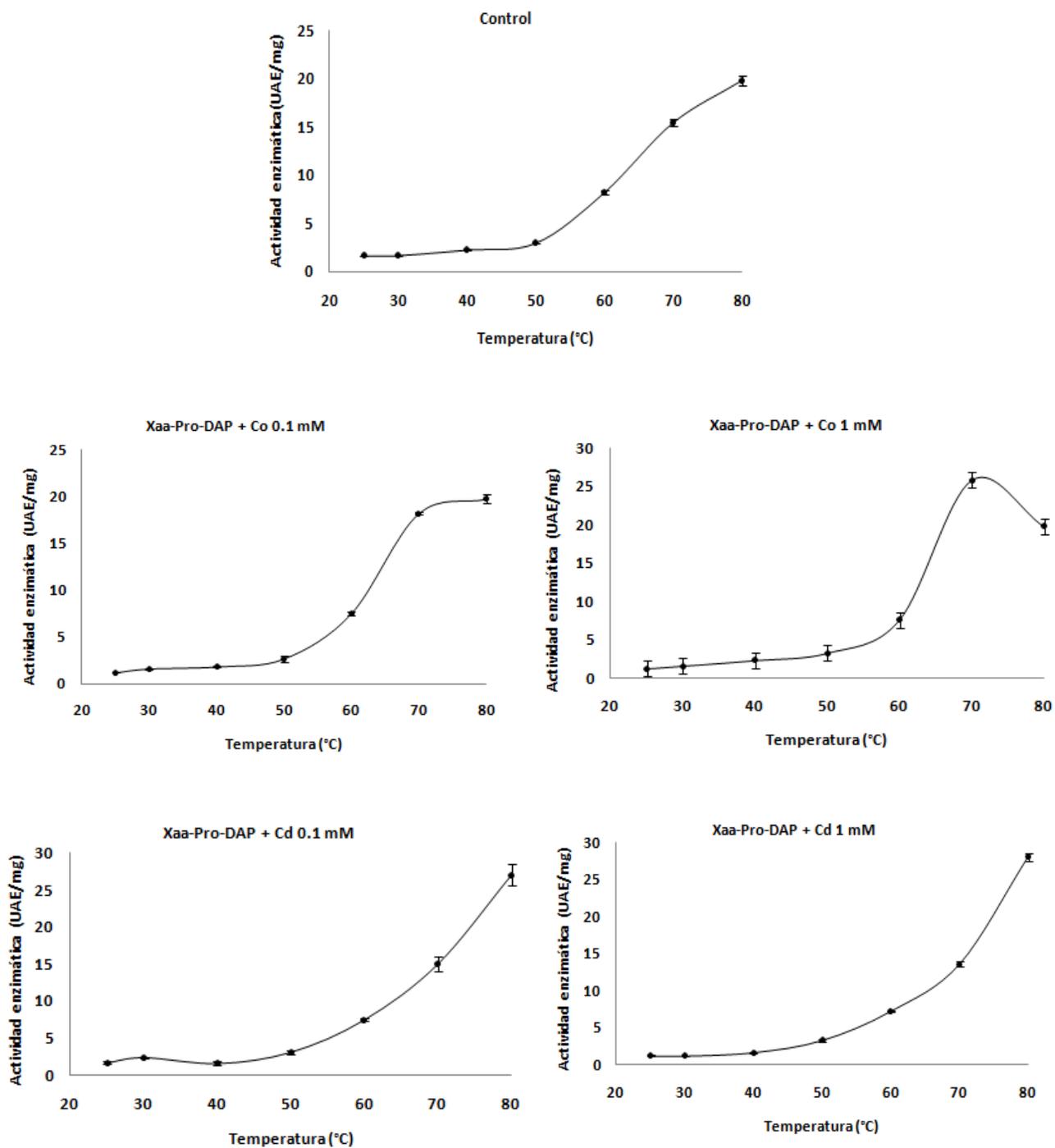


Figura 17. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de Xaa-Prolil dipeptidil aminopeptidasa (Xaa-Pro-DAP) y sus interacciones con CoCl_2 y CdCl_2 a concentraciones de 0.1 mM y 1 mM.

La actividad APE tuvo un comportamiento debido a la desnaturalización térmica, iniciando a 40 °C con 0.7 UAE y finalmente 0.5 UAE a 80 °C (Figura 18a). Los niveles detectados de actividad APE fueron bajos comparados con la actividad Xaa-Pro-DAP detectada en el extracto enzimático. Sin embargo, en presencia de CoCl_2 a 1 mM, la actividad APE se estabilizó, detectándose 1.0 UAE a 60 °C y 1.2 UAE a 80 °C (Figura 18b). Se han reportado incrementos de 1.7 a 50 veces de la actividad original de enzimas carboxipeptidasas (Kishimura y col., 2006; Cheng y col., 1999) y aminopeptidasas (Dong y col., 2005; Bolumar y col., 2003) cobalto-activadas, usando 4 μM a 1 mM de CoCl_2 . No obstante, también han sido detectada la inhibición de APE por Co^{2+} a 10 mM (Mercado-Flores y col., 2004; Mohamed y col., 2009). El efecto del CdCl_2 sobre la actividad APE no fue significativa, aunque la menor actividad enzimática fue detectada a 60 °C (0.483 UAE), un valor menor del obtenido en ausencia del catión (Figura 18c).

Finalmente, la actividad de tipo carboxipeptidasa presentó un comportamiento aleatorio, identificando 0.6 UAE a 40 °C hasta 0.4 UAE a 80 °C (Figura 19a). La presencia de CoCl_2 a 0.1 mM y 1 mM no ejerció un efecto evidente sobre la actividad CP (Figura 19b) mientras que la adición de CdCl_2 a ambas concentraciones logró recuperar ligeramente la actividad CP de 0.34-0.30 UAE a 60 °C hasta 0.64-0.63 UAE al final de la prueba (Figura 19c).

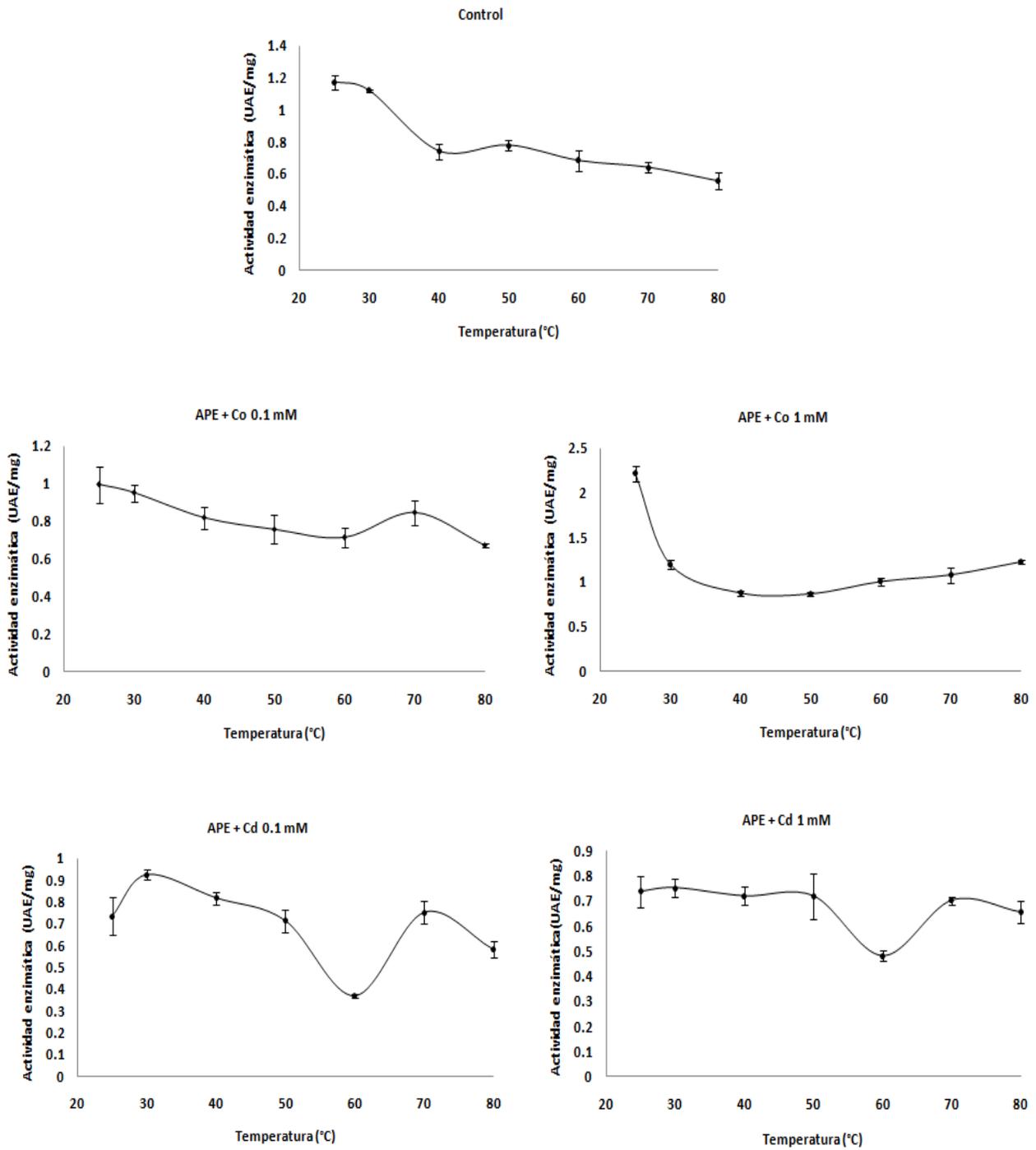


Figura 18. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de aminopeptidasa (APE) y sus interacciones con CoCl_2 y CdCl_2 a concentraciones de 0.1 mM y 1 mM.

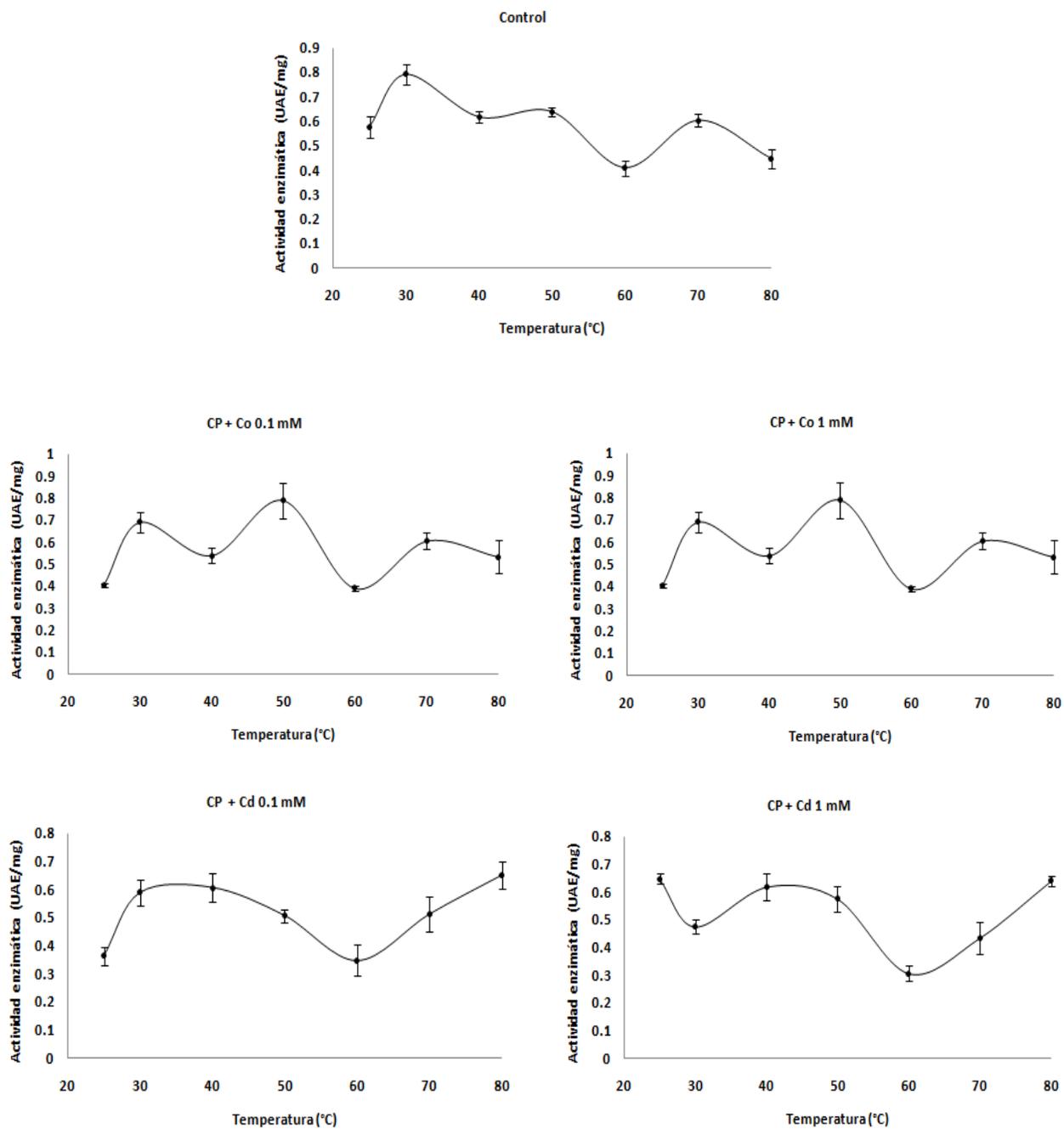


Figura 19. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de carboxipeptidasa (CP) y sus interacciones con CoCl_2 y CdCl_2 a concentraciones de 0.1 mM y 1.0 mM.

7.4 Purificación de la cisteín peptidasa (tcCys)

La proteólisis enzimática detectada con un peso molecular relativo de 101 kDa en el extracto al 30 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se aprecia en la Figura 20.

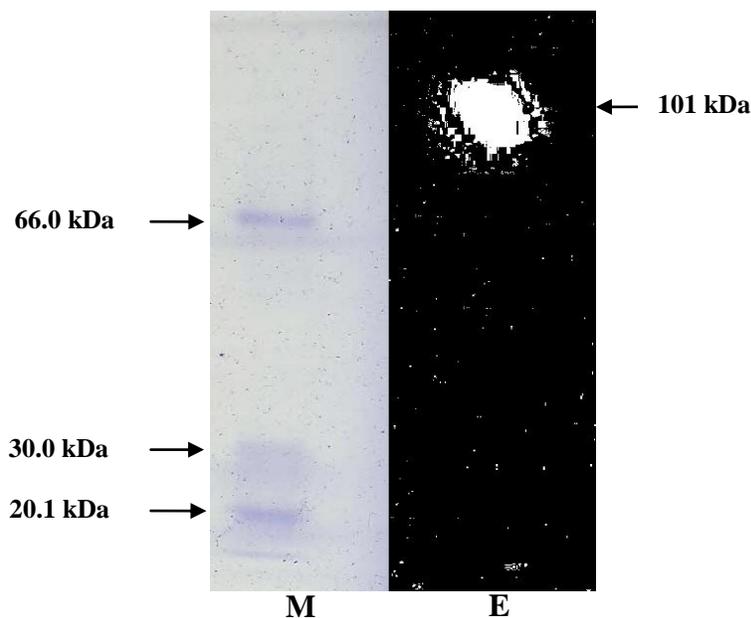


Figura 20. Zimograma del extracto enzimático de *T. cacao*. M: Marcador de proteínas; E: extracto enzimático al 30 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, indicando la proteólisis sobre la caseína como sustrato.

La Figura 21 muestra el perfil de elución de la cromatografía de intercambio aniónico, con tres picos (DEAE1, DEAE2 y DEAE3) con actividad de tipo Xaa-prolil-dipeptidil aminopeptidasa (Xaa-Pro-DAP), cuyas fracciones también fueron probadas para actividad de cisteín peptidasas, encontrando actividad en DEAE2. El pico DEAE1 (fracciones 20-28) eluyeron con 0.45 M NaCl. Los picos DEAE2 (fracciones 40-44) y DEAE 3 (fracciones 49-51) fueron retenidos fuertemente en la columna, eluyendo a 0.5 M NaCl. De acuerdo a la electroforesis de la Figura 22, sólo se detectan los picos DEAE1 y DEAE2 con un perfil de bandas muy similares entre sí; en el pico DEAE1 no fue posible observar fracciones proteicas, a pesar de presentar el mayor contenido de proteínas y de actividad Xaa-Pro-DAP. Lo anterior posiblemente se deba a un alto contenido de actividad proteolítica y degrade las enzimas presentes, como ha sido reportado por (Esparza, 2008) en otro estudio.

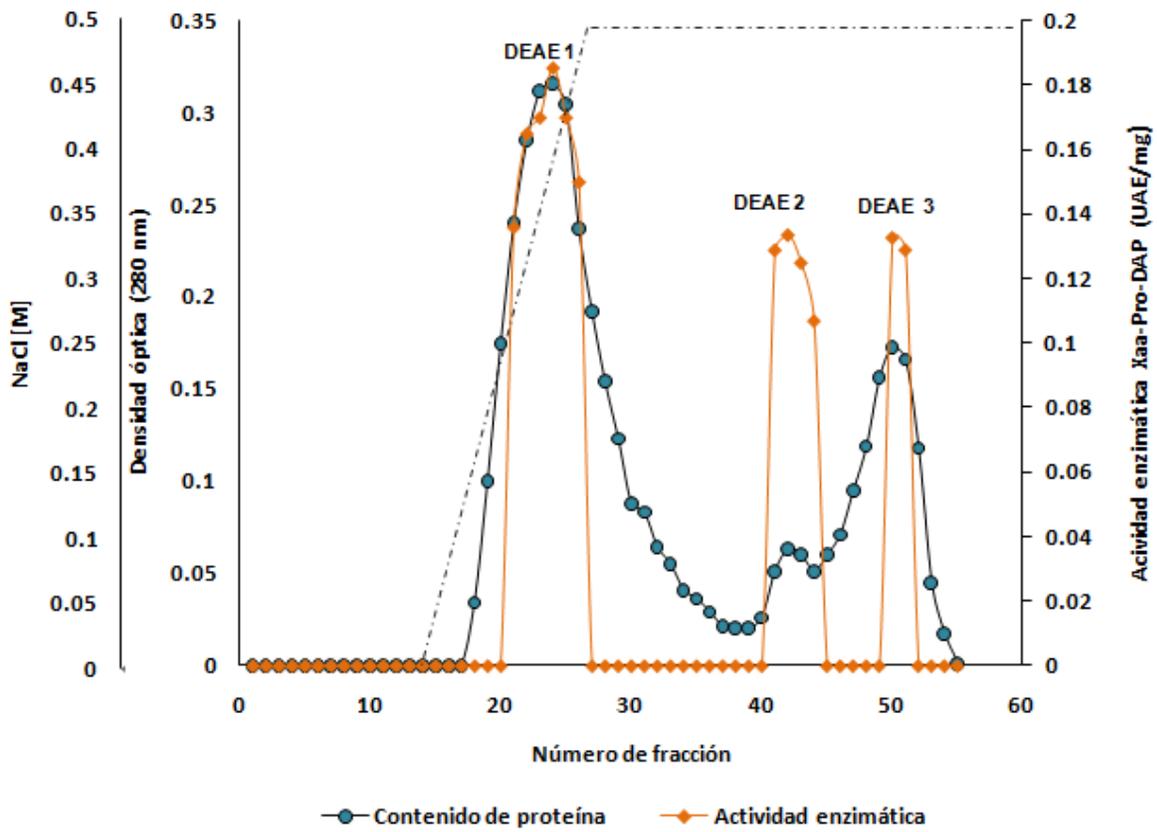


Figura 21. Cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sepharosa.

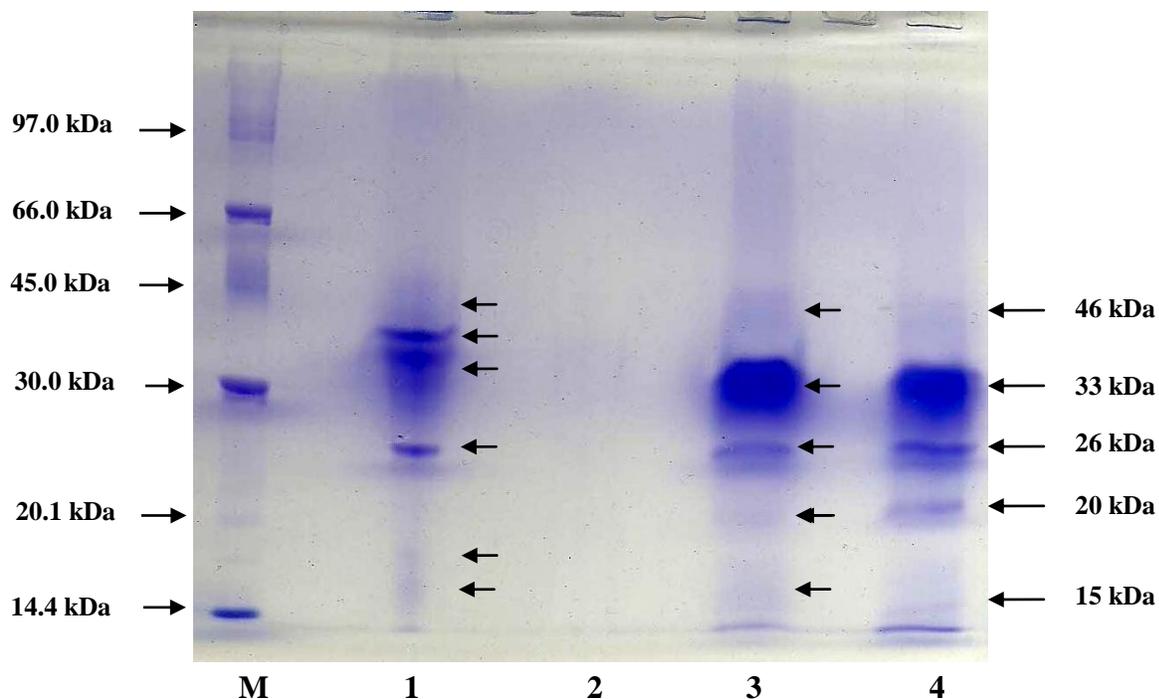


Figura 22. Análisis SDS-PAGE de las fracciones provenientes de la cromatografía de intercambio aniónico DEAE-Sepharosa. Donde M: Marcador de bajo peso molecular; 1: Extracto al 30% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2: DEAE1 (fracciones 20-28); 3: DEAE2 (fracciones 40-44) y 4: DEAE3 (fracciones 49-51).

El pico DEAE 2 fue inyectado en la columna Macro-Prep® High-S Support de intercambio catiónico, la cual eluyó dos picos (Figura 23), el pico HS1 (fracciones 20-22) con 0.4 M NaCl y el pico HS2 (fracciones 36-39) con 0.5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. En la Figura 24 se muestra el perfil electroforético de las fracciones provenientes del último paso cromatográfico.

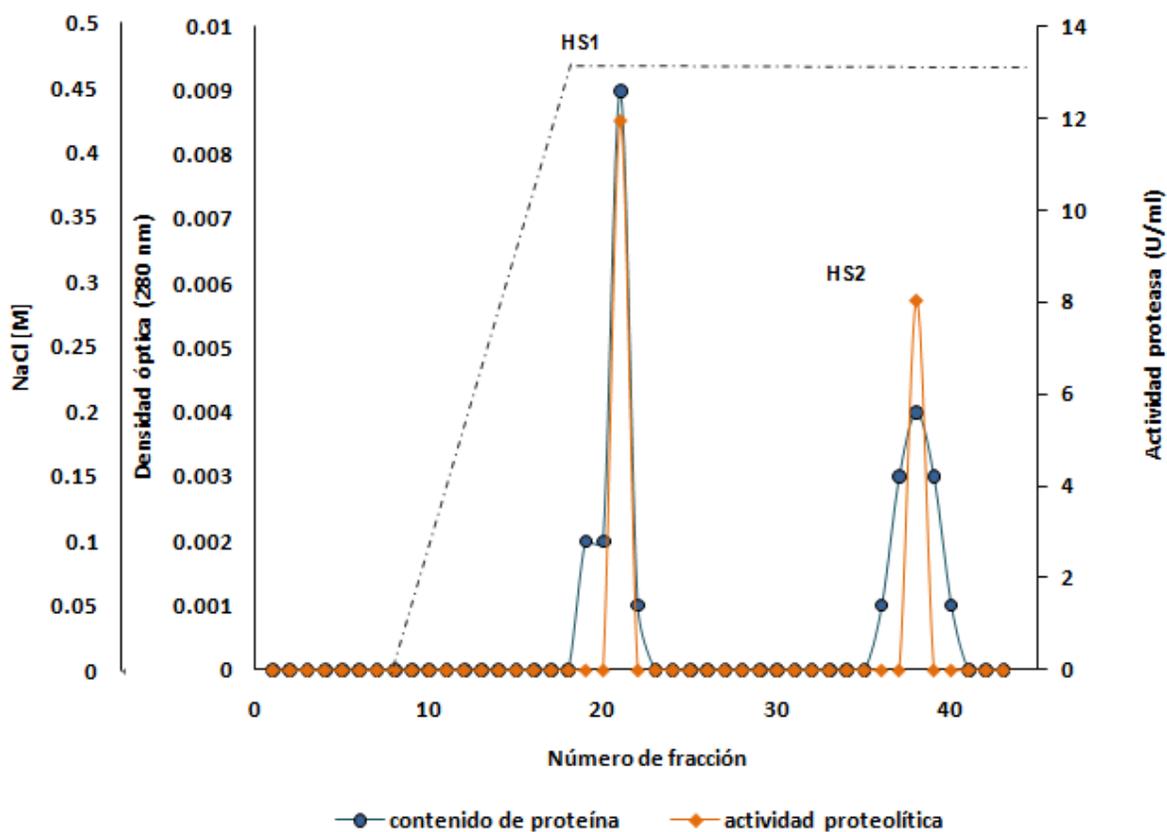


Figura 23. Fraccionamiento de tcCys en cromatografía de intercambio catiónico en columna High S.

De las fracciones obtenidas en el proceso de purificación, la banda con peso molecular relativo de 25 kDa, se le atribuye la característica de cisteín peptidasa y es la mayoritaria en todos los casos aunque no se ha logrado la homogeneidad de la preparación final ya que aún están presentes otras bandas. Este valor (25 kDa) es muy similar al obtenido en otras fuentes ya que los pesos moleculares relativos Mrs de las cisteín peptidasas de plantas estudiadas están generalmente en el rango de 23-30 kDa, tales como la cisteín peptidasa de cebada (29-37 kDa) (Pouille y Jones, 1988; Koehler y Ho, 1988, 1990a; Zhang y Jones, 1996), maíz (12-36 kDa) (De Barros y Larkins, 1990), horse gram (30.2 kDa) (Rajeswari y col., 2009) y frutos de *Pseudananas macrodontes* (25 y 27 kDa) (López y col., 2000). Sin embargo, también se han reportado de mayor tamaño como la cisteín peptidasa de trigo (60 kDa) (Afaf y col., 2004).

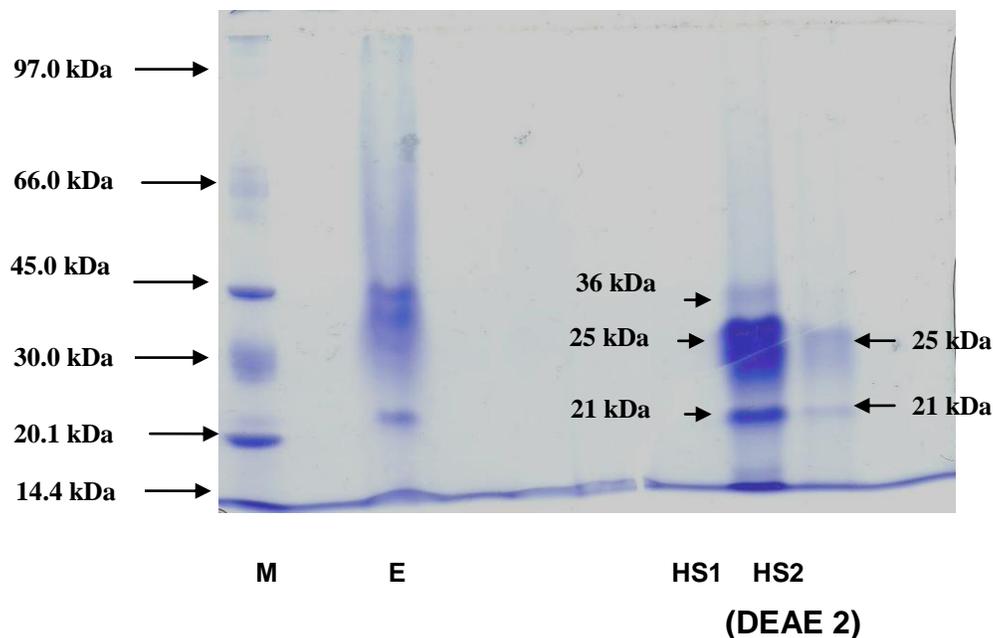


Figura 24. Análisis SDS-PAGE de las fracciones provenientes de la cromatografía de intercambio catiónico High S. Donde M: Marcador de bajo peso molecular, E: Extracto al 30% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, HS1: Pico 1 (fracciones 20-22) y HS2: Pico 2 (fracciones 36-39).

7.5 Caracterización de la cisteín peptidasa (tcCys)

7.5.1 Efecto del pH y temperatura sobre la actividad tcCys

La cisteín peptidasa tuvo un pH óptimo de 5.0 (Figura 25). Este valor es similar a el pH óptimo de otras cisteín peptidasas (Rajeswari y col., 2009). Lo anterior sugiere que ésta actúa en un compartimiento celular ácido tal como la vacuola como ha sido reportado por otros autores (Afaf y col., 2004; Watanabe y col., 2009). Sin embargo, a pH 9.0 se observó un ligero incremento de actividad proteolítica, esto puede estar relacionado con la presencia de posibles cisteín peptidasas alcalinas, y al parecer se encuentren localizadas en el citosol, como se ha reportado en cebada (Watanabe y col., 2009), frutos de *Pseudananas macrodentes* (López y col., 2000) y látex de *Ervatamia coronaria* (Nallamsetty y

col.,2003) con pH óptimo desde neutro a pH 8 y 8.5; al contrario de otras cisteín peptidasas conocidas, las cuales exhiben pH ácidos óptimos mostrando la mayor actividad con valores de 4-5 (Afaf y col., 2004, Rajeswari y col., 2009).

Existen reportes sobre las discrepancias en los pH óptimos de cisteín peptidasas dependiendo del sustrato ensayado, ya que un sustrato dado tendrá numerosos grupos ionizables con valores de pKa similares. El pH óptimo obtenido con un sustrato proteico refleja más sobre el pH-susceptibilidad intermedia del sustrato a la proteólisis que sobre la influencia del pH sobre la peptidasa como catalizador (Rajeswari y col., 2009; Koehler y Ho, 1990; Bolón y Sussex, 1987; Belozersky y col., 1989).

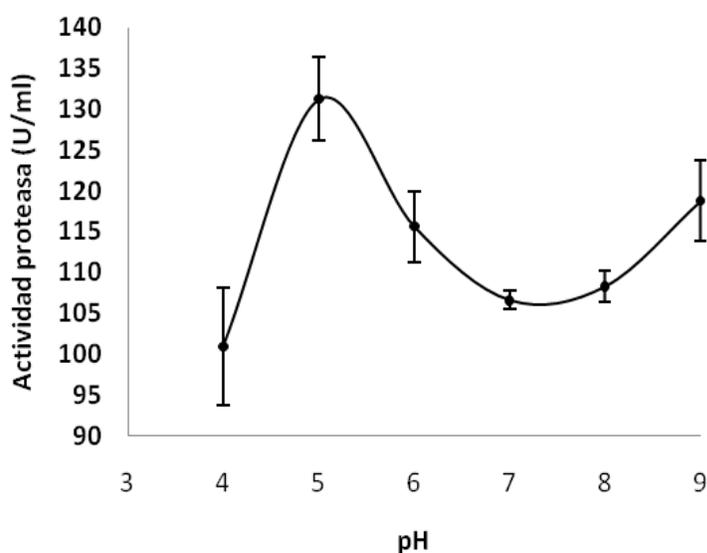


Figura 25. Determinación de pH óptimo de tcCys. La azocaseína es el sustrato usado para el ensayo enzimático.

La enzima tcCys mostró una temperatura óptima a 50 °C (Figura 26). Este resultado coincide con la temperatura óptima reportada en cisteín peptidasas de trigo (Afaf y col., 2004, Asano y col., 1999), en Ervatamina A y B de látex de *Ervatamia coronaria* se identificó una temperatura óptima de alrededor de 50-55 °C (Nallamsetty y col., 2003; Kundu y col., 2000). También han sido detectadas

muy frecuentemente temperaturas óptimas de 40-45 °C en cisteín peptidasas de diversas fuentes (Koehler y Ho, 1988, 1990a).

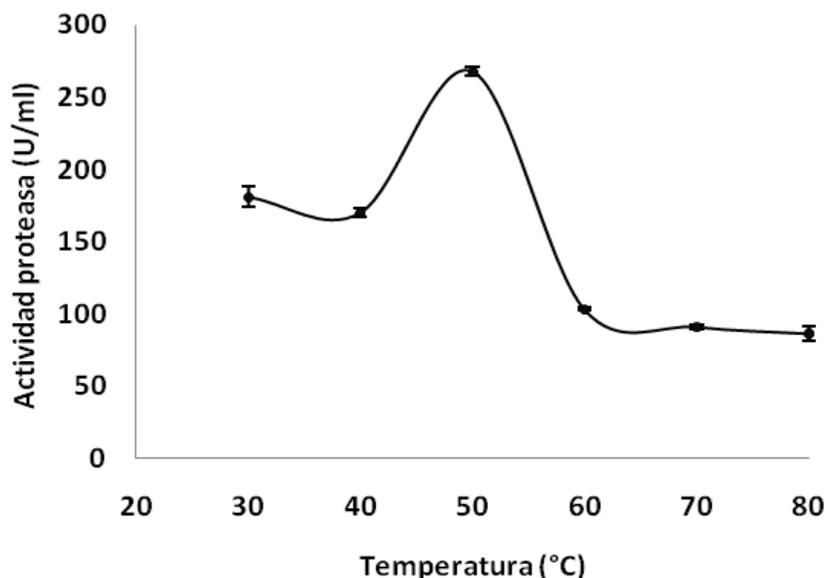


Figura 26. Perfil de actividad-temperatura de tcCys. La azocaseína es el sustrato usado para el ensayo enzimático. Los ensayos fueron realizados en regulador de acetato de sodio 100 mM (pH.4.5).

7.5.2 Efecto de la temperatura en la estabilidad de tcCys

El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la peptidasa tcCys es mostrada en la Figura 27. La enzima tcCys fue estable a 60 °C con una actividad proteolítica de 267.5 U, la cual disminuye a 70 y 80 °C. Estos resultados son similares a los reportados en una cisteín peptidasa en hojas de cebada, la cual disminuyó su actividad en un 50 % a la temperatura de 55 °C (Watanabe y col., 2009), en trigo a 50 °C pierde el 45 % de actividad (Afaf y col., 2004). Por otra parte, se observa que finalizar el ensayo a 80 °C la actividad proteolítica no se pierde totalmente como ocurre con otras cisteín peptidasas estudiadas (Afaf y col., 2004; Rajeswari y col., 2009), sugiriendo que la enzima tcCys podría continuar activa a una mayor temperatura. En este sentido, en cacao se han reportado enzimas termoestables durante el proceso de fermentación, tales como la endoproteinasa aspártica la cual presentó la mayor actividad enzimática a

temperaturas de 48 °C (72 h) conservando un 50 % su actividad, no se inactivó con el secado solar ni artificial, lo cual indicó una gran estabilidad durante todo el proceso de fermentación y la carboxipeptidasa con mayor actividad a 45 °C (96 h) conservando entre el 50 y 15 % de su actividad (Hansen y col., 1998; Amin y col., 1998).

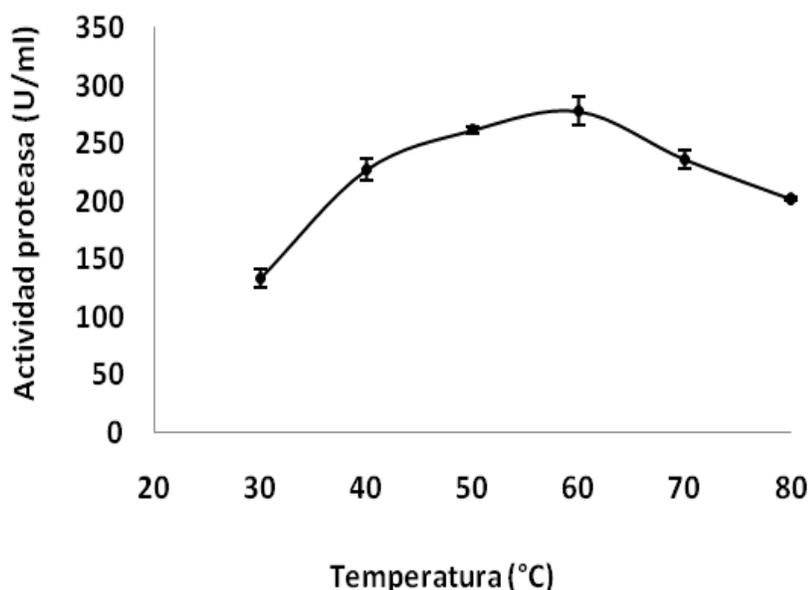


Figura 27. Estabilidad térmica de tcCys. La azocaseína es el sustrato usado para el ensayo enzimático en regulador de acetato de sodio 100 mM (pH.4.5).

7.5.3 Efecto de inhibidores y agentes sulfhidrilos

El efecto de diferentes inhibidores y agentes reductores sobre la tcCys peptidasa de *T. cacao* fue examinada en el perfil electroforético representado en los densitogramas en la Figura 28. La actividad de la enzima fue estimulada por los agentes reductores Glutathion, β ME y DTT. Así los agentes reductores glutathion, β ME y DTT a concentración de 10 mM presentaron un incremento del área de 211 %, 176 % y 150 % con respecto al área de la banda (679.14 = 100 %) con un peso

molecular relativo de 25 kDa en ausencia de dichos agentes. El incremento en la intensidad de la banda proteica con la adición de los agentes sulfhidrilos, establecen la naturaleza tiol de la enzima. Se ha reportado en cisteín peptidasas de soya un efecto favorable en presencia de agentes sulfhidrilos, tales como el β ME (Asano y col., 1999).

Con respecto a los inhibidores específicos de cada clase de peptidasas (metalo, serin y cisteín) con la finalidad de investigar el residuo de aminoácido (s) que contribuyen al sitio activo de la enzima. Así sólo el PCMB, considerado un inhibidor específico para cisteín peptidasas, a concentración de 1 mM redujo un 76.45 % el área de la banda identificada en el densitograma (Fig. 28). Esto es probablemente debido a los efectos del PCMB sobre los grupos-SH los cuales son importantes para el correcto plegamiento de enzimas sulfhidríticas. Lo anterior indica que esta peptidasa es un miembro de las cisteín peptidasas. Los otros inhibidores específicos de enzimas tipo serin y cisteín (PMSF y leupeptina) y de carácter metálico (EDTA) no presentaron efecto inhibitorio sobre la enzima. No obstante, el efecto inhibitorio podría ser más evidente al incrementar el tiempo de contacto de la enzima con los diferentes químicos, logrando un mayor tiempo de acción ~5h como se ha experimentado en otros reportes (Renier y col., 2004).

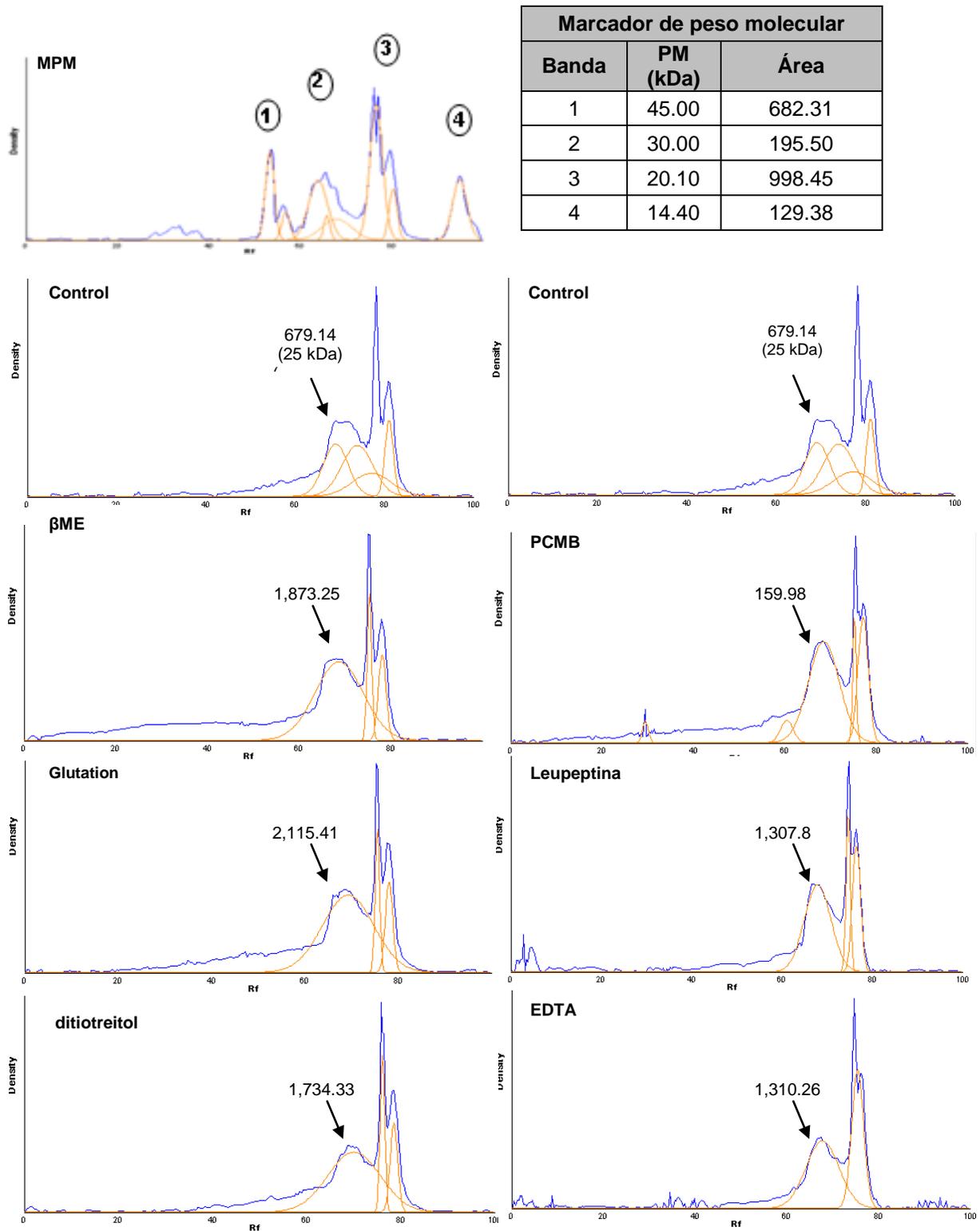


Figura 28. Densitogramas provenientes de SDS-PAGE de la fracción HS1 en ausencia de agentes químicos (control) y en presencia de inhibidores (1 mM) y agentes reductores (10 mM).

8. CONCLUSIONES

I. Generales:

1. El mayor nivel de actividad de Xaa-Pro-DAP se detectó el día 10 del proceso de germinación.
2. En el día 10 de germinación, se detectaron también los valores máximos de contenido de humedad y actividad de agua, lo que indica diferentes niveles de interacción agua-proteína durante todo el proceso germinativo.
3. El sistema proteolítico en los extractos de *T. cacao* germinado ha sido parcialmente purificado, identificando enzimas asociadas a membrana de tipo aminopeptidasa (APE), carboxipeptidasa (CP), cisteín peptidasa (tcCys) y Xaa-Prolil dipeptidil aminopeptidasa (Xaa-Pro-DAP).
4. La actividad de Xaa-Pro-DAP detectada en los extractos (E1 y E2) fue activa sólo en estado nativo, con un peso molecular relativo de 80 kDa y 60 kDa respectivamente.

II. Caracterización del extracto E1 y la enzima Xaa-Pro-DAP:

5. La actividad Xaa-Pro-DAP en el extracto (E1) fue sensible a concentraciones de 0.1 mM por PMSF, PCMB y pepstatina A, los cuales inhibieron la actividad un 54, 40 y 39 % respectivamente.
6. Todos los cationes, excepto Co^{2+} , Ca^{2+} y Mg^{2+} disminuyeron la actividad enzimática.
7. En el extracto enzimático E1 se identificó la presencia de una cisteín metalopeptidasa debido a su activación por agentes reductores.
8. La enzima Xaa-Pro-DAP parcialmente purificada mostró una alta especificidad por el sustrato Ala-Pro-pNA pero aún están presentes actividades aminopeptidasa y carboxipeptidasa. La Xaa-Pro-DAP parcialmente purificada es una serin metalopeptidasa.

III. Caracterización del extracto E2:

9. La enzima Xaa-Pro-DAP en el extracto (E2) fue inhibida por iones divalentes tales como Cu^{2+} (0.1 mM) y Ca^{2+} y Mg^{2+} (1mM), en ausencia de iones divalentes se incrementó la actividad por efecto de temperatura con valores de 2.9 UAE 50 °C y 19.7 UAE a 80 °C.
10. La adición de iones de Cd^{2+} favorece la estabilidad enzimática (E2) y de acuerdo al análisis DLS, solo se detecta un solo grupo proteico de 53,48 nm a 80 °C atribuido a enzimas de tipo Xaa-Pro-DAP, indicando termoestabilidad.
11. La actividad APE fue estabilizada por iones Co^{2+} mientras que sobre la actividad CP, Co^{2+} no tuvo efecto significativo. A pesar de que los niveles de actividad APE y CP fueron menores a los detectados por Xaa-Pro-DAP, las tres enzimas lograron mantener actividad residual después de los 80 °C indicando una baja desnaturalización térmica.

IV. Caracterización de la cisteín peptidasa (tcCys):

12. La tcCys fue estable a 60 °C y con un pH ácido óptimo de 5.0 pero con buena actividad a pH 9.0; fue sensible a PCMB. Estas propiedades fueron similares a aquellas cisteín peptidasas empleadas en la industria de alimentos.
13. Los resultados de este trabajo contribuyen al estudio de enzimas Xaa-Pro-DAP, APE, CP y tcCys importantes por su participación en la degradación de proteínas de reserva durante la germinación de cacao, y dada la escasa información sobre este tipo de enzimas de origen vegetal, muestra la relevancia de este estudio.

9. PERSPECTIVAS

1. Realizar estudios sobre las transiciones de fase de la semilla en función de la Aw.
2. Obtener hasta homogeneidad molecular la Xaa-Pro-DAP tipo sulfhidril peptidasa identificada en los extractos enzimáticos.
3. Realizar estudios de calorimetría diferencial de barrido para complementar los estudios de agregación de peptidasas y comprobar la estabilidad de la Xaa-Pro-DAP en presencia de los iones de Cd^{2+} y Co^{2+} .
4. Estudiar y caracterizar las peptidasas APE y CP también identificadas en el presente trabajo para lograr un mayor entendimiento del sistema proteolítico del cacao durante el proceso de germinación.
5. Obtener hasta homogeneidad molecular la enzima Xaa-Pro-DAP para realizar la secuenciación del extremo amino-terminal con la finalidad de obtener más información con respecto a la posible función y su participación durante el proceso de germinación.
6. Realizar estudios de biología molecular, para la identificación del gen (es) codificantes para Xaa-Pro-DAP y buscar posibles aplicaciones biotecnológicas.

10. BIBLIOGRAFIA

- [1] AOAC Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed., 2005. Method No. 978.18.
- [2] Adhikari, S., Manthena, P., Uren, A, Roy, R. 2008. Expression, purification and characterization of codon-optimized human N-methylpurine-DNA glycosylase from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 58:257-262.
- [3] Adhikari, S., Kennel, S., Roy, G., Mitra, P., Mitra, S., Roy, R. 2008. Discrimination of lesion removal of N-methylpurine-DNA glycosylase revealed by a potent neutralizing monoclonal antibody. *DNA Repair* 7:31-39.
- [4] Afaf, S., Ahmed A., Saleh, A. 2004. Characterization of a cysteine peptidase from wheat *Triticum aestivum* (cv. Giza 164). *Bioresource Technology* 91:297-304.
- [5] Asano, M., Suzuki, S., Kawai, M., Miwa, T., Shibai, H. 1999. Characterization of novel cysteine peptidases from germinating cotyledons of soybean [(*Glycine max* L.) merrill]. *Journal Biochemistry* 126:296-301.
- [6] Amin, I., Jinap, S., Jamilah, B. 1998. Proteolytic activity (Aspartic endoproteinase and carboxypeptidase) of cocoa bean during fermentation. *Journal Science Food Agric* 76:123-128.
- [7] Barahona, J. 1987. Manual del cultivo de cacao. INIAP. Quevedo, Ecuador. p 109.
- [8] Belozersky, M., Sarbakanova, S., Dunaevsky, Y. 1989. Aspartic proteinase from wheat seeds: isolation, properties and action on gliadins. *Planta* 177:321-326.

- [9] Benoist, P., Schwencke, J. 1990. Native Agarose-Polyacrylamine Gel Electrophoresis Allowing the Detection of Aminopeptidase, Dehydrogenase, and Esterase Activities at the Nanogram Level: Enzymatic patterns in some *Frankia* Strains. *Analytical Biochemistry* 187:337-344.
- [10] Besanova, M., Kovacs, P., Psenak, M., Barth, A. 1987. Dipeptidyl peptidase of poppy seedlings. *Biologia* 42:779-787.
- [11] Bewley, J. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9:1055-1066.
- [12] Bhikhabhai, R., Sjoberg, A., Hedkvist, L., Gallin, M., Liljedahl, P., Frigard, T., Pettersson, N., Nilsson, M., Sigrell-Simon, J., Markeland-Johansson. 2005. Production of milligram quantities of affinity-tagged proteins using automated multistep chromatographic purification. *Journal Chromatography* 1080:83-92.
- [13] Biede, S., Hammond, E. 1979. Swiss cheese flavor. Chemical analysis. *Journal of Dairy Science* 62: 227-237.
- [14] Biehl, B., Heinrichs, H., Ziegeler-Berghausen, H., Srivastava, S., Xiong, Q., Passern, D., Senyuk, V., Hammor, M. 1993. The proteases of ungerminated cocoa seeds and their role in the fermentation process. *Angewandte Botanik* 67:59-65.
- [15] Biehl, B., Wewetzer, C., Passern, D. 1982b. Vacuolar (storage) proteins of cocoa seeds and their degradation during germination and fermentation. *Journal Science Food Agriculture* 33:1291-1304.
- [16] Biehl, B., Ziegeler-Berghausen, H., Srivastava, S., Xiong, Q., Passern, D., Heinrichs, H. 1991. Cocoa specificity of proteolytic flavor precursors: the cocoa seed proteases. *Proceedings of the 1991 International Cocoa Conference: Challenges in the 90s, Kuala Lumpur, Malaysia.*

- [17] Biehl, B., Voigt, J. 1994. Biochemical approach to raw cocoa quality improvement: Comparison of seed proteins and proteases in their ability to produce cocoa aroma precursors. Paper presented at the Malaysian International Cocoa Conference, 20-21. October 1994, Kuala Lumpur, Malaysia.
- [18] Biehl, B., Voigt, J. 1996. Biochemistry of chocolate flavor precursors. International Cocoa Conference, Salvador, November, 17-23. Bahía, Brasil.
- [19] Bonetta, L. 2006. Protein purification: fast forward. *Nature*. 1017-1021.
- [20] Bordallo, C., Schwencke, J., Rendueles, M. 1984. Localization of the thermosensitive X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase in the vacuolar membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*173:199-203.
- [21] Bolaños-García, V., Davies, O. 2006. Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilized metal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta* 1760:1304-1313.
- [22] Bolumar, T., Sanz, Y., Aristoy, M., Toldra, F. 2003. Purification and properties of an arginyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. *International Journal Food Microbiology* 86:141-151.
- [23] Boylon M., Sussex, I. 1987. Purification of an endopeptidase involved with storage protein degradation in *Phaseolous vulgaris* L. cotyledons. *Planta* 170:343-352.
- [24] Breddam, K., Sorensen, S. 1987. Isolation of carboxypeptidase II from malted barley by affinity chromatography. *Carlsberg Research Communications* 52:275-283.

- [25] Booth, M., Donnelly, W., Fhaolain, I., Jennings, P., Cuinn, O. 1990a. Proline specific enzymes of *Streptococcus cremoris* AM2. Journal of Dairy Research 57: 79-88.
- [26] Bucheli, P., Laloi, M., Mc Carthy, J. 2004. Patent 7122366 –Cacao endoproteinases and production of cocoa flavor form same. Nestec S.A.
- [27] Bucheli, P., Rousseau, G., Alvarez, M., Laloi, M., McCarthy, J. 2001. Developmental variation of sugars, carboxylic acids, purine alkaloids, fatty acids and endoproteinase activity during maturation of *Theobroma cacao* L. seeds. Journal Agricultural Food Chemistry 49: 5046-5051.
- [28] Byun, T., Kofod, L., Blinkovsky, A. 2001 Synergistic action of an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase and a non-specific aminopeptidase in protein hydrolysis. Journal Agricultural Food Chemistry 49:2061-2063.
- [29] Bytof, G., Biehl, B., Heinrichs, H., Voigt, J. 1995. Specificity and stability of the carboxypeptidase activity in ripe, ungerminated seeds of *Theobroma cacao* L., Food Chemistry 54:15-21.
- [30] Campbell, M., Farrel, S. (2009). Biochemistry. Sixth Edition. Thomson, Brooks/Cole.
- [31] Cheng, T., Ramakrishna, V., Chan, S. 1999. Purification and characterization of cobalt-activated carboxypeptidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Protein Science 8: 2474-2486.
- [32] Chern, M., Shiah, W., Chen, J., Tsai, T., Lin, H., Liu, C. 2009. Single-step protein purification by back flush in ion-exchange chromatography. Analytical Biochemistry 392:174-176.

- [33] Christensen, J., Dudley, E., Pederson, J.A., Steele, J. 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76:217-246.
- [34] Chung, Y., Yang, H. 2008. Partial purification and characterization of a cysteine protease inhibitor from the *Plerocercoid* of *Spirometra erinacei*. *Korean Journal of Parasitology*. Vol. 46, No. 3:183-186. DOI: 10.3347/kjp.2008.46.3.183.
- [35] Copeland, Robert. 2000. *Enzymes a Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*. 2da. ed. Wiley-VCH. p. 181-182.
- [36] Coulombe, R., Meloche, S. 2002. Dual-tag prokaryotic vectors for enhanced expression of full-length recombinant proteins. *Analytical Biochemistry* 310:219-222.
- [37] Cunningham, D.F., O'Connor, B. 1997. Proline specific peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1343:160-186.
- [38] Cruz-Silveira, R., Pelayo-Zapata, C., Ferreira-Marczak., L., Gómez-Aires, A., Cladera-Olivera., F. 2010. Adsorption isotherms of pinhao (*Araucaria angustifolia* seeds) starch and thermodynamic analysis. *Journal of Food Engineering*. 100(3) 468-473.
- [39] Dal Degan, F., Rocher, A., Cameron-Mills, V., Von Wettstein, D. 1994. The expression of serine carboxypeptidases during maturation and germination of the barley grain. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 91:8209-8213.
- [40] Dalal S., Raghava, S., Gupta, M. 2008. Single-step purification of recombinant green fluorescent protein on expanded beds of immobilized

metal affinity chromatography media. *Biochemical Engineering Journal* 42:301-307.

[41] Davy, A., Thomsen, K., Juliano, M., Alves, L., Svendsen, I., Simpson, D. 2000. Purification and Characterization of Barley Dipeptidyl Peptidase IV. *Plant Physiology* 122:425-431.

[42] Davy, A., Svendsen, I. Sorensen, S., Sorensen, M., Rouster, J., Meldal, M., Simpson, D., Cameron-Mills, V. 1998. Substrate specificity of barley cysteine endoproteases EP-A and EP-B. *Plant Physiology* 117:255-261.

[43] De Barros, E.G., Larkins, B.A. 1990. Purification and characterization of zein-degrading peptidases from endosperm of germinating maize seeds. *Plant Physiology* 94: 297-303.

[44] Degraeve, P., Martial-Gros, A. 2003. Purification and partial characterization of X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase of *Lactobacillus helveticus* ITG LH1. *International Dairy Journal* 13:497-507.

[45] DeMarco, V., Ronald, C., Viola, E. 2009. Fully automated protein purification. *Analytical Biochemistry* 393:176-181.

[46] Di Cera, E. 2006. A structural perspective on enzymes activated by monovalent cations. *Journal Biological Chemistry* 281:1305-1308.

[47] Dong, L., Cheng, N., Wang, M., Zhang, J., Chang, S., De-Xu, Z. 2005. The leucyl aminopeptidase from *Helicobacter pylori* is an allosteric enzyme. *Microbiology* 151:2017-2023.

[48] El-Soda, M. 1993. The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening. *FEMS Microbiology Reviews* 12:239-252.

- [49] Engel, M., Hoffmann, T., Wagner, L., Wermann, M., Heiser, U., Kiefersauer, R., Huber, R., Bode, W., Demuth, U., Brandstetter, H. 2003 The crystal structure of dipeptidylpeptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100:5063–5068.
- [50] Enríquez, G. 1983. *El Cultivo del Cacao*. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 162 p.
- [51] Esparza-Coronado, Yussef O. 2008. Optimización de las condiciones de producción de enzimas proteasas por *Aspergillus niger* ATCC 20447 mediante la metodología Taguchi. Tesis. Universidad de la Frontera. Temuco, Chile.
- [52] Filimonova, M., Gubskaya, V., Nuretdinov, I., Benedik, M., Cherepanova, N., Leshchinskaya, I. 2001. Mechanism of action of p-chlomercuribenzoate on endonuclease from the *Bacterium Serratia marcescens*. *Biochemistry* 66 (3): 323-327.
- [53] Fisher, S., Trail, D., Hecht, R. 2006. The high throughput purification of Fc-fusion proteins. *Process Biochemistry* 41:2473-2476.
- [54] Franken, K., Hiemstra, H., Van Meijgaarden, K., Subronto, Y., Den Hartigh, J., Ottenhoff, T., Drijfhout, J. 2000. Purification of His-tagged proteins by immobilized chelate affinity chromatography: the benefits from the use of organic solvent. *Protein Expression and Purification* 18:95-99.
- [55] Gallo, G., De Angelis, M., McSweeney, P., Rosaria, M., Gobbetti, M. 2005. Partial purification and characterization of an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Food Chemistry* 91: 535-544.

- [56] Garret, R., Grisham, C. 2005. Biochemistry. Third Edition. Thomson/Brooks/Cole.
- [57] García-Alvarez, N., Bordallo, C., Gascón, S., Suarez-Rendueles, P. 1985. Purification and characterization of a thermosensitive X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase (dipeptidyl aminopeptidase yscV) from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemistry Biophysics Acta 832:119-125.
- [58] Gómez de la Cruz, M. 1996. Degradación de péptidos hidrófobos por bacterias lácticas. Aplicación en la eliminación del sabor amargo en queso. Universidad Complutense de Madrid. España; Tesis Doctoral. p. 21-22.
- [59] Gosh, R. 2002. Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges. Journal Chromatography A 952:13-27.
- [60] Guilloteau, M., Laloï, M., Michaux, S., Bucheli, P., McCarthy, J. 2005. Identification and characterization of the major aspartic proteinase activity in *Theobroma cacao* seeds. Journal Science Food Agricultural 85:549-562.
- [61] Haddar, A., Bougatef, A., Agrebi, R., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M. 2009. A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and characterization. Process Biochemistry 44:29-35.
- [62] Hansen, C., M. del Olmo, Burri, C. 1998. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. Journal Science Food Agricultural 77: 273-281.
- [63] Herrera, J., Alizaga, R., Guevara, E., Jiménez, V. 2006. Germinación y crecimiento de la planta. 1ª. Ed. Editorial Universidad de Costa Rica. Costa Rica. p. 18-22.

- [64] Higgins, C., Payne, J. 1981. The peptide pools of germinating barley grains: relation to hydrolysis and transport of storage protein. *Plant Physiology* 67: 785-792.
- [65] Hopsu-Havu V, Glenner G. 1966. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycy-prolyl- β -naphthylamide. *Histochemie*. 7:192-201.
- [66] Hook, V., Peng Loh, Y. 1984. Carboxypeptidase B-like converting enzyme activity in secretory granules of rat pituitary. *Cell Biology* 81:2776-2780.
- [67] INTERNATIONAL STANDARD ISO 13321, 1996. Methods for determination of particule size distribution Part 8: Photon correlation spectroscopy. International Organization for Standardization (ISO).
- [68] ITC. 2001. Cocoa. A Guide to trade practices. International Trade Centre. Product and Market Development. Geneva. p. 180.
- [69] Jachimska, B., Wasilewska, M., Adamczyk, Z. 2008. Characterization of globular protein solutions and Dynamic Light Scattering, electrophoretic mobility and viscosity measurements. *Langmuir* 24:6866-6872.
- [70] Javaherian, S., Musheev, M., Kanoatov, M., Berezovski, M., Krylov, S. 2009. Selection of aptameros for a protein target in cell lysate and their application to protein purification. *Nucleic Acids Res* 37 e62.
- [71] Jiang, W., Hearn, M. 1996. Protein interaction with immobilized metal ion affinity ligands under high ionic strength conditions. *Analytical Biochemistry* 242:45-54.

- [72] Kalvatchev, Z., Garzaro, D., Guerra, F. 1997. *Theobroma cacao* L.: Un nuevo enfoque para nutrición y salud. *Agroalimentaria*.vol. 004 No. 61998; p. 23-25.
- [73] Kaszuba, M., Connan, M., McNeil-Watson, F., Nobbmann, U. 2007. Resolving concentrated particle size mixtures using dynamic light scattering. *Particle and Systems Characterization* 24:159-162.
- [74] Kishimura, H., Hayashi, K., Ando, S. 2006. Characteristics of carboxypeptidase B from pyloric of the starfish *Asterina pectinifera*. *Food Chemistry* 95:264-269.
- [75] Koehler, S., Ho, T. 1988. Purification and characterization of gibberellic acid-induced cysteine endopeptidases in barley aleurone layers. *Plant Physiology* 87:95-103.
- [76] Koehler, S., Ho, T. 1990. A major gibberellic acid-induced barley aleurone cysteine proteinase which digests hordein. *Plant Physiology* 94:251-258.
- [77] Koehler, S., Ho, T. 1990a. A major gibberellic acid-induced barley aleurone cysteine proteinase which digests hordein: Purification and characterization. *Plant Physiology* 94:251-258.
- [78] Kundu, S., Sundd, M., Jagannadham, V. 2000. Purification and characterization of a stable cysteine peptidase ervatamin B with disulfide bridges, from the latex of *Ervatamia coronaria*. *Journal Agricultural Food Chemistry* 48 (2):171-179.
- [79] Kunji, E., Mierau, L., Hagting, A., Poolman, B., Konings, W. 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 187-221.

- [80] Kung, C., Huang, W., Huang, Y., Yeh, K. 2009. Proteomic survey of copper-binding proteins in Arabidopsis roots by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry. *Proteomics* 6:2746-2758.
- [81] Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage TA. *Nature* 1970; 227:680-685.
- [82] Laloi, M., McCarthy, J., Morandi, O., Gysler, C., Bucheli, P. 2002. Molecular and biochemical characterization of two aspartic proteinases TcAP1 y TcAP2 from *Theobroma cacao* seeds. *Planta* 215:754-762.
- [83] Law, J., Haandrikman, A. 1997. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 7: 1-11.
- [84] Li, Y., Agrawal, A., Sakon, J., Beitle, R. 2001. Characterization of metal affinity of green fluorescent protein and its purification through salt promoted, immobilized metal affinity chromatography. *Journal Chromatography A* 909:183-190.
- [85] Li, Y., Beitle, R. 2002. Protein purification via aqueous two-phase extraction (ATPE) and immobilized metal affinity chromatography. Effectiveness of salt addition to enhance selectivity and yield of GFPuv. *Biotechnology Progress* 18:1054-1059.
- [86] Long, Y., Xing, X., Han, R., Sun, Y., Wang, Y., Zhao, Z., Mi, H. 2008. Two-step purification of low-content cellular protein using protein-imprinted polymers. *Analytical Biochemistry* 380:268-275.
- [87] López, L., Sequeiros, C., Natalucci, C., Brullo, A., Maras, B., Barra, D., Caffini, O. 2000. Purification and characterization of Macrodontain I, a cysteine peptidase form unripe fruits of *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *Protein Expression and purification* 18:133-140.

- [88] León, Jorge. 2000. Botánica de los Cultivos Tropicales. Tercera edición. Costa Rica, San José, IICA. p. 678.
- [89] Lichty, J., Malecki, J., Agnew, H., Michelson-Horowitz, D., Tan, S. 2005. Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expression and Purification* 41:98-105.
- [90] López Hernández, E., Valadez Villarreal, A. 2008. Análisis cromatográfico en las ciencias agropecuarias. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. División académica de ciencias agropecuarias. p. 33-38.
- [91] López-Andrade, P., Delgado-Nuñez, V. y Azpeitia-Morales, A. 2003. El cacao (*Theobroma cacao* L) en Tabasco. INIFAP-Huimanguillo, México.
- [92] Magboul, A., McSweeney, P. 2000. Purification and characterization of an X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024. *Sciences* 80:385-396.
- [93] McCluskey, A., Poon, G., Garipey, J. 2007. A rapid and universal tandem-purification strategy for recombinant proteins. *Protein Science* 16:2726-2732.
- [94] Markwell, M., Haas, S., Bieber, L., Tolbert, N. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry* 87:206-210.
- [95] Mayo, B., Kok, J., Venema, K., Bockelmann, W., Teuber, M., Reinke, H., Venema, G. 1991. Molecular cloning and sequence analysis of the X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 38-44.

- [96] Mercado-Flores, Y., Noriega-Reyes, Y., Ramírez-Zavala, B., Hernández Rodríguez, C., Villa-Tanaca, L. 2004. Purification and characterization of aminopeptidase (pumAPE) from *Ustilago maydis*. FEMS. Microbiology Letters 234: 247-253
- [97] Meyer, J., Jordi, P. 1987. Purification and characterization of X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus lactis* and from *Streptococcus thermophilus*. Journal of Dairy Science 70: 738-745.
- [98] Mills, K., Connor, K., Dorval, D., Lewandowski, K. 2006. Protein purification via temperature-dependent, intein-mediated cleavage from an immobilized metal affinity resin. Analytical Biochemistry 356:86-93.
- [99] Miyakawa, H., Hashimoto, I., Nakamura, T., Ishibashi, N., Shimamura, S., Igoshi, K. 1994. Purification and characterization of an X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* LHE-511. Milchwissenschaft 49:670-673.
- [100] Miyakawa, H., Kobayashi, S., Shimamura, S., Tomita, M. 1991. Purification and characterization of an X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LBU-147. Journal of Dairy Sciences 74:2375-2381.
- [101] Mossu, G. 1990. Le cacaoyer. Le Technicien d'agriculture Tropicale. Editions Maisonneuve et Larose. p.159.
- [102] Mohamed, S., El-Badry, M., Hamdy, S., Abdel-Ghany, S., Salah, H., Fahmy, A. 2009. *Faschiola gigantica*: Purification and Characterization of a Leucine Aminopeptidase. Journal Applied Sciences Research 5 (7):905-913.

- [103] Muzziotti, Dayana. 2008. Selección de microorganismos productores de Enzimas proteolíticas. Tesis. Universidad de los Andes. Argentina. p. 32-33.
- [104] Nallamsetty, S., Kundu, S., Jagannadham, V. 2003. Purification and biochemical characterization of a highly active cysteine peptidase ervatamin A from the latex of *Ervatamia coronaria*. Journal Protein Chemistry 22 (1):1-13.
- [105] Nardi, M., Chopin, M., Chopin, A., Cals, M., Gripon, J. 1991. Cloning and DNA sequence analysis of an X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* NCDO 763. Applied and Environmental Microbiology. 57: 45-50.
- [106] Nelson, D., Cox, M. (2008) Lehninger. Principles of Biochemistry. Fifth Edition. Worth Publishers.
- [107] Page, M., Di Cera, E. 2006. Role of Na⁺ and K⁺ in enzyme function. Physiological Reviews 86:1305-1308.
- [108] Page, M., Di Cera, E. 2008. Serine peptidases: Classification, structure and function. Cellular Molecular Life Sciences 65:1220-1236.
- [109] Pérez-Guzmán, A., Cruz y Victoria, T., Cruz-Camarillo, R. 2006. Purification and characterization of X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NRRL 634. Journal of Microbiology and Biotechnology 22:953-958
- [110] Pérez, A., Carvajal, C., Torres, M., Martín, M., Pina, D., Trujillo, R., Lorenzo, J., Natalucci, C., Hernández, M. 2006. Actividad proteolítica de

extractos enzimáticos obtenidos de plantas de la familia *Bromeliaceae*.
Revista Cubana de Plantas Medicinales 11(2).

- [111] Programa Estratégico de necesidades de investigación y transferencia de tecnología para la cadena agroindustrial cacao en México. Foro nacional Cacaotero. Programa estratégico de Investigación y Transferencia de Tecnología. Villahermosa, Tabasco. 25 y 26 de febrero de 2003. Memorias. p. 2-3.
- [112] Poulle, M., Jones, B.L. 1988. A proteinase from germinating barley. I. Purification and some physical properties of a 30 kDa cysteine endoproteinase from green malt. *Plant Physiology* 88:1454-1460.
- [113] Rajeswari, J., Ramakrishna, V., Sridhar, K., Ramakrishna, R., Rao, P. 2009. Purification and characterization of cysteine peptidase from germinating cotyledons of horse gram. *BMC Biochemistry*. doi: 10.1186/1471-2091-10-28.
- [114] Ramakrishna, V. 2007. Mobilization of albumins and globulins during germination of Indian bean (*Dolichos lablab* L. var. *lignosus*) seeds. *Acta Botanica Croatica* 66 (2):135-142.
- [115] Ramírez-Zavala, B., Mercado-Flores, Y., Hernández-Rodríguez, C., Villa-Flores, L. 2004. Purification and characterization of a lysine aminopeptidase from *Kluyveromyces marxianus*. *FEMS Microbiology Letters* 235:369-375.
- [116] Rasmussen, H. Branner, S., Wiberg, F., Wagtmann, N. 2003. Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV/CD26 in complex with a substrate analog. *Nature Structural and Molecular Biology* 10:19-25.

- [117] Renier, A., Hoorn, V., Leeuwenburgh, M., Bogyo, M., Joosten, M. 2004. Activity profiling of papain-like cysteine peptidases in plants. *Plant physiology* 135:1170-1178.
- [118] Rigolet, P., Guang, X., Rety, S., Chich, J. 2005. The structural comparison of the bacterial PepX and human DPP-IV reveals sites for the design of inhibitors of PepX activity. *FEBS Journal* 272:2050-2059.
- [119] Sánchez-Mundo, M.L, Bautista-Muñoz, C., Jaramillo-Flores, M.E. 2010. Characterization of the exopeptidase activity existing in *Theobroma cacao* L. *Process Biochemistry* 45 (7):1156-1162.
- [120] Sanz, Y., Toldrá, F. 2001. Purification and characterization of an X-prolyl dipeptidyl peptidase from *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology* 67:1815-1820.
- [121] Schmitt, J., Hess, H., Stunnenberg, H. 1993. Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Molecular Biology Reports* 18:223-230.
- [122] Scopes, Robert K. 1994. *Protein purification. Principles and practice.* Third Edition. Springer. p. 27, 175-177.
- [123] Shotwell, M., Larkins, B. 1988. The biochemistry and molecular biology of seed storage proteins. In *the Biochemistry of Plants. A comprehensive Treatise*, Vol. 15, ed. A Marcus Academic Press, New York, p. 297-345.

- [124] Sigrell, J., Eklund, P., Galin, M., Hedkvist, L., Liljedahl, P., Markeland-Johansson, C., Pless, T., Tortenson, K. 2003. Automated multi-dimensional purification of tagged proteins. *Journal of Structural and Functional Genomics* 4: 109-114.
- [125] Stirpe, A., Rizzuti, B., Pantusa, M., Bartucci, R., Sportelli, L., Guzzi, R. 2008. Thermally induced denaturation and aggregation of BLG-A: effect of the Cu²⁺ and Zn²⁺ metal ions. *Journal European Biophysics* 37.
- [126] Sopanen, T. 1976. Purification and partial characterization of a dipeptidase from barley. *Plant Physiology* 57:867-871.
- [127] Suck, K., Walter, J., Menzel, F., Tappe, A, Kasper, C., Naumann, C., Zeidler, R., Scheper, T. 2006. Fast and efficient protein purification using membrane adsorber systems. *Journal of Biotechnology* 121:361-367.
- [128] Stano, J., Kovács, P., Kákoniová, D., Lisková, D., Kirilova, N, Komov, V. 1994a. Activity of dipeptidyl peptidase IV in ginseng callus culture. *Biologia* 49:905-910.
- [129] Stano, J., Kovács, P., Nemeč, P., Neubert, K. 1994b. Dipeptidyl peptidase IV in gherkin seedlings *Cucumis sativus* L. cv. Pálava. *Biologia* 49:905-910.
- [130] Stano, J., Kovács, P., Psenak, M., Gajdos, J., Erdelsky, K., Kákoniová, D., Neubert, K. 1997. Distribution of dipeptidyl peptidase IV in organ tissue cultures of poppy plants *Papaver somniferum* L., cv 'Amarin'. *Pharmazie* 52:319-321.
- [131] Teledyne Isco. Lincoln, NE. <http://www.isco.com/>.

- [132] Tishinov, K., Stambolieva, N., Petrova, S., Galunsky, B., Nedkov, P. 2009. Purification and characterization of the sunflower seed (*Helianthus annus* L.) major aminopeptidase. *Acta Physiology Plant* 31:199-205.
- [133] Toxopeus, H. 1985. Botany. Types and population in Cocoa. London. Longman. p. 11-37.
- [134] Vesanto, E., Savijoki, K. Rantanen, T. Steel, J. Palva, A. 1995. An X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase (*pepX*) gene from *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology* 141: 3067-3075.
- [135] Visser, S., Hup, F., Exterkate, F., Stadhoudher, J. 1983. Bitter flavours in cheese 2: Models studies on the conformation and degradation of bitter peptides by proteolytic enzymes from calf rennet, stater cells and stater cell fraction. *Netherlands Milk and Dairy Journal*. 37: 169-180.
- [136] Voet, D., Voet, J. 2006. Bioquímica. 3ra. Edición. Editorial Panamericana. Pág. 80-81.
- [137] Voet, D., Voet, J. Pratt, C. 2008. Fundamentals of Biochemistry. Third Edition. John Wiley and Sons, Inc.
- [138] Voigt, J., Biehl, B. 1995. Precursors of the cocoa-specific aroma components are derived from the vicilin-class (7S) globulin of the cocoa seeds by proteolytic processing. *Botanica Acta* 108:283-289
- [139] Voigt, J., Biehl B. 1993. The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. *Food Chemistry* 47:145-151.
- [140] Voigt, J., Biehl, B., Heinrichs, H., Kamaruddin, S., Marsoner, G., Hugl, A. 1994. *In vitro* formation of cocoa specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. *Food Chemistry* 49: 173-180.

- [141] Voigth, J., Heinrichs, H., Voigt, G., Biehl, B. 1994. Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilina-like globulin of cocoa seeds. *Food Chemistry* 50: 177-184.
- [142] Voigt, G., Biehl, B., Heinrichs, H., Voigt, J. 1997. Aspartic proteinase levels in seeds of different angiosperms. *Phytochemistry* 44 (3) 389-392.
- [143] Watanabe, Y., Matsushima, S., Yamaguchi, A., Shioi, Y. 2009. Characterization and cloning of cysteine peptidase that is induced in green leaves of barley. *Plant Science* 176: 264-271.
- [144] Westra, D., Welling, G., Koedijk, D., Scheffer, A., Welling-Wester, T. 2001. Immobilised metal ion affinity chromatography purification of histidine-tagged recombinant proteins: a wash step with a low concentration of EDTA. *Journal Chromatography B* 760: 129-136.
- [145] Yüksel, G., Steele, J. 1996. DNA sequence analysis, expression, distribution, and physiological role of the Xaa-prolyl dipeptidyl aminopeptidase gene from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Applied Microbiology Biotechnology* 44:766-773.
- [146] Zhang, N., Jones, B.L. 1996. Purification and partial characterization of 31kDa cysteine endopeptidase from germinated barley. *Planta* 199:565-572.
- [147] <http://iescarin.educa.aragon.es/estatica/depart/biogeo/varios/BiologiaCurtis/Seccion%206/6%20-%20Capitulo%2036.htm>. Acceso 6 de septiembre de 2010.
- [148] <http://www.directopaladar.com/ingredientes-y-alimentos/el-cacao-en-la-gastronomia> . Acceso 6 de septiembre de 2010.
- [149] <http://merops.sanger.ac.uk>. Acceso 22 de noviembre de 2010.

[150] Enzyme Classification (E.C.) Acceso 22 de noviembre de 2010 (<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme.html>).