

PURIFICACIÓN PARCIAL Y CARACTERIZACIÓN DE UN INHIBIDOR DE TRIPSINA PRESENTE EN LA GLÁNDULA DIGESTIVA DEL CAMARÓN CAFÉ *Penaeus californiensis*.

Lourdes Mariana Díaz Tenorio, Lilia Isabel Ibarra Martínez, Fernando Luis García Carreño. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Apartado Postal 128. C.P. 23000. La Paz, BCS. México. Fax +52 (612) 1253625.

fgarcia@cibnor.mx.

Palabras clave: inhibidor pancreático, tripsina, Penaeus californiensis.

Introducción. Las proteasas son enzimas capaces de hidrolizar enlaces peptídicos. Son importantes porque regulan procesos fisiológicos donde se requiere la modificación de proteínas. En mamíferos, la tripsina es secretada en su forma inactiva (zimógeno) junto con su respectivo inhibidor. Si el tripsinógeno se activa por error, el inhibidor es capaz de regular su actividad proteolítica. Los inhibidores se clasifican en base a la cantidad de cisteínas presentes y a la disposición de los enlaces disulfuro que formen (1). El inhibidor pancreático de tripsina (PSTI) pertenece a la familia Kazal, presenta un pI aproximado de 5, su estructura primaria consta de 50 a 70 aminoácidos (en función de la especie) presenta una gran termoestabilidad y en su estructura terciaria presenta tres enlaces disulfuro (1, 3). En peneidos se tienen algunos reportes sobre las características de inhibidores semi-purificados (2, 4).

El objetivo principal del trabajo es la purificación y caracterización de un inhibidor tripsina de *Penaeus californiensis*.

Metodología. Se utilizó glándula digestiva de camarón café, con él se hizo un extracto enzimático (EE), para aislar los inhibidores de tripsina EE se sometió a un tratamiento ácido (IEA) (2), para concentrar la muestra se liofilizó. Después se realizó un paso de cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephadex G-75, el pico que presentó actividad inhibitoria (EMC) se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico en una columna MonoQ cuyo eluyente fue un gradiente de NaCl (AEC).

En cada paso de purificación se verificó la concentración y patrón de proteínas, así como la actividad inhibitoria sobre tripsina en gel y en tubo (2, 4).

Resultados y Discusión. Como se puede observar en la figura 1, es posible ir purificando inhibidores protéicos con actividad inhibitoria de tripsina (bandas con asterisco del carril AEC). Estas proteínas presentan características similares a los PSTIs, estas son: peso cercano a 6.5 kDa y punto isoeléctrico cercano a 5, estas moléculas tienen la capacidad de inhibir tripsina bovina, de bacalao, de *Penaeus californiensis* y *P. stylirostris*.

Debido a que este tipo de inhibidores protéicos poseen en su secuencia 6 cisteínas, es posible que presenten tres enlaces disulfuro (1), esta característica los hace muy estables a condiciones extremas, pueden permanecer a 85 °C durante 10 minutos, así como en pH 1.8 durante 2 h sin afectar su actividad.

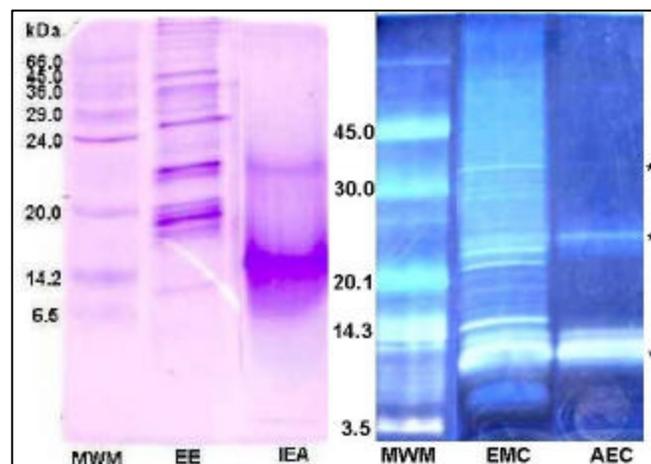


Fig. 1 Perfil protéico de fracciones con actividad inhibitoria de tripsina (EE y IEA teñidas con Coomassie; EMC y AEC con AgNO₃)

Conclusiones. La glándula digestiva del camarón café *P. californiensis* presenta proteinasas, entre ellas está tripsina. Los inhibidores aquí reportados podrían participar como reguladores de la actividad de esta enzima, ya que poseen características similares a los inhibidores tipo kazal reportados en otros organismos.

Agradecimientos

A CONACyT por la beca otorgada al estudiante y al proyecto fiscal del CIBNOR (RP10).

Bibliografía

1. Laskowski, M y Kato, I. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* 49:593-626.
2. García-Carreño, FL, Carrillo, O y Navarrete, MA. 1999. Control of digestive functions in shrimp, I. An inhibitor of trypsin activity in the hepatopáncreas. *Proc. Fourth International Crustacean Congress.* Amsterdam : 915-922.
3. Kishimura, H, Saeki, H y Hayashi, K. 2001. Isolation and characteristics of trypsin inhibitor from the hepatopancreas of a squid (*Todarodes pacificus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 130B:117-123.
4. de Albuquerque, C, García-Carreño, FL y Navarrete, MA. 2001. Trypsin and trypsin inhibitors from penaeid. *J. Food Biochem.* 26(3):233-251.