



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

Ciencias Biológicas y de la Salud

---

# Acción de Proteasas de *Pseudomonas* spp. sobre Proteínas Contráctiles en un Sistema Modelo.

Comité tutorial:

Dra. Ma. Isabel Guerrero Legarreta y M. en C. Paulina Lara Calderón.

Asesor: Dra. Gabriela M. Rodríguez Serrano.

T E S I S

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

Presenta:

Ing. Ernesto Alanis García.

H. Jurado:

Dr. Andrés Hernández Arana.

M. en C. Paulina Lara Calderón.

Dra. Ma. Isabel Guerrero Legarreta.

Dra. Gabriela M. Rodríguez Serrano.

1997

México, D. F. a 24 de enero de 1997

## **Agradecimientos.**

Agradezco a la UAM-Izt el haberme permitido continuar con mis estudios, así como también agradezco al CONACyT por el apoyo económico y la confianza otorgada durante el tiempo que duró este trabajo de investigación.

Agradezco el apoyo incondicional que me dieron mis asesores para la realización de este trabajo de tesis. Dra. Isabel Guerrero, que con su ejemplo y apoyo en todo momento ha permitido generar en mi la disciplina de la investigación. A la futura Dra. Paulina Lara, por haber contado con su amistad y enseñanza en los inicios de mi carrera en la investigación, guardando de ello unos bellos recuerdos. Dra. Gabriela Rodríguez, por su apoyo, sus consejos y asesoría durante el trabajo de laboratorio. Agradezco la atención y el tiempo que se tomó el Dr. Andrés Hernández en la revisión de este escrito, así como sus claras observaciones.

A la Dra. Edith Ponce y a la Dra. Arely Prado, por haberlas tenido como maestras en la licenciatura y ahora como compañeras de grupo y amigas, agradezco sus consejos y apoyo durante la elaboración de este tesis, así como también a la M. en B. Keiko Shirai, quien infundó en mi, la fuerza para seguir en esta carrera. A la M. en C. Lourdes Pérez, al M. en B. Héctor Escalona y a la M. en B. Ma. Eugenia Aguilar por su apoyo y ayuda durante todo este tiempo.

A mis compañeros de generación, con quienes compartí muchos momentos agradables y siempre he contado con su apoyo, en especial a Alfonso y Herminio.

Dedico esta tesis a mis padres, quienes en todo momento han estado a mi lado, y que me han mostrado el camino del bien con su ejemplo, humildad y constancia. A ustedes quienes en los momentos de desfallecimiento y de ignorancia de la vida, han tenido la comunicación plena y clara para mostrarme el camino a seguir. Siempre tendré en mente sus palabras. También un agradecimiento a mis hermanos Elvira, Luis, Juan, Mina, Manolo, Estela y Salvador por su apoyo incondicional así como a Lalo, Cecilia y Juan y a mis sobrinos Luisito, Cecy, Evelin y Omar.

## U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

Agradezco la oportunidad y apoyo que se me brindó durante las estancias con los diferentes investigadores, al Dr. Guillermo Arteaga (CIAD-AC, Hermosillo, Son.), al Dr. Martin Collins y al futuro Dr. Victor Kuri (Universidad de Queen de Belfast, Irlanda). Gracias por compartir sus conocimientos.

Tengo un agradecimiento muy especial para mi futura esposa Silvia, quien en todo momento a estado ha mi lado apoyándome y compartiendo nuevas experiencias, gracias por estar aquí.

*Ernesto.*

IT-672/56

# Contenido.

Pag.

---

<b>Lista de tablas.</b>	<b>iii</b>
<b>Lista de figuras.</b>	<b>iv</b>
<b>Resumen.</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción.</b>	<b>3</b>
<b>2. Objetivos.</b>	<b>5</b>
<b>3. Revisión Bibliográfica.</b>	<b>6</b>
3.1 Importancia del género <i>Pseudomonas</i> en la descomposición de la carne.	6
3.1.1 Aspectos taxonómicos.	6
3.1.2 Crecimiento microbiano en sustratos musculares.	7
3.2 Enzimas proteolíticas.	8
3.2.1 Clasificación y mecanismo de proteasas.	9
3.3 Proteínas miofibrilares.	11
3.3.1 Estructura molecular de los filamentos protéicos.	11
3.3.1.1 Filamentos gruesos.	11
3.3.1.2 Filamentos delgados.	14
3.3.1.3 Proteínas intermediarias.	15
3.3.2 Métodos de extracción y purificación de proteínas miofibrilares.	16
3.4 Acción de bacterias proteolíticas sobre las proteínas miofibrilares.	19
3.5 Hidratación de las proteínas de la carne durante la descomposición.	21
<b>4. Materiales y Métodos.</b>	<b>23</b>
4.1 Selección de cepas de <i>Pseudomonas</i> spp.	23
4.2 Obtención de los extractos enzimáticos.	24
4.3 Separación de proteasas en los extractos enzimáticos y determinación de sus pesos moleculares.	27
4.4 Obtención de las fracciones protéicas: actomiosina, miosina y actina.	28
4.4.1 Preparación tejido muscular.	28
4.4.2 Extracción de Actomiosina.	28
4.4.3 Extracción de Miosina.	29
4.4.4 Extracción de Actina.	31
4.5 Acción de los extractos enzimáticos sobre las diferentes fracciones protéicas.	33
4.5.1 Preparación de las fracciones miofibrilares.	33
4.5.2 Electroforesis.	33
4.5.3 Acción sobre proteínas de bajo peso molecular (< 200 KDa). Cinética de hidrólisis.	34
4.5.4 Electroforesis.	36
4.5.5 Acción sobre proteínas de alto peso molecular (> 200 KDa). Cinética de hidrólisis.	37
4.5.6 Acción de Calpainas.	38
4.5.7 Electroforesis.	38

4.6 Análisis estadístico.	39
<b>5. Resultados y Discusión.</b>	<b>40</b>
5.1 Selección de cepas proteolíticas.	40
5.2 Composición de extractos enzimáticos. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS para sustrato.	41
5.3 Extracción de fracciones proteicas.	44
5.4 Análisis estadístico.	46
5.5 Perfiles electroforéticos de hidrólisis.	49
<b>6. Conclusiones.</b>	<b>57</b>
<b>7. Bibliografía.</b>	<b>59</b>
<b>Anexo.</b>	<b>65</b>

## Lista de tablas.

	<b>Pag.</b>
Tabla 1. Familias de enzimas proteolíticas.	10
Tabla 2. Efecto de bacterias sobre constituyentes específicos de carne.	20
Tabla 3. Desarrollo experimental para el estudio de la acción de proteasas de <i>Pseudomonas</i> spp sobre proteínas contractiles de bajo peso molecular.	34
Tabla 4. Composición de los grupos de muestras analizadas.	35
Tabla 5. Desarrollo experimental para el estudio de la acción de proteasas de <i>Pseudomonas</i> spp. sobre proteínas contráctiles de alto peso molecular.	37
Tabla 6. Pruebas de proteólisis de <i>Pseudomonas</i> spp.	40
Tabla 7. Pesos moleculares de las proteasas de los extractos enzimáticos.	43
Tabla 8. Concentraciones de fracciones miofibrilares y actividad de extractos enzimáticos.	45
Tabla 9. ANOVA con prueba múltiple de Duncan para actomiosina.	48
Tabla 10. ANOVA con prueba múltiple de Duncan para miosina, actina y proteínas reguladoras.	48
Tabla 11. ANOVA con prueba múltiple de Duncan para actina.	48
Tabla 12. Concentraciones de fracciones miofibrilares y actividad de extractos enzimáticos.	54
Tabla A. Extracto de actomiosina.	66
Tabla B. Extracto de miosina, actina y proteínas reguladoras.	67
Tabla C. Extracto de actina.	68

## Lista de figuras.

	<b>Pag.</b>
Figura 1. Estructura de la miofibrilla.	13
Figura 2. Polimerización y despolimerización de actina.	18
Figura 3. Diagrama de flujo de producción y purificación parcial de proteasas.	26
Figura 4. Esquema del diseño experimental para la acción de extractos enzimáticos sobre fracciones protéicas.	36
Figura 5. Degradación de caseína en placa por cepas de <i>Pseudomonas</i> spp.	40
Figura 6. Perfiles electroforéticos de zonas bioactivas de los extractos enzimáticos.	43
Figura 7. Perfiles electroforéticos en geles de poliacrilamida-SDS 12 %: a) actomiosina; b) miosina, actina y proteínas reguladoras; c) actina; M) marcador de peso molecular.	44
Figura 8. Perfiles electroforéticos de las cinéticas de hidrólisis de proteasas de <i>P. fragi</i> , <i>P. fluorescens</i> , C61 y C20 sobre la fracción de actomiosina.	51
Figura 9. Perfiles electroforéticos de las cinéticas de hidrólisis de proteasas de <i>P. fragi</i> , <i>P. fluorescens</i> , C61 y C20 sobre la fracción de miosina, actina y proteínas reguladoras.	52
Figura 10. Perfiles electroforéticos de las cinéticas de hidrólisis de proteasas de <i>P. fragi</i> , <i>P. fluorescens</i> , 61 y 20 sobre la fracción de actina.	53
Figura 11. Cinética de hidrólisis de proteasas de <i>P. fragi</i> sobre actomiosina a 13°C.	56
Figura 12. Cinética de hidrólisis de proteasas de <i>P. fluorescens</i> sobre actomiosina a 13°C.	56
Figura 13. Cinética de hidrólisis de proteasas de C61 sobre actomiosina a 13°C.	56
Figura 14. Cinética de hidrólisis de calpains sobre actomiosina a 13°C.	56
Figura A.1. Proteólisis de actomiosina por proteasas de <i>P. fragi</i> .	69
Figura A.2. Proteólisis de actomiosina por proteasa de <i>P. fluorescens</i> .	69
Figura A.3. Proteólisis de actomiosina por proteasa de C61.	70
Figura A.4. Proteólisis de actomiosina por proteasa de C20.	70
Figura B.1. Proteólisis de miosina, actina y proteínas reguladoras por proteasas de <i>P. fragi</i> .	71
Figura B.2. Proteólisis de miosina, actina y proteínas reguladoras por proteasas de <i>P. fluorescens</i> .	71
Figura B.3. Proteólisis de miosina, actina y proteínas reguladoras por proteasas de C61.	72
Figura B.4. Proteólisis de miosina, actina y proteínas reguladoras por proteasa de C20.	72
Figura C.1. Proteólisis de actina por proteasas de <i>P. fragi</i> .	73
Figura C.2. Proteólisis de actina por proteasa de <i>P. fluorescens</i> .	73
Figura C.3. Proteólisis de actina por proteasa de C61.	74
Figura C.4. Proteólisis de actina por proteasa de C20.	74

## Resumen.

El objetivo de este trabajo fue determinar la acción de proteasas exógenas de *Pseudomonas spp.* sobre proteínas contráctiles de res en un sistema modelo, así como determinar la variedad de proteasas y pesos moleculares de los extractos enzimáticos obtenidos de las cepas probadas. En una primera etapa se hizo una selección de cepas proteolíticas mediante pruebas en placas de grenetina y caseína, se probaron 4 cepas aisladas de carne de res y se incluyeron *P. fragi* (ATCC-4973) y *P. fluorescens* (NRRL-B-1244) por estar bien reportada su capacidad hidrolítica. De las 4 cepas aisladas, se seleccionaron la C61 y la C20 por presentar gran capacidad hidrolítica. Para la producción de proteasas, se propagaron todas las cepas en medio tripticaseína y soja (TSB) y posteriormente se inocularon en matraces bafleados de TSB con 1 ml (1% v/v) de inóculo. Se eliminó la fracción celular por centrifugación y el sobrenadante se filtró para obtener un licor. Este filtrado se sometió a una precipitación fraccionaria con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para insolubilizar las proteasas seguido de una resuspensión del precipitado, finalmente se dializó por 24 h. A los diferentes extractos enzimáticos se les determinó la actividad proteolítica utilizando caseína como sustrato. Para determinar la composición (diversidad) y pesos moleculares de las proteasas de los diferentes extractos enzimáticos, se llevó a cabo electroforesis en condiciones no desnaturalizantes en geles de poliacrilamida-SDS, estos geles fueron sumergidos en una solución de caseína por un tiempo predeterminado. Los geles fueron fijados, teñidos, y revelados para obtener las zonas bioactivas. El peso molecular se determinó mediante una curva patrón.

La acción de las proteasas se probó sobre 3 fracciones miofibrilares: a) actomiosina (AM), b) miosina, actina y proteínas reguladoras, y c) actina. Para la extracción de las proteínas se utilizaron cortes de *Biceps femoris* y *Semimembranoso* comprado en un mercado local. La carne se homogenizó hasta obtener una pasta, se tomaron porciones iguales para la extracción de las fracciones miofibrilares. La fracción de AM se obtuvo mediante extracción con una solución salina de alta fuerza iónica, la fracción de miosina, actina y proteínas reguladoras se obtuvo mediante una solución de alta fuerza iónica y pirofosfatos, y por último la extracción de actina se llevó a cabo en dos etapas, primero se obtuvo un polvo muscular mediante lavados con acetona y posteriormente se extrajo la actina con soluciones de baja fuerza iónica.



La acción de las proteasas sobre las diferentes fracciones miofibrilares se realizó en alicuotas de 1 ml en tubos de policarbonato hasta 48 h a 13°C, se tomaron muestras a los 0, 4, 8, 12, 24, 36 y 48 h. A las muestras se les dió un pretratamiento desnaturalizante para someterlas a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12%; los geles se fijaron, tiñeron, y revelaron para posteriormente leerlos por densitometría y calcular el peso molecular de las diferentes bandas. Paralelamente, para la acción proteolítica de estos extractos enzimáticos sobre proteínas miofibrilares de alto peso molecular (> de 200 KDa) se llevó a cabo una cinética sobre AM bajo las mismas condiciones; para obtener los perfiles electroforéticos de hidrólisis se emplearon geles de poliacrilamida-SDS al 3.5%.

En los perfiles electroforéticos para la muestra de actomiosina, se mostró una gran degradación de todas las proteínas por parte de los cuatro extractos enzimáticos, siendo el obtenido por la cepa C61 el que presentó la mayor degradación de la banda de miosina pesada ( $P > 0.0001$ ). En cuanto a la muestra de miosina, actina y proteínas reguladoras, el comportamiento fue similar al que se observó en la preparación de actomiosina, teniéndose una mayor degradación de miosina pesada por los extractos de C61 y *P. fragi* ( $P > 0.0001$ ). Con respecto a la acción sobre la preparación de actina, la degradación de ésta fue evidente sin encontrar diferencia significativa entre la acción de las proteasas. En las proteínas de alto peso molecular se observó degradación de titina, nebulina y filamina por parte de extractos de C61, *P. fragi* y *P. fluorescens*.

Se encontró que *P. fragi* produjo 2 proteasas, una de 49.2 KDa y otra de 34.2 KDa, *P. fluorescens* una de 46.1 KDa, en cuanto a las cepas aisladas de carne la cepa C61 mostró una proteasa muy activa de 46.8 KDa y por último la cepa C20 una proteasa de 49.2 KDa.

# 1. Introducción.

Las actividades metabólicas asociadas con el crecimiento de bacterias psicrotrófas aceleran el deterioro de alimentos musculares durante el almacenamiento en refrigeración, sin embargo, la naturaleza precisa de estos cambios deteriorantes y su relevancia están poco definidos. A este respecto y en comparación con productos lácteos, hay una escasez de información concerniente al efecto de proteasas bacterianas en tejido muscular.

Por otro lado el papel de enzimas proteolíticas de psicrótrofos en el proceso de descomposición están sujetas a controversias considerables. Aunque hay publicaciones que apoyan la degradación de proteínas como un mecanismo de descomposición (**Chung, 1968; Thompson y col., 1985**), un número igual de reportes sostienen que los constituyentes no protéicos de bajo peso molecular del músculo son precursores de metabolitos de descomposición (**Lerke y col., 1967; Gill, 1986**).

La superficie de las canales de animales sacrificados se contamina fácilmente por microorganismos del suelo, aire y agua, mientras que el interior del músculo esquelético sano normalmente carece de microorganismos. Al manipular las canales en los locales de distribución de alimentos, en los que son cortados en unidades más pequeñas, las superficies de corte van adquiriendo una carga microbiana creciente. El destino de esta flora contaminante depende de diversos factores intrínsecos y ambientales, así como su capacidad para actuar sobre la carne a bajas temperaturas. La microflora aeróbica de descomposición está dominada por las pseudomonas. Estas bacterias que se encuentran en la superficie no pueden penetrar el tejido muscular hasta que ellas produzcan sus propias enzimas proteolíticas, lo cual no ocurre hasta la parte final del crecimiento exponencial (**Gill, 1982**). Para este tiempo, el músculo esta cubierto por una película lamosa. Por lo tanto al inicio del almacenamiento la microflora de descomposición crece a expensas de la glucosa y una vez agotada ésta, inicia la degradación de aminoácidos y proteínas. (**Gill, 1983**).

En éste estudio no se pretendió igualar las condiciones reales de descomposición, sino determinar la acción de las proteasas de *Pseudomonas* spp. sobre un aislado de proteínas contráctiles de carne de res en un sistema modelo, por lo cual se llevó a cabo la degradación de las proteínas miofibrilares en condiciones extremas, ya que en condiciones reales se llevaría demasiado tiempo y la presencia de otros compuestos provocarían resultados difíciles de interpretar.

## 2. Objetivos.

- Por medio de electroforesis determinar la acción de proteasas de *Pseudomonas* spp. sobre proteínas contráctiles de res en un sistema modelo.
- Determinar la variedad y pesos moleculares de las proteasas en los diferentes extractos enzimáticos.
- Determinar la acción de los extractos enzimáticos sobre proteínas de alto peso molecular, mayores de 200 KDa y de bajo peso molecular, menores a 200 KDa en un sistema modelo.

### 3. Revisión Bibliográfica.

#### 3.1 Importancia del género *Pseudomonas* en la descomposición de la carne.

Las pseudomonas son un género de bacterias Gram negativas las cuales incluyen especies de gran versatilidad metabólica y algunas con tendencias patogénicas.

##### 3.1.1 Aspectos taxonómicos.

Los psicrótrofos no constituyen un grupo específico de microorganismos. Estos microorganismos incluyen bacterias Gram negativas y Gram positivas, bacilos, cocos o vibrios, espiroformes o no espiroformes, y aerobios y anaeróbios. Los géneros de bacterias psicrótrofas incluyen a *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* y *Alcaligenes* (Suhren, 1989).

La primera taxonomía realizada de pseudomonas aisladas de alimentos musculares en refrigeración, no se ajustó a las especies descritas. La mayoría eran Gram negativas, bacilos móviles, oxidasa positiva, oxidativas en el medio de Hugh-Leifson OF pero sin secretar pigmentos fluorescentes. La deficiencia en el primer intento por clasificarlas fue evidente por su omisión en la 8ª ed. del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.

La posición taxonómica de las pseudomonas que crecen en carne permaneció incierta hasta los recientes estudios taxonómicos de Shaw y Latty (1981, 1982 y 1984), y Molin y Ternström (1982 y 1986), estos dos grupos de científicos concluyeron independientemente que la preponderancia de las pseudomonas en carne de res, puerco y aves forman un grupo distinto y se agruparon con la cepa tipo *P. fragi*. Gracias a estos estudios las cepas de *P. fragi* están ahora clasificadas en el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Krieg y Holt, 1984).

### 3.1.2 Crecimiento microbiano en substratos musculares.

El músculo es un substrato bioquímica y estructuralmente complejo, compuesto por proteínas, lípidos y numerosos compuestos no proteínicos de bajo peso molecular. Aunque hay algunas diferencias importantes intra e interespecies, la composición gruesa del músculo postregor de aves de corral, pescado y especies de mamíferos son similares. Así, dependiendo de la especie, el contenido de agua de la carne magra puede variar desde 74 a 80 %, la proteína 15 a 22 %, de los lípidos de 0.7 a 4.3 %, los compuestos de bajo peso molecular de 1.2 a 3.5 % y los carbohidratos el 1.0 % (Greer, 1989).

Cuando a un microorganismo se le provee con fuentes nutricionales tanto complejas como simples, invariablemente utilizará preferentemente a los constituyentes simples sobre los complejos tales como las proteínas. La preferencia de substratos en músculo fue propuesta inicialmente por Beatty y Collins (1939). Estos investigadores especularon que la deterioración del músculo de pescado era caracterizada por dos fases distintas. La primera involucra la oxidación de ácido láctico, azúcares y otros carbohidratos, mientras que la segunda fase es un ataque sobre aminoácidos y proteínas. El inicio de la descomposición aeróbica esta en función del metabolismo de las pseudomonas. Inicialmente estas bacterias crecen a expensas de la glucosa, sin generar subproductos de mal olor. Cuando la densidad celular excede de  $10^8/\text{cm}^2$ , el suplemento de glucosa en la carne llega a ser insuficiente a la demanda bacteriana y los microorganismos empiezan a atacar a los aminoácidos. El pH de la carne aumenta como resultado de la acumulación de amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) por la desaminación de los aminoácidos, las moléculas remanentes son usadas como fuente de energía (Lea y col., 1969). Otros productos indeseables, tales como aminas biogénicas (cadaverina, putrescina, isobutilamina) y sulfuros ( $\text{H}_2\text{S}$ , metil sulfuro), son formados en pequeñas cantidades, pero la intensidad de su olor y sabor compensan su baja concentración (Miller y col., 1973). Por lo tanto el pH normal de 5.6 a 5.8 en carne postmortem se llega a incrementar y puede alcanzar un pH por arriba de 8.0 en carne putrefacta. La composición de las carnes es tal, que, las proteínas insolubles en ácido tricloroacético ( $\text{Cl}_3\text{CCOOH}$ ) son separadas de los constituyentes nitrogenados simples.

Muchos estudios sobre descomposición de carnes han empleado temperaturas de refrigeración entre 5-7°C. Este rango de temperatura es restrictiva para un gran número de bacterias, levaduras y mohos que pueden encontrarse en carne fresca, tales como carne molida de res y puerco. Cuando la carne se deja descomponer en forma natural a 20°C o más, una gran variedad de microorganismos proliferan, muchos de los cuales no podrían crecer entre 5-7°C.

Los microorganismos que crecen sobre carne fresca a temperaturas bajas han sido descritos por varios investigadores (**Kirsch y col., 1952; Brown y Weidemann, 1958; Ayres, 1960; Jay, 1966**). Aquellos que predominan y determinan los cambios a bajas temperaturas en carnes descompuestas son bacterias Gram negativas de los géneros de *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, y *Alcaligenes*. Los cuatro géneros de bacterias Gram negativas son aerobias y en condiciones de baja temperatura y alta humedad, su crecimiento es favorecido. La consecuente solubilidad superficial alta de gases (en particular O<sub>2</sub>) también favorece su rápido crecimiento. Las *Pseudomonas* spp. constituyen el único grupo de bacterias predominantes e importantes que descomponen a la carne fresca en refrigeración. Este género es dominante en alimentos frescos por virtud a su habilidad a iniciar rápidamente su crecimiento a bajas temperaturas, a su comparable tasa de crecimiento y su insensibilidad a competir con otros psicrotrofos (**Gill y Newton, 1977; Gill, 1982**). Además, su crecimiento no es restringido por el pH dentro de un intervalo de 5.5 a 7.0. Metabólicamente, estas pseudomonas de descomposición tienen una capacidad oxidativa extensiva, y pueden utilizar una gran variedad de compuestos nitrogenados solubles de bajo peso molecular como fuente de energía.

### 3.2 Enzimas proteolíticas.

La ruptura de enlaces peptídicos es una de las más frecuentes e importantes modificaciones de proteínas. Originalmente la proteólisis enzimática ha sido asociada con la digestión de proteínas y rápidamente llamó la atención de fisiólogos y bioquímicos, quienes estaban interesados en el proceso de la digestión de proteínas en hombres y animales. De aquí que las proteasas digestivas de secreciones gástricas y pancreáticas están entre las enzimas más caracterizadas y mucho del conocimiento común de la estructura de las proteínas y su función enzimática ha sido derivada del

estudio de éstas proteasas. La investigación de las cinéticas, especificidad e inhibición junto con análisis detallados de su secuencia de aminoácidos y estructura por rayos-X han permitido la identificación de los componentes y geometría de sus sitios activos, y de éstos se dedujeron los mecanismos de acción de las proteasas digestivas. Como resultado, llegó a ser evidente que las proteasas pueden ser clasificadas en familias, considerando que los miembros de cada familia tienen estructuras, mecanismos o acción similares. En la historia más reciente de las enzimas, la atención ha sido enfocada sobre las proteasas que juegan papeles regulatorios en una gran variedad de procesos fisiológicos. Las enzimas proteolíticas son también una herramienta principal en el análisis secuencial de las proteínas y en la identificación y aislamiento de dominios de las proteínas multifuncionales más complejas (Walsh, 1986). El aislamiento de proteínas nativas intactas de tejidos biológicos requiere de inactivación selectiva de proteasas que interfieren por inhibidores específicos. Esta medición, conceptualmente simple, puede ser una tarea laboriosa si la naturaleza, estabilidad y especificidad de las proteasas contaminantes no son conocidas. La biología molecular proporciona herramientas para estos estudios a través de la clonación y secuenciación de ADN correspondientes. Esta información ha contribuido significativamente al mejor entendimiento sobre la organización de los dominios, función y evolución de las proteasas regulatorias más complejas (Neurath, 1989).

### 3.2.1 Clasificación y mecanismo de proteasas.

En los estudios iniciales en enzimología, las proteasas fueron clasificadas de acuerdo a su tamaño, carga o especificidad de sustrato. Un sistema más racional está basado en una comparación del mecanismo del sitio activo de acción y la estructura tridimensional. Están reconocidos cuatro clases de mecanismos por la International Union of Biochemistry y dentro de éstas clases, seis familias de proteasas son reconocidas a la fecha (Tabla 1). Cada familia tiene un conjunto característico de residuos de aminoácidos funcionales arreglados en una configuración especial para formar el sitio activo. Se cree que los miembros de cada familia provienen de un mismo ancestro por medio de evolución divergente. Las proteasas serínicas incluyen dos familias distintas: las proteasas serínicas de mamíferos, por ejemplo quimotripsina (EC 3.4.21.1), tripsina (EC 3.4.21.4), elastasa (EC 3.4.21.11) y las proteasas serínicas bacterianas, por ejemplo subtilisina



(EC 3.4.21.14). Difieren por su secuencia de aminoácidos y su estructura tridimensional, aunque presentan una geometría del sitio activo y mecanismo enzimático común. Análogamente las metaloproteasas incluyen dos familias: la carboxipeptidasa pancreática de mamíferos (EC 3.4.17.1) la cual difiere de la termolisina bacteriana (EC 3.4.24.4) en su estructura química aunque ambas son zinc metalo-enzimas y tienen la configuración del sitio activo similar. La familia de proteasas mejor caracterizada y más versátil fisiológicamente es la de las proteasas serínicas de mamíferos, ejemplificadas por la tripsina pancreática, quimotripsina, elastasa y kalikreina (EC 3.4.21.8) (**Kraut, 1977**, citado por **Neurath, 1989**). La estructura de su sitio activo es la tríada catalítica de Asp<sup>102</sup>, His<sup>57</sup> y Ser<sup>195</sup> (numeración de quimotripsina). La catálisis procede vía un estado intermedio de transición tetrahédrico durante las etapas de acilación y desacilación de catálisis. El mismo tipo de mecanismo presentan la acción de todas las otras proteasas serínicas. La conformación global de las proteasas serínicas pancreáticas es prácticamente el mismo: dos dominios compactos similarmente plegados, simétricamente dispuestos al rededor de ejes binarios (two-fold) (**Neurath, 1989**).

Tabla 1. Familias de enzimas proteolíticas (Neurath, 1989).

<i>Familia</i> <sup>a</sup>	<i>Proteasas representativas</i> <sup>b</sup>	<i>Características de los residuos del sitio activo</i> <sup>c</sup>
Proteasas serínicas I	<b>Quimotripsina</b> Tripsina Elastasa	Asp <sup>102</sup> , Ser <sup>195</sup> , His <sup>57</sup>
Proteasas serínicas II	<b>Subtilisina</b>	Asp <sup>32</sup> , Ser <sup>221</sup> , His <sup>64</sup>
Proteasas cisteínicas	<b>Papaina</b> Actinidina Catepsina B y H de rata viva	Cys <sup>25</sup> , His <sup>159</sup> , Asp <sup>158</sup>
Proteasas aspárticas	<b>Penicilopepsina</b> <i>Rhizopus chinesis</i> y <i>Endokiaparasitica</i> <sup>b</sup> , proteasas ácidas	Asp <sup>33</sup> , Asp <sup>213</sup>
Metaloproteasas I	<b>Carboxipeptidasa bovina A</b>	Zn, Glu <sup>270</sup> , Try <sup>248</sup>
Metaloproteasas II	<b>Termolisina</b>	Zn, Glu <sup>143</sup> , His <sup>231</sup>

<sup>a</sup> Esta tabla incluye solamente enzimas con secuencia de aminoácidos y estructura tridimensional conocidos, excepto las catepsinas

<sup>b</sup> Fuentes.

B y H de rata viva, para las cuales la estructura tridimensional ha sido supuesta por analogía con la papaina.

<sup>c</sup> El número de residuos corresponde a la secuencia de aminoácidos de las enzimas enlistadas con negritas en la columna 2.

### 3.3 Proteínas miofibrilares.

Las proteínas miofibrilares representan el componente más abundante de materia seca del músculo, más del 50 % de las proteínas totales del músculo. Desempeñan un papel fundamental en sus funciones fisiológicas *in vivo* y en los cambios que se originan después de la muerte del animal. Su solubilidad es inferior a las proteínas sarcoplasmáticas, pero superior a las proteínas del estroma. Son solubles en soluciones de baja fuerza iónica ( $\mu = 0.6$ ) (Cheftel y col., 1989).

#### 3.3.1 Estructura molecular de los filamentos protéicos.

La fibra muscular es la unidad fundamental del músculo donde tienen lugar todos los procesos metabólicos "*in vivo*" y los procesos bioquímicos post-mortem (Figura 1). La fibra muscular esta constituida por una membrana (sarcolema) que alberga al citoplasma celular (sarcoplasma), el cual baña a las miofibrillas, que forman el sistema contráctil del músculo. Las miofibrillas son varillas cilíndricas, de la misma longitud que las fibras musculares las cuales están integradas por dos tipos de filamentos, gruesos y delgados, que se diferencian por su composición y propiedades bioquímicas. Estos filamentos están parcialmente encajados y superpuestos en algunas zonas, de manera que su yuxtaposición origina una ordenación de bandas claras y oscuras, responsables del carácter estriado del músculo esquelético. En el centro de la banda I se observa una línea, denominada Z, que delimita la unidad fundamental de la miofibrilla, el sarcómero, área entre dos líneas Z consecutivas que se repite periódicamente a lo largo de la misma (Flores y Bermell, 1984).

##### 3.3.1.1 Filamentos gruesos.

Los filamentos gruesos de la banda A están formados por un cuerpo central de colas de moléculas de la proteína miosina y unos puentes transversales, que sobresalen del filamento, correspondientes a las cabezas de las moléculas de miosina. Las moléculas de miosina se unen punta con punta, formando un polímero con cabezas a ambos lados finales y un cuerpo central liso, que se superpone con otros, de forma imbricada. Las cabezas globulares se apartan del cuerpo

central o varilla, formando los denominados puentes transversales. Los filamentos gruesos contienen, cada uno, de 200 a 400 moléculas de miosina y en ellas se han identificado pequeñas fracciones de otras proteínas que tienen funciones reguladora, entre las que se encuentran las proteínas C y M (Flores y Bermell, 1984).

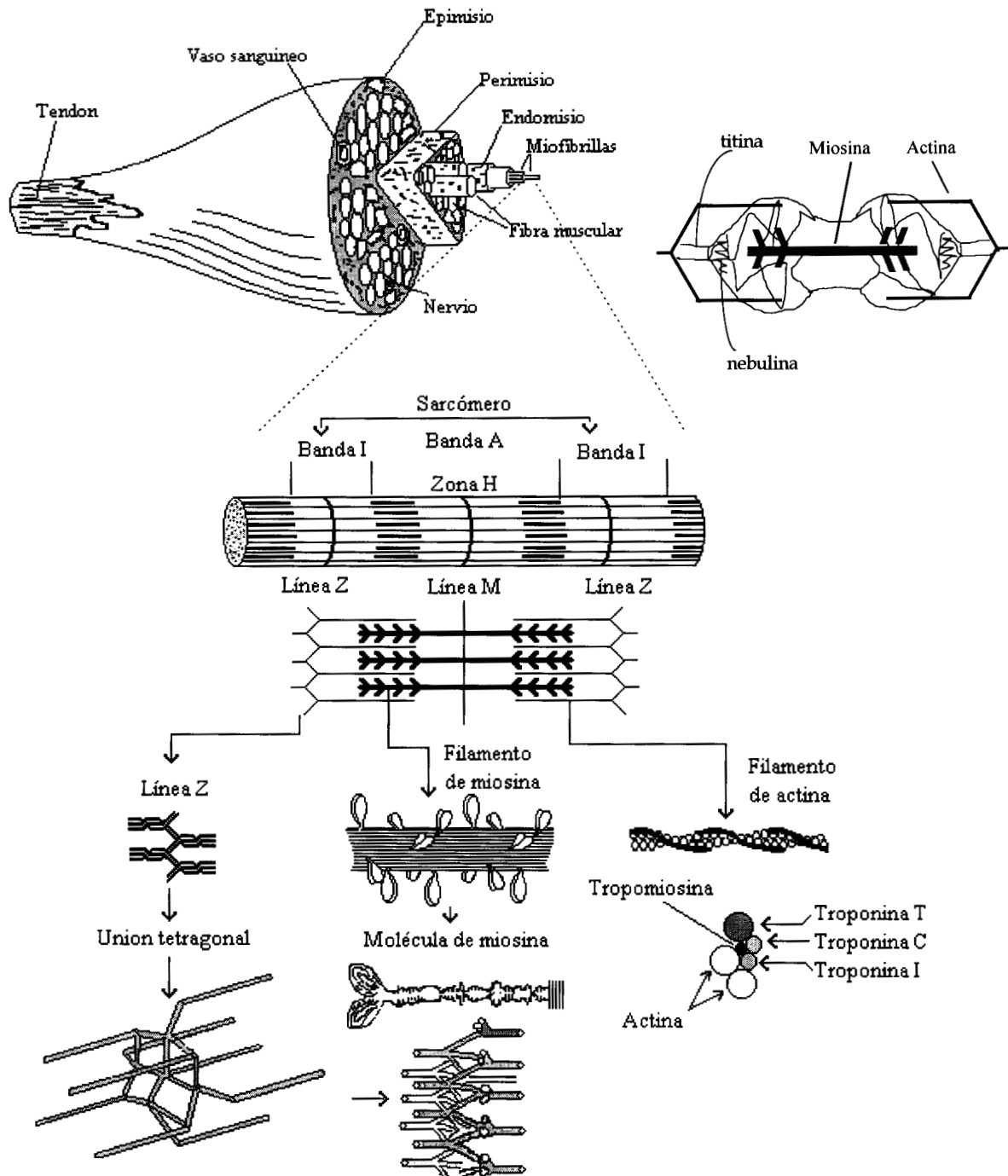
- **Miosina.**

La miosina es la proteína más abundante de las miofibrilares, representa del 94 al 96% de los filamentos gruesos y tiene un peso molecular de cerca de 500 KDa. La digestión selectiva con tripsina y papaína han permitido conseguir amplia información sobre la estructura de su molécula, que está formada por una larga varilla de cadenas polipéptidas en configuración  $\alpha$ -helicoidal con dos cabezas globulares en su extremo final (Briskey y Fukazawa, 1971). La digestión da dos fracciones, una fracción de cola que recibe el nombre de meromiosina ligera (LMM), con un peso molecular del orden de 150 KDa, y el resto formado por parte de cola y una cabeza globular, denominada meromiosina pesada (HMM), de peso molecular del orden de 350 KDa. El tratamiento de la HMM con papaína origina dos subunidades denominadas HMM S-1, fracción globular y HMM S-2, fracción helicoidal (Briskey y Fukazawa, 1971; Asghar y Pearson, 1980). La miosina tiene un alto contenido de ácido aspártico y de glutámico, y en aminoácidos dibásicos los cuales le confieren una carga eléctrica elevada a la molécula. Se destaca la ausencia de cistina en la molécula de miosina (Flores y Bermell, 1984).

- **Proteínas reguladoras.**

Dentro de la proteínas reguladoras se encuentra la proteína C. Es una cadena polipeptídica simple, con bajo contenido de  $\alpha$ -helicoidal, con un peso molecular del orden de 140 KDa. Estas cadenas forman anillos alrededor de los filamentos gruesos, de forma análoga a los aros de un barril, y aunque su función no está clara, parece ser que mantienen unidos los filamentos gruesos durante el desarrollo de la tensión muscular, posiblemente también controlan o regulan el mecanismo de entrecruzamiento de los filamentos gruesos y delgados durante el fenómeno de la contracción muscular (Offer y col., 1973). Su contenido de prolina es alto en comparación con otras proteínas miofibrilares.

Figura 1. Estructura de la miofibrilla.



En el centro del sarcómero se localiza una región estructural de las miofibrillas, denominada línea M, cuya función parece ser que consiste en mantener la ordenación de los

filamentos gruesos durante el acortamiento del sarcómero en el proceso de contracción muscular y que tiene un peso molecular de 160 KDa. Estudios de microscopía electrónica indican que la línea M está constituida por dos tipos de componentes, los filamentos M, que son paralelos a la miofibrilla, y los puentes M, tangentes a la misma, que conectan con los filamentos de miosina. Estos filamentos parece ser que están constituidos por dos tipos de proteínas la  $M\alpha$  (peso molecular de 193 KDa), y  $M\beta$  (peso molecular 183 KDa), las cuales existen en la relación 2:3 en la línea M. En su composición de aminoácidos destaca el número importante de residuos de triptófano (Porzio y col., 1979).

### 3.3.1.2 Filamentos delgados.

Los filamentos delgados están constituidos básicamente por actina F (actina fibrosa), polipéptido formado por polimerización de monómeros globulares de actina G (actina globular). Dos cadenas de actina F se unen entre sí en forma helicoidal, dando lugar al filamento delgado que contiene de 500 a 600 monómeros. La actina es la segunda proteína más abundante de las proteínas miofibrilares y constituye cerca del 60 % de los filamentos delgados. El peso molecular de la actina G es del orden de 50 KDa. La actina tiene un alto contenido de prolina lo que, por su grupo imino (=N-H), facilita el plegamiento de las cadenas, dando lugar a la formación de una molécula globular. Destacan los contenidos de glutámico, aspártico, alanina, treonina y glicina (Flores y Bermell, 1984).

#### • Proteínas reguladoras.

La tropomiosina representa del orden del 5% de las proteínas miofibrilares y tiene un peso molecular de 68 KDa, está compuesta por dos cadenas polipéptidas  $\alpha$ -tropomiosina y  $\beta$ -tropomiosina que se enrollan helicoidalmente de forma análoga a la LMM (Ashar y Pearson, 1980). Esta cadena se sitúa a lo largo lo largo de los filamentos de actina (Figura 1) confiriéndole estabilidad mecánica. Su composición en aminoácidos es muy similar a la miosina, caracterizándose por su bajo contenido de histidina y la ausencia de triptófano y prolina, de aquí su forma helicoidal. Otra de las proteínas reguladoras es la troponina, la cual se encuentra unida a la cadena de tropomiosina a intervalos regulares, ésta proteína representa cerca del 5% de las

proteínas miofibrilares, de forma globular oblonga y de peso molecular de 50 y 85 KDa (**Ebashi y col., 1967**). Con respecto a la tropomiosina tiene dos veces más aminoácidos aromáticos y un contenido importante de prolina. La troponina está compuesta por tres fracciones que desempeñan un papel importante en el mecanismo de contracción muscular: las troponinas T, C e I (Figura 1). La troponina T es la que contiene la unión con la tropomiosina, la tropomiosina C une la tropomiosina T con la troponina I y se caracteriza por su capacidad de secuestrar a los iones  $\text{Ca}^{+2}$  (**Putter y Gergely, 1975**).

### 3.3.1.3 Proteínas intermediarias.

Se han llevado a cabo numerosos estudios para conocer la composición y estructura del sarcómero y se menciona la posible existencia de unos filamentos longitudinales que se observan conectando los filamentos gruesos y delgados de un extremo a otro del sarcómero; a éstos filamentos se les ha denominado filamentos T y filamentos S respectivamente. Se piensa que éstos filamentos son la base de la arquitectura de las miofibrillas. Estas proteínas son la titina y la nebulina (**Wang y col., 1979**).

La titina, descubierta por **Wang y col. en 1979**, se encuentra unida a las bandas A-I, línea Z, línea M, banda A y posiblemente a lo largo del sarcómero. A la titina también se le llama conectina, es una proteína muy grande, su peso molecular es de 700-1 000 KDa. Se considera la tercera proteína miofibrilar más abundante y constituye el 10% del total (Figura 1).

La nebulina es otra proteína de alto peso molecular, descubierta por **Wang (1981)** mediante anticuerpos. Este autor reportó un peso molecular de 500 KDa, por otro lado se ha reportado un peso molecular de 800 KDa (**Maruyama, 1985**). La nebulina está localizada en la línea N2 del sarcómero, y representa el 3% de las proteínas miofibrilares (Figura 1). Se dice que la línea N2 es una estructura dentro de la banda I que regula la estructura geométrica de los filamentos delgados. Se ha propuesto que la nebulina y la línea N2 están atadas directamente o indirectamente a los filamentos de actina (**Maruyama, 1985**).

La desmina es una proteína que tiene un peso molecular de 55 KDa, se ha identificado a nivel la línea Z y se extiende transversalmente a través de las fibras musculares formando una red a cada lado de la línea Z, por lo que permite mantener su estructura (**Maruyama, 1985**).

A lado de la desmina se encuentran otras proteínas, la vimetina y la sinemina de las cuales solo se sabe que sus pesos moleculares son de 58 y 220 KDa respectivamente (**Maruyama, 1985**).

Otra proteína que se encuentra en la línea Z es la filamina con un peso molecular de 270 KDa, la cual fue descubierta por **Hartwing y Stossel** en macrófagos (**1975**) y posteriormente **Gomer y Lazarides** (**1981**) (citados por **Maruyama, 1985**), usando técnicas de inmunofluorescencia indirecta, demostraron claramente su presencia en la periferia de la línea Z. A esta proteína se le conoce como ABP (Actin Binding Protein) debido a que puede unir o ligar arriba de 14 monómeros de actina dentro del filamento de actina. A una fuerza iónica fisiológica, la ABP existe como un dímero de 540 KDa.

### 3.3.2 Métodos de extracción y purificación de proteínas miofibrilares.

Las proteínas del músculo se han clasifica de diferentes formas dependiendo de su forma, de acuerdo a su distribución en el músculo o dependiendo de su origen y solubilidad. Esta última clasificación es la más generalizada, y se usa fundamentalmente para la extracción y posterior estudio de las proteínas. De esta forma se diferencian tres grupos: las proteínas sarcoplásmicas, que son solubles en agua y soluciones salinas diluídas; las miofibrilares, solubles en soluciones salinas concentradas, y por ultimo las proteínas del tejido conjuntivo o residuos insolubles (estroma) las cuales son solubles en urea (**Flores y Bermell, 1984**).

La extracción de proteínas miofibrilares es necesaria para su posterior estudio, y como paso fundamental en las primeras etapas en el aislamiento de actomiosina, miosina, actina y otras proteínas miofibrilares. Los métodos de extracción de proteínas miofibrilares se basan tradicionalmente en una homogenización del músculo y centrifugaciones diferenciales repetidas y lavados en un amortiguador adecuado (**Harbitz y col., 1982**).

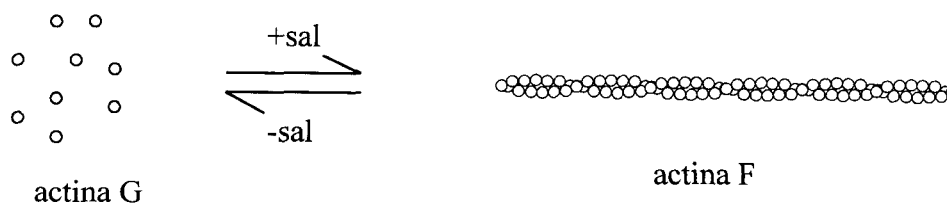
La extracción de actomiosina, la cual esta constituida por miosina, actina, troponina, tropomiosina y otras proteínas miofibrilares (**Suzuki, 1981**, citado por **Cofrades, 1994**), se ha llevado a cabo mediante lavados del tejido muscular con una solución amortiguador de fosfatos a pH 7.0 para eliminar las proteínas sarcoplásmicas y posterior extracción de la actomiosina mediante una solución de alta fuerza iónica (NaCl 0.8 M en fosfatos pH 7.5) (**Cofrades, 1994**). Cabe señalar que para esta extracción se empleó en carne en estado post-rigor, en el cual las proteínas mayoritarias, miosina y actina, se encuentran formando el complejo actomiosina.

La miosina, por hidrólisis del ATP, provee la energía necesaria para la contracción muscular. Por esta razón, y dada su importancia en al funcionalidad de las proteínas miofibrilares en la tecnología de productos cárnicos, esta proteína ha sido centro de estudio por diferentes grupos de investigación. Su extracción y posterior purificación son esenciales para tener conocimiento de ella. Se han reportado varios métodos para este fin, uno de los primeros fue el propuesto por **Perry (1955)**, en el cual la extracción se realiza modificando el pH y la fuerza iónica en cada etapa de la purificación, eliminando la actomiosina mediante la disminución de la fuerza iónica a 0.3 y pH 6. Este método no asegura que la preparación de miosina no contenga trazas de proteínas contaminantes tales como proteínas reguladoras y actina, sin embargo asegura la eliminación de actomiosina. Posteriormente **Margossian y Lowey (1982)** propusieron una metodología basada en la anterior, en donde modificando los tiempos de extracción reducen la contaminación por actomiosina y actina, y al final realizaron una purificación de la miosina mediante cromatografía de intercambio iónico empleando una columna de DEAE-Sephadex A-50, en donde mediante un gradiente de KCl separan trazas de actina y proteína C. Estos investigadores también proponen una purificación por cromatografía en DEAE-celulosa usando pirofosfatos como amortiguador. Otro método, que es reportado como rápido y simple, mediante el cual se puede obtener una miosina de alta pureza es el propuesto por **Martone y col. (1986)**, empleando como material de trabajo tejido muscular de especies marinas en estado post-rigor, éste consiste en un lavado del músculo de pescado con solución de KCl 0.1 M y una extracción de la miosina con KCl 0.45 M conteniendo ATP, y posteriores etapas de precipitación y resuspensión por cambios de la fuerza iónica, se reporta una pureza del 95 %.



En los inicios de la purificación de actina, esta fue separada como una proteína viscosa de un preparado de actomiosina. Trabajos subsecuentes (**Straub, 1943**; citado por **Parde y Spudich, 1982**) revelaron que la actina podía ser obtenida en un estado no viscoso (actina G, forma monomérica) por extracción del músculo con un amortiguador de baja fuerza iónica, y que la adición de sal inducía la conversión a una forma viscosa llamada actina F que es la forma polimerizada (Figura 2) (**Pardee y Spudich, 1982**). Un mejoramiento al procedimiento de extracción fue la incorporación de una etapa desnaturalizante de proteínas inestables en el complejo de actomiosina mediante la deshidratación del tejido muscular con acetona antes de la etapa de extracción de actina, obteniendo un polvo muscular estable por meses a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Era evidente que la extracción de actina por estos métodos clásicos contenían una cantidad significativa de proteínas musculares contaminantes asociadas a la actomiosina, tales como tropomiosina y  $\alpha$ -actinina, las cuales afectaban las propiedades físicas de los filamentos en solución. Por lo cual **Spudich y Watt (1971)** (citados por **Pardee y Spudich, 1982**) idearon una modificación al método resultando una banda en geles de poliacrilamida-SDS. Esta consistió, una vez extraída la actina del polvo muscular en estado polimerizado, en que la preparación se somete a un aumento de la fuerza iónica hasta  $0.6\text{ M}$  de KCl e incubando  $30\text{ min}$  con agitación lenta para solubilizar las proteínas contaminantes. El inconveniente de esta etapa es que a concentraciones por arriba de  $0.15\text{ M}$  incrementa la concentración de actina monomérica, por lo tanto se obtiene una baja producción de actina, pero con un grado de pureza mayor. De esta forma se ideó un método general, el cual se usa ampliamente para la obtención de actina muscular.

Figura 2. Polimerización y despolimerización de actina.



### 3.4 Acción de bacterias proteolíticas sobre las proteínas miofibrilares.

En la Tabla 2 se presentan los datos de algunas de las proteínas de la carne sobre las cuales se ha estudiado la acción de bacterias de descomposición a bajas temperaturas. De estas, únicamente en la tropomiosina se ha demostrado la degradación por bacterias bajo condiciones de descomposición natural (**Dainty y col., 1975**). Varios investigadores notaron efectos sobre las proteínas miofibrilares cuando se emplearon cultivos puros de *pseudomonas*. (**Borton y col., 1970; Tarrant y col., 1971; Dainty y col., 1975**). **Tarrant y col. (1973)** reportaron que una enzima parcialmente purificada de *P. fragi* fue capaz de degradar varios de los componentes miofibrilares como también afectar la pérdida del material de la línea Z de la miofibrilla. Sorprendentemente, la enzima fue menos efectiva sobre las proteínas sarcoplásmicas, menos complejas, que sobre las miofibrillas más complejas. **Dainty y col. (1975)** reportaron la desintegración de bandas electroforéticas de proteínas incluyendo miosina, actinina, actina, troponina T, I y C, y tropomiosina al inocular un cultivo puro de *Pseudomonas* spp. en carne de res, sin embargo encontraron que una flora mixta de descomposición provocó pocos cambios en estas proteínas después de 18 días de almacenamiento a 5°C.

En un intento para determinar que efecto tenían las bacterias de descomposición sobre el rompimiento de las actomiosina, **Jay y Shelef (1976)** extrajeron esta proteína de carne de res en rigor y efectuaron una purificación parcial de la misma por precipitaciones repetidas. Se pudo observar que las *Pseudomonas* spp. ocasionaban degradación marcada en la actomiosina, llegando hasta una destrucción del 82% de esta proteína por algunas cepas.

Con respecto a las proteínas sarcoplásmicas, el número de la bandas electroforéticas se redujo después de 27 días a 7°C (**Jay, 1966**) (Tabla 2). Por otro lado, **Dainty y col. (1975)** encontraron que una flora mixta de descomposición no tuvo efecto sobre diversos compuestos sarcoplásmicos identificables mientras que una cepa de *Pseudomonas* destruyó las bandas del gel de electroforesis de algunos de los componentes.

Tabla 2. Efecto de bacterias sobre constituyentes específicos de carne (Jay y Shelef, 1976).

Constituyentes	Efecto	Días de exposición / temp (°C)	Técnica de determinación	Organismo	Referencia
Miosina, $\alpha$ -actinina, actina, troponina C, I, T	No afectada	18 / 5	Electroforesis en gel	Flora mixta	Dainty y col. (1975)
Tropomiosina	Destruída	18 / 5	Electroforesis en gel	Flora mixta	Dainty y col. (1975)
$\alpha$ -actinina, troponina T, tropomiosina.	Destruída	9 / 5	Electroforesis en gel	<i>Pseudomonas</i> MR 175	Dainty y col. (1975)
Extractos en 0.6 M de músculo LD <sup>a</sup> de porcino	Bandas sin cambio	20 / 2, 10	Geles de almidón-urea y discos-urea	<i>P. cerevisiae</i> <i>L. mesenteroides</i> <i>M. luteus</i>	Borton y col. (1970)
Extractos en 0.6 M de músculo LD de porcino	Algunas bandas destruidas	20 / 2, 10	Geles de almidón-urea y discos-urea	<i>Pseudomonas fragi</i>	Tarrant y col. (1971) Borton y col. (1970)
Fracción sarcoplasmica de res	Reducidas cuantitativamente	27 / 7	Biuret/densidad óptica	Flora mixta	Jay (1966)
Banda A e I, zona H, línea N de miofibrilares de res	Destruídas	10 / 6	Microscopía electrónica	Flora mixta	Walker (1968)
Línea Z de miofibrilares de res	No afectadas	21 / 6	Microscopía electrónica	Flora mixta	Walker (1968)
Aminoácidos libres y nucleótidos de res	Consumidos	15 / 7	Cromatografía en papel	Flora mixta	Jay y Kontou (1967)

<sup>a</sup> *Longissimus dorsi*.

Hay pocos datos sobre la hidrólisis evidente de proteínas del estroma los cuales se derivan de los resultados obtenidos con *Pseudomonas* y *Achromobacter* spp. La acción de estos microorganismos disminuyó la cantidad extraída de proteína del estroma en carne de inoculada (Ockerman y col., 1969). Esto hace suponer que la reducción de proteína sea debida a la actividad de la elastasa, ya que se conoce que las pseudomonas sintetizan esta enzima (Ockerman y col., 1969). Por otro lado, se ha reportado que las pseudomonas pueden elaborar una colagenasa extracelular con un potencial de rompimiento en residuos hidroxiprolina terminal, aminoácido de las proteínas del estroma (Greer, 1989). Yada y Skura (1981) al inocular músculo de bovino después de 12 días de almacenamiento a 4°C encontraron que las proteinasas catalizaban el rompimiento completo de proteínas solubles en urea.

Hay también una falta de información del destino de los lípidos en carnes descompuestas. Se cree que éstos sufren cambios hidrolíticos y oxidativos y que el primero puede ser debido a la

acción bacteriana dado que las pseudomonas son buenos productores de lipasas bacterianas. Algunos de los efectos aparentes de los organismos de descomposición sobre lípidos han sido discutidos por **Pearson (1968)**, y confirmado por **Bala y col. (1979)**, quienes reportaron que las proteasas y lipasas de *P. fragi* tienen un efecto perjudicial sobre el color y estabilidad de lípidos y proteínas de la carne de res almacenada a 4°C, mientras que a 21°C solo tiene efecto sobre el color y la estabilidad de proteínas.

### **3.5 Hidratación de las proteínas de la carne durante la descomposición.**

Además de los compuestos malolientes que son asociados a la descomposición refrigerada de las carnes frescas, el cambio más dramático que ocurre en este período es el aumento en la capacidad de hidratación de las proteínas. Este aumento puede ser medido por los siguientes métodos: volumen del extracto liberado (VEL); el método de presión del papel filtro para determinar la capacidad de ligar agua; medición de la viscosidad de los homogeneizados cárnicos o usando la técnica de hidratación de carne (**Jay y Shelef, 1976**). Estos métodos han sido correlacionados con la población bacteriana como medio de aseguramiento de la calidad microbiana de res (**Shelef y Jay, 1969a**, citado por **Jay y Shelef, 1976**). Mientras el aumento de la hidratación está relacionada al aumento concomitante del pH de carnes descompuestas, esto no puede ser adscrito únicamente al propio aumento del pH. Estas relaciones han sido discutidas por **Shelef (1974)**.

El aumento en la capacidad de hidratación que acompaña el crecimiento y actividad de la flora de descomposición a bajas temperaturas se relaciona con el poco rompimiento de las proteínas estructurales por bacterias de descomposición. Si se emplea la técnica de VEL para medir los cambios en la capacidad de hidratación como de carne en descomposición en condiciones de refrigeración, los volúmenes inicialmente altos de extracto (alrededor de 40 ml), disminuye a 0 al aumenta la población bacteriana hasta alrededor de  $10^6$  a  $10^{10}$ /g en un período de 10-14 días. Si se usan cultivos puros de bacterias, mejores productoras de proteasas, y se incuban a temperaturas óptimas de crecimiento, el aumento en la capacidad de hidratación (o disminución

de VEL) es mínimo. *Clostridium perfringens* causa un aumento en VEL cuando se inocula en carne fresca de puerco e incubada a 10°C (Miller y Price, 1971). Este microorganismo lleva a cabo una hidrólisis completa de las proteínas de la carne y la subsecuente licuefacción de las carnes frescas si se incuban a 30 °C o más.

Entre los estudios hechos para tener un mejor entendimiento de los mecanismos por los cuales las bacterias de descomposición conllevan el aumento en la capacidad de hidratación de las proteínas cárnicas se encuentra el de Shelef y Jay (1969a) (citado por Jay y Shelef, 1976) que reportaron que empleando urea 5 M en buffer fosfatos pH 5.8 reduce la VEL de res de 48 ml a 0, en la consecuente ausencia total de crecimiento microbiano. El VEL puede disminuirse por la adición de CaCl<sub>2</sub> o proteasas tales como papaína. Hamm (1960) reportó que tales agentes disminuyen la cohesión entre las moléculas adyacentes resultando una matriz agrandada con un consecuente aumento en la hidratación o agua ligada. Los análisis adicionales de carnes descompuestas en nuestro laboratorio revelaron la existencia de grandes cantidades de aminoazúcares y polímeros conteniendo aminoazúcares que podrían ser encontrados en carnes frescas. La habilidad de éstos compuestos para aumentar la hidratación cuando se añaden a carnes frescas ya fue reportado por Shelef y Jay (1969b) (citado por Jay y Shelef, 1976).

## 4. Materiales y Métodos.

El trabajo experimental se dividió en las siguientes etapas:

- Selección de cepas proteolíticas de *Pseudomonas* spp.
- Obtención de los extractos enzimáticos.
- Separación de proteasas en los extractos enzimáticos y determinación de sus pesos moleculares.
- Obtención de las fracciones protéicas: actomiosina, miosina y actina.
- Acción de los extractos enzimáticos sobre las diferentes fracciones protéicas.
  - a) Acción sobre proteínas de bajo peso molecular (< 200 KDa).
  - b) Acción sobre proteínas de alto peso molecular (> 200 KDa).

### 4.1 Selección de cepas de *Pseudomonas* spp.

Para la selección de cepas productoras de proteasas se montaron 2 técnicas sencillas y de rápida identificación en medio sólido, un medio de gelatina (**Frazier, 1926; Mac, 1993**) al cual se le adicionó 1.2 % de agar de la formulación original para evitar la licuefacción de la gelatina a temperatura ambiente, y un medio de caseína (**Smith y col., 1952; Molin y Ternström, 1982**) al cual se le redujo el porcentaje de leche en polvo al 10 %. Estos métodos se fundamentan en el degradación de la proteína por acción de las proteasas producidas por microorganismos proteolíticos.

La selección de las cepas de *Pseudomonas* spp. a emplear para la producción de proteasas se hizo a partir de 2 cepas de colección, *P. fragi* (ATCC-4973), *P. fluorescens* (NRRL-B-1244) obtenidas del cepario del CINVESTAV, D. F. y 4 cepas aisladas en el laboratorio. Estas últimas cepas se aislaron de carne de res. Fueron capaces de crecer a 4°C, dieron prueba positiva tanto de licuefacción de gelatina, de proteólisis de caseína y de oxidasa así como la prueba de fermentación negativa. Estas cepas fueron etiquetadas con un número C61, C79, C68 y C20.

Se sembraron por estría cruzada en medio TSA (ANEXO) y se incubaron por 48 h a 25 °C, una colonia aislada de cada cepa se resembraron en medio F (ANEXO) se incubaron a las mismas condiciones; se seleccionó una colonia aislada de cada caja y se procedió a realizar las pruebas de producción de proteasas. Las colonia seleccionada de las diferentes cepas, se inoculó en cajas de medio gelatina y medio caseína por triplicado de la siguiente manera: con ayuda de un palillo de madera despuntado estéril, se tocó la colonia aislada y se inoculó la caja de gelatina; con otro palillo se tocó la misma colonia y se inoculó la caja de caseína por contacto de la superficie en la zona central, sin perforar el gel. Luego de haber inoculado las cajas de gelatina y de caseína se dejaron incubando 48 h a temperatura ambiente. Después de este período de incubación las cajas de gelatina se colocaron en refrigeración por 2 h antes de examinarlas debido a que por encontrarse a temperatura ambiente estas perdían la consistencia del gel, las cajas de caseína, por ser evidente la proteólisis, no se asperjaron con solución de HgCl<sub>2</sub> al 10 % (Molin y Ternström, 1982) ya que se formó un halo claro que traspasaba el grosor del gel. El criterio de evaluación para la selección fue en base al diámetro del halo generado por cada una de las cepas.

## 4.2 Obtención de los extractos enzimáticos.

Los extractos enzimáticos se obtuvieron de *P. fragi*, *P. fluorescens*, C20 y C61.

- **Preparación del inóculo.**

Para la preparación del inóculo, las cepas conservadas en tubo inclinados en medio TSA se inocularon en 100 ml de medio TSB (ANEXO) e incubados a 25°C en agitación a 200 rpm por 24 h.

- **Producción de proteasas.**

La producción de proteasas de las diferentes cepas se llevó a cabo en matraces bafleados de 500 ml que contenían 100 ml de medio TSA (ANEXO) cada uno, los cuales se inocularon con 1 ml (1%) de inóculo con una D. O. = 1 a 660 nm. La D. O. = 1 se obtuvo mediante dilución de una muestra del inóculo obtenida en condiciones estériles, se utilizó medio TSB como diluyente.

- **Producción y purificación parcial de proteasas.**

Los matraces ya inoculados se colocan en una plancha de agitación a velocidad baja, la producción fue a 19°C durante 48 h. Posteriormente la fracción celular se separó por centrifugación en 2 etapas, primero a 16 300 g por 15 min a 4°C en frascos de 250 ml en una centrifuga Beckman mod. J2-MI (Palo Alto, CA) utilizando un rotor JA-14, el sobrenadante se sometió a una segunda etapa de centrifugación a 29 800 g por 15 min a 4°C para eliminar partículas pequeñas. El sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana Millipore (Bedford, MA) de 0.45 µm. Solo el caldo obtenido de la producción de *P fluorescens* no se filtró, ya que este microorganismo produce un polímero que satura los poros de la membrana, este polímero no precipita durante la centrifugación. La precipitación de las proteasas de los diferentes caldos se llevo a cabo en matraces de 1 litro con agitación y en baño de hielo. La cantidad de sulfato de amonio para saturar al 65 % se calculó en base al volumen obtenido después de filtrar. La disolución de la sal se realizó adicionando lentamente ésta al caldo con agitación, esto para evitar la formación de espuma y de zonas de alta saturación. Al final de la saturación se observó la formación de precipitados, en el caso de *P fluorescens* se tuvo la formación de un precipitado gomoso. Una vez finalizada la saturación, los caldos se almacenaron en refrigeración por 24 h para alcanzar el equilibrio. Posteriormente se centrifugaron a 16 300 g por 15 min en frascos de 250 ml (rotor JA-14), el sobrenadante obtenido se descartó y el precipitado se resuspendió con un volumen mínimo de amortiguador tris-HCl 50 mM, KCl 0.1 M a pH final de 7.5. Una vez solubilizado el precipitado se prosiguió a dializar por 24 h contra un amortiguador Tris-HCl 50 mM, KCl 0.6 M a pH 7.5 con dos recambios. Se llevó a cabo la diálisis contra este amortiguador ya que las fracciones miofibrilares fueron resuspendidas y dializadas contra el mismo amortiguador. Posteriormente los extractos se centrifugaron (rotor JA-20) a 29 800 g por 15 min para obtener un extracto clarificado.

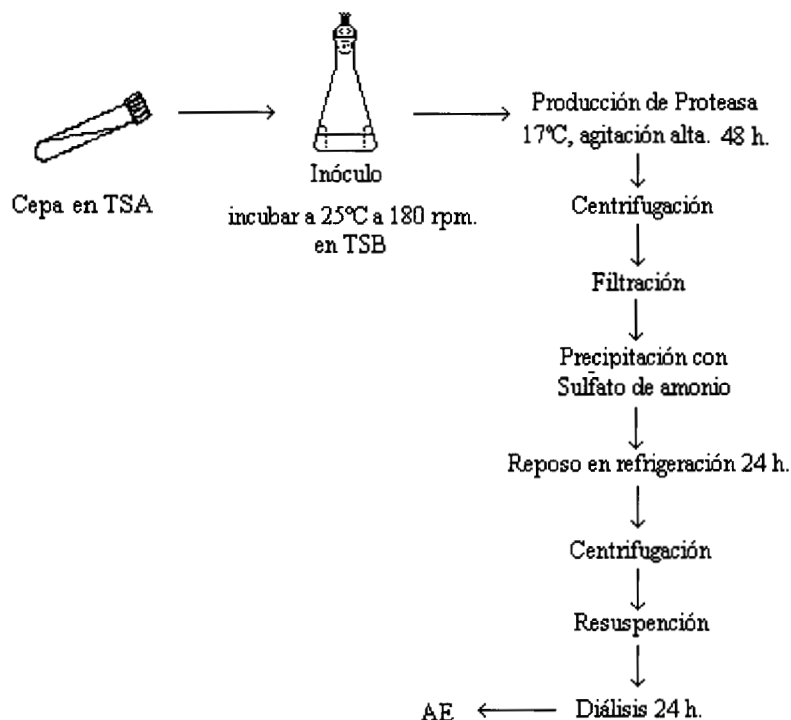
A los extractos obtenidos se les determinó las actividad proteolítica utilizando como sustrato caseína al 1 % con CaCl<sub>2</sub> 2 mM en amortiguador fosfatos de sodio 50 mM pH 7.5 (Kunitz, 1947), baño con temperatura controlada a 37 °C durante 1h. La reacción se detuvo con ácido tricloroacético 5 % y se centrifugó a 2 500 g por 10 min a 4 °C (rotor JA-14) para eliminar la proteína insoluble en ácido. El producto resultante de la hidrólisis se monitoreo por medio de una



curva patrón de tirosina en un espectrofotómetro Beckman DU-650 (Fullerton, CA). Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima la cual liberó 1  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de tirosina por minuto a 37 °C en una mezcla de reacción de 2.5 ml ( $\mu\text{g}$  de Tyr/min ml). Para preparar los extractos enzimáticos, que se emplearon para las cinéticas de acción sobre las fracciones miofibrilares, se tuvieron que realizar diluciones para estandarizar las unidades por ml de los diferentes extractos.

La Figura 3 esquematiza el diagrama de flujo de producción y purificación parcial de proteasas de *Pseudomonas spp.*

Figura 3. Diagrama de flujo de producción y purificación parcial de proteasas.



### **4.3 Separación de proteasas en los extractos enzimáticos y determinación de sus pesos moleculares.**

Para determinar cuantas proteasas había en los extractos enzimáticos y sus pesos moleculares, se empleó el método descrito por **García-Carreño y col. (1993)**.

Los extractos obtenidos después de concentrar con sulfato de amonio y determinarles su actividad fueron preparados para electroforesis. La muestra se diluyó 1:4 con amortiguador muestra sin  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -MCE). Se prepararon geles discontinuos verticales de 8 X 10 X 0.07 cm, de 12 % de acrilamida para el gel de separación y de 4 % para el gel de concentración, se empleó un equipo de electroforesis Mini-Protean II Slab cell de Bio-Rad (Reichmond, CA). No se aplicó ningún tratamiento térmico previo a las muestras. Se inyectó un volumen de 15  $\mu$ l de cada muestra y 10  $\mu$ l del marcador de pesos moleculares. El análisis se llevó a cabo a corriente constante de 15 mA por gel, aproximadamente por 2 h. Para mantener la temperatura baja, la cámara se colocó en el interior de un refrigerador a una temperatura de 4°C. Después del análisis los geles se desmontaron y se sumergieron en una solución de caseína al 2 % en amortiguador tris-HCl 50 mM pH 7.5 previamente enfriada, donde se mantuvieron por un período de 30 minutos a 4°C permitiendo la difusión de la caseína al interior del gel, posteriormente se elevó la temperatura a 30°C para aumentar la actividad de las proteasas. Este período de incubación se extendió hasta 2 h con buenos resultados ya que a 90 minutos, tiempo que originalmente se empleó, las bandas no tenían buena definición y a las 3 h hay pérdida de agudeza y difusión o barrido de las zonas bioactivas.

Los geles se enjuagaron con agua destilada para eliminar el exceso de sustrato y en un solo paso se fijaron y tñieron con una solución de azul de Coomassie R-250 0.1 % durante 2 h, se destñieron durante 1 h con la solución de metanol 40 %-ácido acético 10 %. Este tiempo de revelado fue el necesario para obtener un buen contraste de las zonas bioactivas.

Una vez revelados los geles se colocaron en agua destilada para evitar que se siguieran destiñendo. Para leerlos por densitometría, los geles fueron colocados entre dos vidrios. Se calcularon los pesos moleculares de las bandas claras con respecto a la curva patrón del Log PM contra  $R_f$ , se empleó un densitómetro Ultrascan XL de Pharmacia LKB (Bromma, Suiza).

## **4.4 Obtención de las fracciones protéicas: actomiosina, miosina y actina.**

### **4.4.1 Preparación tejido muscular.**

Todas las etapas de manipulación de la carne se llevaron a temperatura de 4-8°C.

Se utilizaron cortes de los músculos *Biceps femoral* y *Semimembranoso* con un peso de 2100 g en estado post-rigor, adquiridos en un mercado local. Se eliminó el exceso de grasa y tejido conectivo y se mantuvo en hielo aproximadamente 30 min antes de molerla. La carne ya fría fue troceada y posteriormente molida en un equipo doméstico Braun en intervalos de 5 seg hasta obtener una pasta homogénea. De esta masa de carne se tomaron porciones para la extracción de actomiosina, miosina y actina respectivamente.

### **4.4.2 Extracción de Actomiosina.**

La extracción de actomiosina se realizó con algunas modificaciones de acuerdo al método de **Kawashima y col. (1973)** descrito por **Cofrades (1994)**.

Para la extracción de actomiosina (AM) se emplearon 700 g de carne molida, la cual se mezcló en un vaso de precipitados de 2 l en baño de hielo, con 1500 ml de amortiguador de fosfatos de sodio 50 mM, pH 7.0 con la ayuda de un mezclador Caframo (Wiarion, Ont., Canada) en posición 6 durante 15 min, posteriormente se transfirió a frascos de 250 ml para centrifuga, con 10 ml del mismo amortiguador se enjuagó el vaso y las aspas, combinando ambos extractos. El homogeneizado se centrifugó a 10 000 g por 15 min a 4°C empleando una centrifuga

amortiguadora de fosfato de potasio 60 mM, KCl 1 M, EDTA 25 mM a pH 6.5 y se dializó durante 24 h contra una solución amortiguadora de fosfato de potasio 25 mM con KCl 0.6 M, EDTA 10 mM y DTT 1 mM, pH 6.5

Al dializado se le añadió lentamente un volumen de agua fría igual al utilizado en la resuspensión de la proteína, con el fin de obtener una fuerza iónica de 0.3 y precipitar la actomiosina. Posteriormente se centrifugó a 10 000 g por 10 minutos a 4°C (rotor JA-14) seguido de centrifugación a 28 500 g por 1 h a 4°C (rotor JA-14) para clarificar. El sobrenadante obtenido se diluyó con agua destilada fría hasta obtener una fuerza iónica de 0.04. Se dejó en reposo para precipitar la proteína, la cual se recolectó centrifugando a 9 000 g por 10 minutos a 4°C (rotor JA-14).

El precipitado se resuspendió en un volumen mínimo de la solución amortiguadora de fosfato de potasio 10 mM, KCl 1 M, pH 6.5, después se dializó durante 24 h contra una solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM con KCl 0.6 M, pH 6.5, con 2 recambios para obtener una fuerza iónica de 0.6.

Para disminuir la cantidad de actina contaminante se empleó la siguiente metodología (Ebashi, 1976, modificado por Martone y col., 1986)

La preparación de proteína obtenida se diluyó con 25 volúmenes de NaHCO<sub>3</sub> 1 mM y se dejó en reposo durante 15 minutos, seguido de una centrifugación a 12 000 g por 10 minutos (rotor JA-14). El precipitado obtenido se resuspendió en 5 volúmenes de la solución de KCl 0.5 M, β-MCE 5 mM, amortiguador Tris-HCl pH 7.5. Posteriormente se diluyó con 3 volúmenes de NaHCO<sub>3</sub> 1 mM y se añadió MgCl<sub>2</sub> hasta una concentración final de 10 mM. La proteína precipitada se recolectó por centrifugación a 22 000 g por 15 minutos a 4°C (rotor JA-14). El precipitado se resuspendió con 5 volúmenes de la solución de KCl 0.5 M, β-MCE 5 mM, amortiguador Tris-HCl pH 7.5, el cual se dializó durante 24 h contra una solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM con KCl 0.6 M, pH 6.5, con 2 recambios para alcanzar una fuerza iónica de 0.6. Posteriormente se centrifugó a 10 000 g por 15 min a 4°C (rotor JA-14), se descartó

Beckman J2-MI con rotor JA-14 (Palo Alto, CA). El precipitado obtenido se sometió a dos ciclos de lavado como se describió anteriormente.

El precipitado obtenido se transfirió al vaso de 2 l y se resuspendió con 1 500 ml de NaCl 0.8 M, fosfatos de sodio 50 mM, pH 7.5, con ayuda del mezclador y en baño de hielo, sin generar espuma, durante 2 h. Posteriormente se centrifugó a 10 000 g por 20 minutos (rotor JA-14), el sobrenadante obtenido se traspasó a un vaso de precipitados de 6 y uno 4 l los cuales estaban en un baño de hielo, y se prosiguió a adicionar lentamente 10 l de agua destilada fría y con agitación suave. Pasados 10 minutos de agitación, la solución se dejó en reposo durante la noche permitiendo la formación de un precipitado esponjoso. La capa superior generada fue sifoneada cuidadosamente para no resuspender la nube de proteína precipitada. Posteriormente la proteína se recolectó por centrifugación a 10 000 g por 15 minutos a 4°C (rotor JA-20). El precipitado obtenido se transfirió a un vaso de precipitados, en donde se resuspendió con 1000 ml de una solución amortiguadora de fosfatos de sodio 50 mM, pH 7.5 con NaCl 0.8 M, y se dejó agitando suavemente durante la noche a 4°C con la ayuda de una barra magnética. Posteriormente se centrifugó a 10 000 g por 15 min a 4°C (rotor JA-14), se descartó el precipitado y el sobrenadante se mezcló con glicerol frío hasta obtener una solución al 40%, la suspensión obtenida se repartió en volúmenes de 200 ml en frascos de vidrio y se congelaron a -20°C.

#### **4.4.3 Extracción de Miosina.**

Se llevó a cabo empleando una modificación del método de **Margossian y Lowey (1982)**.

Setecientos gramos de carne molida, se mezcló lentamente con 1500 ml de la solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.15 M, KCL 0.3 M, EDTA 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y pirofosfato de sodio 1 mM, a pH final de 6.5, durante 15-20 minutos. Se centrifugó a 10 000 g por 10 minutos a 4°C (rotor JA-14). El precipitado se descartó y el sobrenadante se diluyó con agua destilada fría, hasta una fuerza iónica de ~ 0.04. Se dejó precipitar la proteína en refrigeración durante ~ 3 h. Se sifoneó el sobrenadante y la proteína se recolectó por centrifugación a 10 000 g por 10 minutos a 4 °C (rotor JA-14). La proteína precipitada se resuspendió en una solución

el precipitado y al sobrenadante se le adicionó glicerol frío hasta obtener una solución al 40%, la suspensión obtenida se repartió en volúmenes de 200 ml en frascos de vidrio y se congelaron a -20 °C.

#### **4.4.4 Extracción de Actina.**

Para la extracción de actina se empleó el método descrito por **Pardee y Spudich (1982)**, al cual se le modificaron algunas condiciones. Se realizó en dos etapas, la primera consistió en la obtención del polvo muscular por deshidratación con acetona y en la segunda etapa se extrajo la actina mediante soluciones de baja fuerza iónica.

- **Etapa I. Obtención del polvo muscular.**

Seiscientos gramos de carne molida se sometieron a una primera extracción con agitación durante 10 min en 2 000 ml de la solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.15 M, con KCl 0.1 M, pH 6.5, preenfriado. Todo el extracto se transfirió a frascos de centrifuga de 250 ml y se centrifugó a 10 000 g por 15 min a 4°C en un rotor Beckman JA-14. Estas condiciones de centrifugación fueron usadas durante la obtención del polvo muscular. Posteriormente el precipitado se sujetó a una extracción con agitación por 10 min a 4°C en 2 000 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0.05 M y se centrifugó. El residuo obtenido se resuspendió en 2 000 ml de EDTA 1 mM, pH 7.0 por agitación durante 10 min a 4°C y se centrifugó a 10 000 g por 15 min a 4°C (rotor JA-14). Al precipitado obtenido se le realizaron 2 ciclos de lavado con 4 000 ml de agua destilada fría cada uno, los cuales se llevaron a cabo por agitación durante 5 min a 4°C, posteriormente en cada ciclo se centrifugó a 10 000 g por 15 min a 4°C (rotor JA-14).

Posteriormente el precipitado fue sometido a 5 lavados en un vaso de precipitados de 2 l con 1 000 ml de acetona por 10 min cada uno y se filtró en papel Whatman No 4. Todos los lavados se llevaron a cabo en baño de agua fría para evitar su calentamiento. Los residuos grumosos fueron fraccionados durante la agitación en cada lavado.

**225547**

El residuo obtenido se dejó secando durante la noche en el mismo vaso, esto como resultado de la evaporación de la acetona, y posteriormente se almaceno a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

● **Etapa II. Extracción de Actina.**

Veinte gramos de tejido en polvo se sometieron a dos ciclos de extracción a  $0-0.5^{\circ}\text{C}$  por 30 min en agitación con 250 ml de una solución amortiguadora A (Tris-HCl 2 mM,  $\text{Na}_2\text{ATP}$  0.2 mM, 2-mercaptoetanol 0.5 mM,  $\text{CaCl}_2$  0.2 mM, azida de sodio 0.005%, a pH final de 8.0 a  $25^{\circ}\text{C}$ ) se empleó pirofosfato de sodio 0.5 mM en vez del ATP, después de cada lavado la mezcla se centrifugó. Los dos sobrenadantes se combinaron. Este sobrenadante total se centrifugó a 20,000 g por 1 h a  $4^{\circ}\text{C}$  (rotor JA-14). El sobrenadante obtenido se transfirió, con la ayuda de una pipeta, a un vaso de precipitados, y se prosiguió a realizar la polimerización de la actina a  $4^{\circ}\text{C}$ . Esta etapa se realizó llevando la concentración de KCl a 50 mM, la de  $\text{Mg}^{2+}$  a 2 mM y la de pirofosfato de sodio a 5 mM (como sustituto de ATP). Para esto se midió el volumen del sobrenadante obtenido y con la ayuda de un barra magnética se disolvieron las sales a baja velocidad sin que se generara espuma, la solución se dejó en agitación suave durante la noche. Se observó un incremento de viscosidad de la solución. Pasado el tiempo de polimerización, se prosiguió a lavar la actina con una solución de alta concentración de sal (KCl) para la remoción de tropomiosina. El KCl fué añadido lentamente con agitación suave hasta una concentración de 0.6 M. La solución se dejó agitando por 30 min y se centrifugó en tubos de 50 ml (rotor JA-20) a 48 000 g durante 6.5 h. El sobrenadante se descartó y se adicionaron 2 ml de amortiguador A frío por cada tubo, adicionando en total 50 ml, con la ayuda de una espátula se desprendió el aglomerado y se dejó en reposo durante la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente la mezcla se transfirió, con la ayuda de una micropipeta a una bolsa de diálisis, prosiguiendo a dializar la muestra a  $4^{\circ}\text{C}$  contra 500 ml de amortiguador A frío, realizando 2 recambios durante un tiempo de 3 días con el fin de despolimerizar la actina. La actina dializada se centrifugó a 48 000 g por 3 h a  $4^{\circ}\text{C}$  (rotor JA-20), el sobrenadante obtenido se separó del precipitado utilizando una pipeta pasteur y se le determinó la concentración de actina al sobrenadante obtenido por el método de BCA (**Redinbaugh y Turley, 1986**). La actina se obtuvo como actina G.

## 4.5 Acción de los extractos enzimáticos sobre las diferentes fracciones protéicas.

### 4.5.1 Preparación de las fracciones miofibrilares.

Las fracciones miofibrilares que se utilizaron como sustrato para las cinéticas de hidrólisis fueron preparadas de la siguiente manera:

Las fracciones de actomiosina y miosina que se almacenaron en una solución de glicerol al 40 % a -20°C se diluyeron con 10 volúmenes de agua destilada fría para precipitar la proteína y eliminar el glicerol, posteriormente se centrifugaron a 10 000 g por 10 min (rotor JA-14), la proteína insoluble se resuspendió en Tris-HCl 50 mM, KCl 0.6 M a pH de 7.5 seguido de un dializado contra el mismo amortiguador por 24 h con dos recambios. A la proteína obtenida se le determinó su concentración por el método de BCA (**Redinbaugh y Turley, 1986**), ya que el Tris interfiere en la determinación de la concentración por el reactivo de Biuret (**Gerhardt y Beevers, 1959**).

La actina, ya que fue la última fracción obtenida, solamente se dializó contra el amortiguador y se le determinó la concentración por el mismo método.

### 4.5.2 Electroforesis.

Las muestra de extractos de actomiosina, miosina y actina fueron evaluadas electroforéticamente de acuerdo al método de **Laemmli (1970)**. Se utilizó un gel de separación de 12 % de acrilamida y un gel concentración de 4.0 % de acrilamida. El equipo utilizado fué un Mini-Protean II Slab Cell de Bio-Rad (Reichmond, CA). Se emplearon muestras con una concentración de 6-7 mg/ml y una mezcla de marcadores de alto peso molecular de SIGMA para electroforesis en gel-SDS, con un intervalo de peso molecular entre 30 a 200 KDa. Posteriormente cada uno de los geles fueron colocados entre dos vidrios para ser barridos, utilizando un densitómetro Ultrascan XL de Pharmacia LKB (Bromma, Suiza).



### 4.5.3 Acción sobre proteínas de bajo peso molecular (< 200 KDa). Cinética de hidrólisis.

Para llevar a cabo la acción de los 4 diferentes extractos enzimáticos sobre las 3 fracciones de proteínas en un sistema modelo, se diseñó la siguiente metodología.

Se plantearon las combinaciones que se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Desarrollo experimental para el estudio de la acción de proteasas de *Pseudomonas* spp. sobre proteínas contractiles de bajo peso molecular.

Extracto enzimático (fuente)	Fracción proteica
<i>P. fluorescens</i>	1 → AM.
	2 → Miosina, Actina y prot. reg.
	3 → Actina.
<i>P. fragi</i>	4 → AM.
	5 → Miosina, Actina y prot. reg.
	6 → Actina.
20	7 → AM.
	8 → Miosina, Actina y prot. reg.
	9 → Actina.
61	10 → AM.
	11 → Miosina, Actina y prot. reg.
	12 → Actina.

Por lo tanto se llevaron a cabo un total de 12 combinaciones.

Para cada combinación se programaron un total de 7 tomas de muestra a las 0, 4, 8, 12, 24, 36 y 48 h en cada tiempo se analizó un blanco y dos muestras. La composición de cada tercia se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición de los grupos de muestras analizadas.

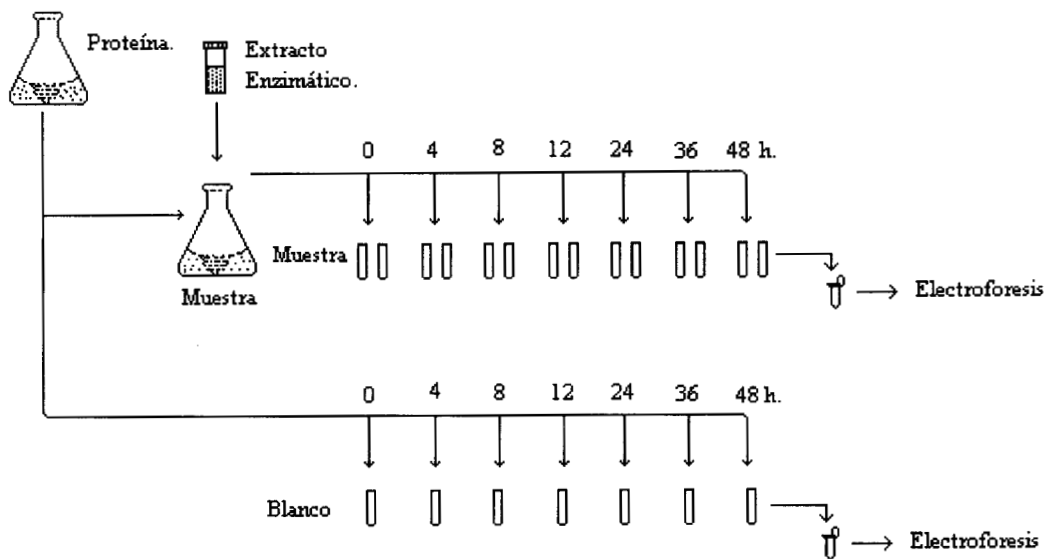
	Vol. de proteína (ml)	Vol. de enzima (ml)
Blanco	1.0	0.0
Muestra	0.9	0.1

Para cada combinación se emplearon un total de 28 tubos de policarbonato (PC) con una capacidad de 6 ml. Para llenar estos tubos, primero se colocó la proteína con concentración conocida en un matraz y con ayuda de una micropipeta se fueron tomando alícuotas de 1 ml para los blancos, en un segundo matraz se colocó la cantidad necesaria de proteína y de enzima para obtener un volumen igual, inmediatamente se distribuyeron las alícuotas en los diferentes tubos muestra. La toma de alícuotas se realizó mientras la solución se encontraba en agitación con la ayuda de una barra magnética y en baño de hielo, el tiempo empezó a contarse en el momento en que se llenaron los tubo de muestra.

Una vez llenados y tapados todos los tubos y el frasco se incubaron a 13°C en un cuarto frío. Para cada tiempo se tomó una muestra para electroforesis del blanco y de las muestras, estas muestras eran de 25 µl diluidos con 100 µl de una solución reductora, se colocaron en viales de 1.5 ml de capacidad, congelados para posterior análisis.

La Figura 4 esquematiza el diseño del experimento, para una sola combinación (blanco y muestras), el mismo procedimiento se siguió para las otras combinaciones.

Figura 4. Esquema del diseño experimental para la acción de extractos enzimáticos sobre fracciones protéicas.



#### 4.5.4 Electroforesis.

Las muestras obtenidas a diferentes tiempos de cada combinación fueron sujetas a electroforesis, para conocer la hidrólisis de las diferentes proteínas. Se llevó a cabo en geles de poliacrilamida-SDS con un gel de separación de 12% y un gel de concentración de 4.0%, el análisis se realizó a un voltaje constante de 200 volts durante 45 minutos, posteriormente los geles se tiñeron y fijaron con una solución de azul de Coomassie al 1% durante 30 minutos seguido de un revelado con una solución de alcohol etílico al 40%-ácido acético al 10% durante 4 h con cuatro recambios de la solución. Cada uno de los geles fueron colocados entre dos vidrios para ser barridos, utilizando un densitómetro Ultrascan XL de Pharmacia LKB (Bromma, Suiza). Para determinar el peso molecular de las diferentes bandas electroforéticas se inyectaron 10  $\mu$ l de una mezcla estándar de alto peso molecular de SIGMA para electroforesis en gel-SDS, con un intervalo de peso molecular entre 30 a 200 KDa.

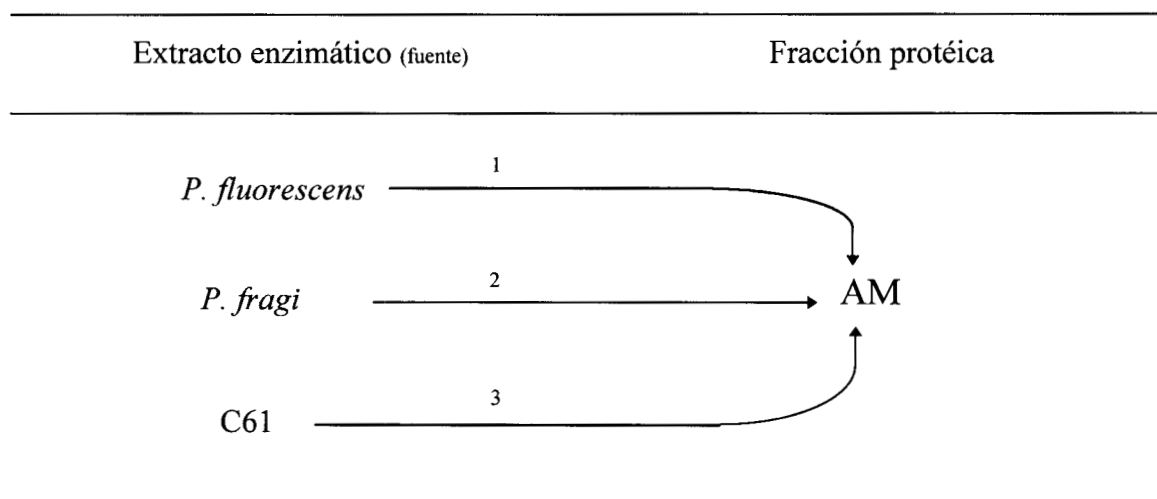
### 4.5.5 Acción sobre proteínas de alto peso molecular (> 200 KDa). Cinética de hidrólisis.

#### ● Obtención de los extractos enzimáticos.

Los extractos enzimáticos se obtuvieron de *P. fragi* (ATCC-4973), *P. fluorescens* (NRRL-B-1244), y C61.

En la Tabla 5 se muestran las 3 combinaciones para la acción enzimática sobre actomiosina.

Tabla 5. Desarrollo experimental para el estudio de la acción de proteasas de *Pseudomonas* spp. sobre proteínas contráctiles de alto peso molecular.



Para cada combinación se llevaron a cabo análisis a los mismos tiempos que la cinética para proteínas de bajo peso molecular, así como la relación de volúmenes de las muestras.

Para cada combinación se emplearon un total de 28 tubos de policarbonato (PC) con una capacidad de 6 ml. Para llenar estos tubos se siguió la misma metodología que con la cinética de proteínas de bajo peso molecular (Sección 4.5.3).

Una vez llenados y tapados todos los tubos y el frasco se incubaron a 13°C en un cuarto frío. Se fue inhibiendo la reacción cumplido el tiempo de acción a los diferentes tiempos y posteriormente se adicionó 0.1 ml de enzima a los testigos.

Para cada tiempo, se tomó una muestra para electroforesis del blanco y de las muestras, se tomaron muestras de 25µl y se diluyeron con 100µl de amortiguador muestra de SIGMA Cross-Linked Phosphorylase b SDS Molecular Weigh Markers (St. Louis, MO), los cuales se colocaron en un vial de 1.5 ml de capacidad. Todos los viales fueron congelados para posterior análisis.

#### **4.5.6 Acción de Calpainas.**

Se llevó a cabo una cinética de hidrólisis por acción de calpainas (enzimas endógenas) en carne. Se sumergieron trozos de carne ( $\approx$  10 g cada uno) en una solución de  $\text{CaCl}_2$  15 mM a 13°C, para mantener la acción de estas enzimas durante el tiempo predeterminado. Una vez cumplido el tiempo de acción, se tomó una muestra de 10 g y se sujetó a extracción de actomiosina como se describió anteriormente (Sección 4.4.2), los diferentes extractos fueron dializados contra Tris-HCl 50 mM, KCl 0.6 M a pH de 7.5 por 24 h, se tomó también una muestra para electroforesis.

#### **4.5.7 Electroforesis.**

Las muestras obtenidas a diferentes tiempos de cada combinación fueron evaluadas por el método de electroforesis de SIGMA para proteínas de alto peso molecular Sigma Tech. Bulletin No. MWS-877X (4-88) (St. Louis, MO), para estudiar la cinética de hidrólisis de las diferentes proteínas.

Se llevó a cabo en geles continuos de poliacrilamida-SDS de 3.5 %, el análisis se realizó a 50 mA por gel, posteriormente los geles se fijaron en una solución de metanol al 40 %-ácido acético al 10 % por 2 hrs, seguido por una etapa de tinción en una solución de azul de Coomassie al 1% durante 2 h seguido de un revelado con una solución de metanol al 40%-ácido acético al 10% durante 4 h con cuatro recambios de la solución. Posteriormente cada uno de los geles fueron

colocados entre dos vidrios para ser barridos, utilizando un densitómetro Ultrascan XL de Pharmacia LKB (Bromma, Suiza). Para determinar el peso molecular de las diferentes bandas electroforéticas se inyectaron 15 µl de un mezcla de marcadores de alto peso molecular de SIGMA para electroforesis en gel-SDS, con un intervalo de peso molecular entre 97.4 y 584.4 KDa.

#### **4.6 Análisis estadístico.**

Los datos de área relativa de cada una de las bandas de proteína, de las diferentes combinaciones, se sometieron a ANOVA con prueba múltiple de Duncan para conocer cual de las cepas de *Pseudomonas* spp. fue más proteolítica, así como también se ajustó a un modelo de regresión lineal múltiple para cada una de las bandas durante el tiempo de hidrólisis. Para estos análisis se empleó el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System).

## 5. Resultados y Discusión.

### 5.1 Selección de cepas proteolíticas.

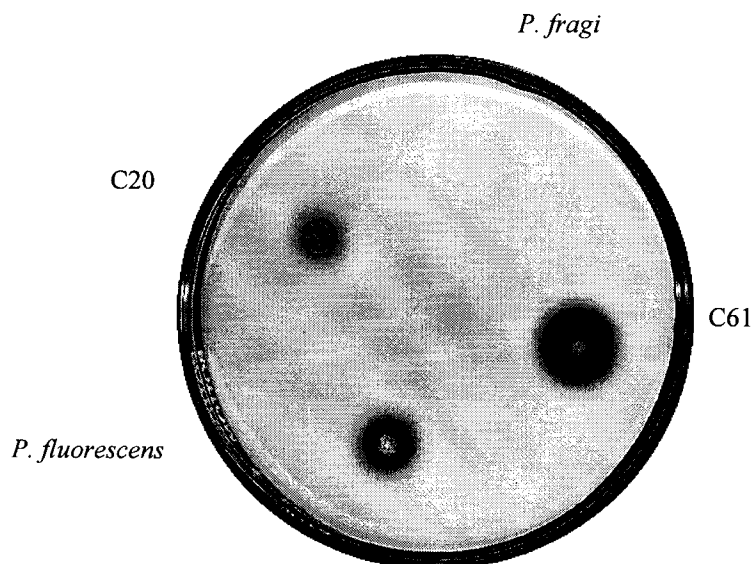
La Tabla 6 muestra los resultados de las pruebas de producción de proteasas de las diferentes cepas en medio de gelatina y medio de caseína.

Tabla 6. Pruebas de proteólisis de *Pseudomonas* spp.

Cepa	Morfología de la colonia	Medio Gelatina	Medio Caseína
<i>P. fragi</i>	Opaca ✓	+	-
<i>P. fluorescens</i>	Opaca ✓ <sup>a</sup>	+++	++
C61	Opaca ✓ <sup>a</sup>	++	+++
C79	Opaca	++	+
C68	Blanca	-	-
C20	Rugosa ✓ <sup>a</sup>	+++	+

<sup>a</sup> Presentaron fluorescencia en medio F.

Figura 5. Degradación de caseína en placa por cepas de *Pseudomonas* spp.



Las cepas seleccionadas para la obtención de los extractos enzimáticos se muestran en negritas (Tabla 6), estas presentaron hidrólisis de medio de grenetina y caseína (Figura 5). La *P. fragi* no presenta hidrólisis en medio de caseína pero sí en medio de gelatina, se sabe que esta cepa produce cambios estructurales sobre proteínas miofibrilares de carne de res y de cerdo (**Bala y col., 1977; Bala y col., 1979; Tarrant y col., 1971; Tarrant y col., 1973**). *P. fluorescens* como microorganismo de comparación y las cepas C61 y C20 ya que dieron pruebas muy semejantes a *P. fluorescens*.

## 5.2 Composición de extractos enzimáticos. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS para sustrato.

Se escogieron los geles de 12 % de acrilamida debido a que la separación de las fracciones fue satisfactoria. En un principio no se llegó a obtener resultados reproducibles, se modificó el tiempo de incubación a 3 h, ya que a un tiempo de incubación de 90 minutos (**García-Carreño y col., 1993**) las zonas bioactivas no fueron muy claras como resultado de una baja actividad. Por lo cual el desarrollo de las zonas bioactivas, por hidrólisis de la caseína, se estandarizó a 2 h dado que, como indica **García-Carreño y col. (1993)**, los períodos prolongados de incubación en la solución de sustrato resulta en una pérdida de agudeza de las zonas bioactivas. Esto se dió debido a que se permite la difusión de la muestra. Este suceso se presentó en gran medida en geles que se incubaron durante 3 h, llegando a formarse otras zonas bioactivas. En la Figura 6 se puede observar este efecto de difusión en todas las muestras, como una estela clara.

Una vez analizadas las muestras, los geles fueron sumergidos en la solución de sustrato a 4°C durante 30 min para permitir la difusión de la caseína al interior del gel y posteriormente se elevó la temperatura a 30°C para incrementar la actividad, se tiñeron y fijaron durante 2 h seguido de un revelado por 1 h, éste tiempo de revelado fue el suficiente para obtener un buen contraste de las zonas bioactivas. Se incluyó  $\text{Ca}^{+2}$  en la solución de sustrato, debido que en experimentos anteriores se observó un incremento en la actividad de los extractos enzimáticos, esta concentración fue de 2 mM. Se probó una concentración de 3 mM pero los geles presentaban un aspecto de granulosidad, esto se debió probablemente por la precipitación de calcio.



Se calculó el peso molecular de las bandas bioactivas por medio de la curva estándar obtenida de graficar el Log del peso molecular contra  $R_f$ , obteniendo un peso molecular para *P. fluorescens* de 46.1 KDa, para la cepa 61 de 46.8, *P. fragi* de 49.2 y una segunda de 34.2 KDa y finalmente de 49.2 KDa para el extracto enzimático de la 20 (Tabla 7). Se ha reportado que la *P. fragi* ATCC 4973 produce una metaloproteasa neutra con un peso molecular entre 40-50 KDa (**Porzio y Pearson, 1975**). Es de llamar la atención que el extracto enzimático obtenido de *P. fragi* presentara dos bandas bioactivas, ya que se ha reportado que esta cepa solo produce una proteasa, lo que permite concluir que durante las etapas de purificación en los estudios reportados con anterioridad se pierde una enzima (34.2 KDa). Cabe aclarar que el extracto que se probó está parcialmente purificado, mientras que los reportados han sido sujetos a un mayor número de pasos de purificación. Por otro lado no se ha encontrado reportes en donde se utilice una técnica similar o igual para determinar la actividad de los extractos enzimáticos en las diferentes etapas de purificación. Por lo cual es necesario llevar a cabo más experimentos en donde se analice la actividad de la enzima en las diferentes etapas de purificación.

Figura 6. Perfiles electroforéticos de zonas bioactivas de los extractos enzimáticos.

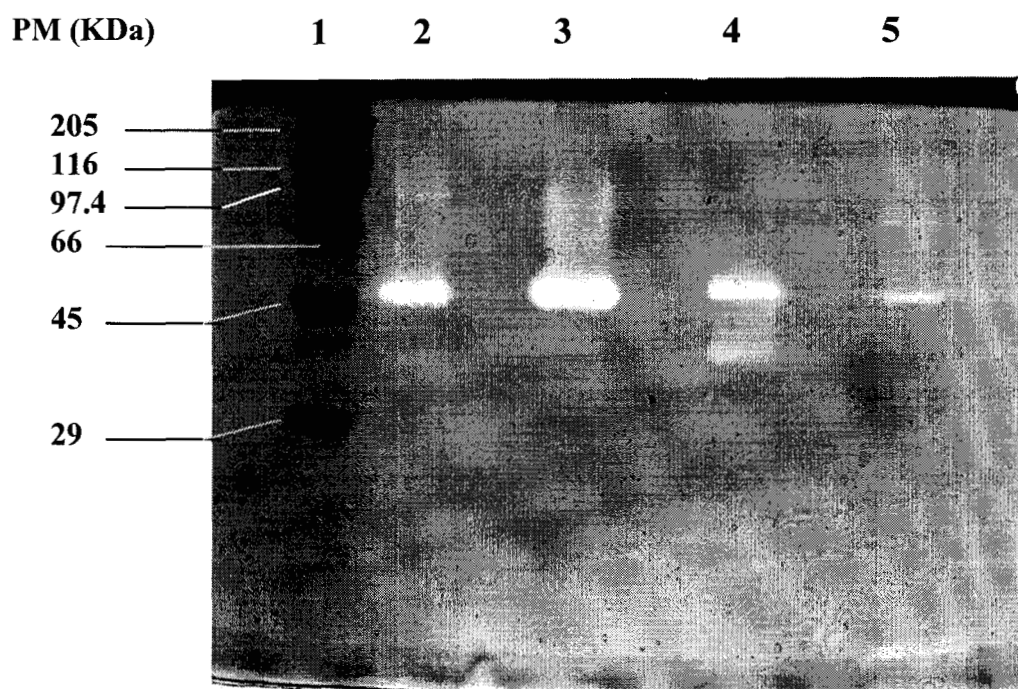


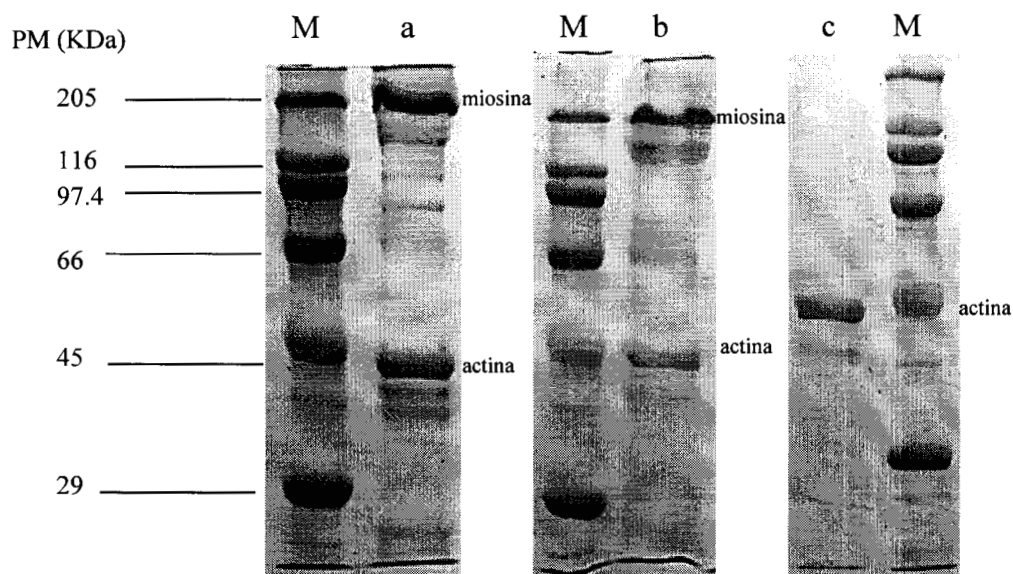
Tabla 7. Pesos moleculares de las proteasas de los extractos enzimáticos.

Carril	Muestra	Peso molecular
1.	Estándar de PM.	205-29 KDa.
2.	Enz. de <i>P. fluorescens</i> .	46.1 KDa.
3.	Enz. de C61.	46.8 KDa.
4.	Enz. de <i>P. fragi</i> .	49.2 y 34.2 KDa.
5.	Enz. de C20.	49.2 KDa.

### 5.3 Extracción de fracciones proteicas.

En la extracción de las fracciones de proteínas miofibrilares, los métodos son prolongados y su éxito se basa en el control tanto de fuerza iónica, pH y temperaturas así como una correcta separación utilizando fuerza de centrifugación. Por otro lado se tiene el beneficio de obtener un preparado que mediante un acondicionamiento previo en una solución al 40 % con glicerol, como es el caso de la actomiosina y miosina, se pueden almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por un prolongado tiempo sin sufrir cambios en su patrón electroforético (Margossian y Lowey, 1982; Ebashi, 1976), el mismo caso de almacenamiento para actina en polvo muscular como lo indica Pardee y Spudich (1982).

Figura 7. Perfiles electroforéticos en geles de poliacrilamida-SDS 12 %: a) actomiosina; b) miosina, actina y proteínas reguladoras; c) actina; M) marcador de peso molecular.



El patrón electroforético de la actomiosina (AM) (Figura 7) muestra una banda de 200 KDa la cual corresponde a la miosina pesada, se observan unas bandas de menor intensidad entre 200 KDa y 45 KDa y entre 45 KDa y 30 KDa las cuales corresponden a proteínas reguladoras, a 45 KDa se obtiene una banda que corresponde a Actina. El patrón electroforético de miosina muestra tanto la banda de miosina como la de actina, esta última en menor intensidad que la obtenida en el

patrón electroforético de actomiosina, con lo que se requieren más lavados para disminuir la actina utilizando fuerzas iónicas bajas durante la extracción. Con respecto al patrón electroforético de la actina obtenida, este mostró una banda a la altura de 45 KDa el cual corresponde a su peso molecular y una segunda banda que corresponde a tropomiosina como contaminante, lo cual indica que el lavado con alta fuerza iónica no fue lo suficiente para eliminarla, por lo que se requerirían más lavados para disminuir su concentración pero obteniendo un menor rendimiento de actina.

Cabe hacer notar que solo el patrón electroforético de miosina mostró bandas adicionales que indican una gran contaminación por actina y menor por parte de proteínas reguladoras.

En la Tabla 8 se muestran la concentración de las diferentes fracciones protéicas y las unidades internacionales por ml ( $\mu\text{g}$  de Tyr/min ml, ver sección 4.2) de los diferentes extractos enzimáticos, utilizados en las cinéticas de hidrólisis para proteínas de bajo peso molecular ( $< 200$  KDa).

Tabla 8. Concentraciones de fracciones miofibrilares y actividad de extractos enzimáticos.

Fracción Protéica.	mg/ml	Extracto Enzimático	U/ml
Actomiosina	4.92	<i>P. fragi</i>	3.92
Miosina	2.90	<i>P. fluorescens</i>	2.83
Actina	2.64	C20	3.52
		C61	5.1

## 5.4 Análisis estadístico.

Las áreas relativas obtenidas por densitometría, para cada componente de las diferentes combinaciones, se sujetaron tanto a ANOVA con prueba múltiples de Duncan, así como también a un modelo de regresión lineal múltiple, se utilizó como herramienta el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System).

En las Tablas 9, 10 y 11 se muestran las agrupaciones de las medias por Duncan así como su media con números más pequeños para cada componente, teniendo como variable controlada la combinación de cada extracto enzimático con las diferentes fracciones protéicas y como variable respuesta el área relativa, obteniendo para cada combinación sus medias. Se obtuvo que para miosina, con un peso molecular entre 267-215 KDa, en la fracción de actomiosina (Tabla 9), a un nivel de significancia de 0.0001, el extracto enzimático de la cepa C61 mostró la menor media indicando que esta enzima tiene una mayor acción sobre esta proteína, seguida por *P. fluorescens* y cepa C20, teniendo al último a la *P. fragi*. En cuanto a la actina, con un peso molecular entre 46-42, los extractos enzimáticos que mayor hidrólisis presentaron fueron *P. fragi* y *P. fluorescens* no así las otras enzimas, sin embargo *P. fluorescens* no presenta diferencia significativa entre los dos grupos.

Para la fracción protéica de miosina, actina y proteínas reguladoras (Tabla 10), la miosina fue degradada en mayor porcentaje por la 61 seguida por *P. fragi*, esta última no tiene diferencia significativa con la C20 y *P. fluorescens*. En cuanto a la actina las enzimas que más acción tuvieron fueron *P. fluorescens*, cepa C61 y C20, colocándose en un segundo grupo a *P. fragi*.

Para la fracción de actina (Tabla 11), no se observó diferencia significativa entre las enzimas, teniéndose la hidrólisis total de esta proteína.

Para conocer la forma en que cada enzima hidrolizó las proteínas de cada fracción protéica, el área relativa de cada banda ( $Ar$ ) con respecto al tiempo se ajustó a un modelo de predicción ( $Ar = \beta_0 + \beta_1 t + \beta_2 t^2 + \varepsilon$ ) (ANEXO: Tabla A, B y C). Se puede observar que en la acción de la

enzima de *P. fragi* y C61 sobre la AM, únicamente la degradación de algunos componentes es explicada por el modelo y en menor grado para *P. fluorescens*, mientras que la cepa C20 presentó un mayor número de componentes que son explicados por el modelo de ajuste (Tabla A). Para la fracción de miosina, actina y proteínas reguladoras fueron pocos los componentes que se ajustaron al modelo (Tabla B), y en cuanto a la fracción de actina (Tabla C) solo uno de los componentes fué explicado por el modelo, los demás no fueron significativos. Esta falta de ajuste del modelo de predicción se debió, por un lado, a que aquellos polipéptidos que se generaron no se presentaron en forma continua durante la cinética de hidrólisis, mostrando una presencia irregular. No así aquellas proteínas que se degradaron o polipéptidos que se generaron con el tiempo y cuya presencia fué continua, por lo menos a tres tiempos consecutivos. Por otro lado, debido a que se utilizó el área relativa para el análisis estadístico, ésta asigna proporciones de porcentaje relativo a cada tiempo, por lo que a los últimos tiempos la presencia de pocos picos con baja concentración les asignó porcentajes relativos altos sin que presentaran una concentración apreciable. Esto se puede observar al comparar los perfiles electroforéticos (principalmente de la fracción de actina, Figura 9) contra los gráficos de barras de la misma fracción protéica que se presentan en la sección de ANEXOS (Figura A la fracción de actomiosina, Figura B la fracción de miosina, actina y proteínas reguladoras y Figura C la fracción de actina).

Tabla 9. ANOVA con prueba múltiple de Duncan para actomiosina.

PM (KDa) Enzima.	267-215 <sup>a</sup>	147-123	118-104	104-97	93-87	76-72	72-68	67-64	61-58	56-52	46-42 <sup>b</sup>	40-39	38-37	35-34
<i>P. fragi</i>	A/20.4	C/16.7	A/1.9	A/3.4	A/7.0	A, B/3.0	A, B/5.7	A/4.7	A/2.7	A/0.9	B/111.1	A/4.1	A/3.8	A/1.4
<i>P. fluorescens</i>	B/14.2	A/35.1	-	A/3.9	C/3.0	B/0.7	A/9.0	A/4.0	-	-	A, B/12.4	A/3.9	A/5.7	A/0.9
61	C/9.37	B/27.1	A/1.3	A/3.4	B, C/4.2	A, B/3.1	B/3.7	A/5.9	A/0.7	A/1.8	A/13.7	A/4.2	A/4.9	-
20	B/14.21	D/4.9	-	A/5.3	A, B/6.7	A/5.9	B/4.6	-	A/2.6	A/1.8	A/14.0	A/3.1	A/3.7	-
P>F	0.0001	0.0001	0.5462	0.3861	0.0001	0.1897	0.045	0.0039	0.1582	0.0084	0.0001	0.0001	0.6682	0.2634

Tabla 10. ANOVA con prueba múltiple de Duncan para miosina, actina y proteínas reguladoras.

PM (KDa) Enzima.	268-176 <sup>a</sup>	151-124	121-111	89-81	73-69	70-66	63-62	60-59	56-52	46-43 <sup>b</sup>	42-39	30-29
<i>P. fragi</i>	C, B/10.3	B/19.5	A/28.5	A/5.9	-	A/11.0	A/3.6	A/8.3	-	A/3.8	A/1.4	A/1.1
<i>P. fluorescens</i>	A/15.2	A, B/23.8	B/8.3	A/3.4	A/1.3	A/5.8	-	A/9.6	A/3.0	B/2.8	A/1.9	A/1.0
61	C/6.9	A/39.0	-	A/7.7	A/10.9	A/5.4	A/10.0	-	A/1.0	B/2.6	-	-
20	A, B/12.2	A, B/24.6	B/5.6	A/6.5	-	A/8.0	-	-	A/1.4	B/2.8	A/2.6	-
P>F	0.0001	0.09	0.0555	0.2907	0.4313	0.1949	0.1977	0.3797	0.032	0.0001	0.0006	0.4121

Tabla 11. ANOVA con prueba múltiple de Duncan para actina.

PM (KDa) Enzima.	47-43 <sup>b</sup>	42-41	41-39	38-36	36-34	34-32	31-30	30-29	29-29
<i>P. fragi</i>	A/21.2	A/5.2	A/6.8	A/5.3	A/4.9	A/6.1	-	A/9.8	A/23.3
<i>P. fluorescens</i>	A/16.5	-	A/6.1	A/4.0	A/2.3	A/5.9	A/5.6	A/3.7	A/7.0
61	A/22.9	A/4.4	A/4.2	A/6.3	A/9.1	A/14.5	A/7.0	-	-
20	A/17.5	-	A/13.5	-	-	A/8.7	A/7.1	A/15.8	A/10.4
P>F	0.0001	0.1444	0.6878	0.5541	0.171	0.1409	0.6604	0.7152	0.5481

<sup>a</sup> Miosina.

<sup>b</sup> Actina.

LIAM-Izt.  
Maestría en biotecnología.  
Ernesto Alanís García.

## 5.5 Perfiles electroforéticos de hidrólisis.

Se obtuvieron los perfiles electroforéticos para cada tiempo de los diferentes combinaciones, los cuales se muestran en los Figuras 8, 9 y 10. Se puede observar tanto la degradación extensiva de todas las proteínas presentes así como la formación de polipéptidos de alto y bajo PM. Se puede observar la formación de polipéptidos con peso molecular entre 147-123 KDa para las cuatro enzimas a medida que pasa el tiempo de acción, teniéndose al mismo tiempo una disminución en la magnitud del pico que corresponde a la miosina pesada, debido a su degradación (Figura 8). Estos polipéptidos se incrementan en las primeras 12 h y posteriormente van disminuyendo como consecuencia de la acción de las enzimas sobre ellos. Estos polipéptidos de alto peso molecular fueron el resultado de la hidrólisis de miosina pesada, del cual se tiene evidencia como lo reporta **Porzio y Pearson (1975)** quienes reportaron la acción de una proteasa neutra de *P. fragi* sobre proteínas miofibrilares, las cuales fueron capaces de hidrolizar la miosina generando tres polipéptidos de alto peso molecular llamados meromiosina pesada, meromiosina ligera y premeromiosina con un rango de peso molecular entre 175-80 KDa. El hecho de que se formen polipéptidos de alto peso molecular indica que los sitios de rompimiento en la cadena pesada de miosina son muy susceptible a la proteólisis de todas las proteasas probadas. Se tienen un gran número de reportes donde se muestran, por diferentes técnicas, la capacidad de la *Pseudomonas* spp., en la degradación de proteínas miofibrilares de músculo de puerco (**Tarrant y col., 1971; Tarrant y col., 1973; Jay y Shelef, 1976 y Borton y col., 1970**) y en músculo de bovino (**Dainty y col., 1975; Jay y Shelef, 1976; Yada y Skura, 1981; Mikami y col., 1983**). Se sabe que las proteasas de *P. fragi* degrada con más eficiencia proteínas purificadas del músculo que las que se encuentran intactas, debido a que las proteínas están más inaccesibles a las enzimas proteolíticas (**Tarrant y col., 1973**).

En cuanto a los perfiles electroforéticos obtenidos para la fracción de miosina, actina y proteínas reguladoras (Figura 9), éstos mostraron un comportamiento similar que los obtenidos sobre actomiosina, la degradación de miosina y actina también se llevó a cabo, teniendo que la cepa C61, produjo a las 4 h la degradación de la miosina en casi su totalidad. Por otro lado, al igual que en la fracción de AM se observó, la formación de un conjunto de polipéptidos de alto peso



molecular (151-124 KDa) que se muestran como un pico con hombros.

En el Figura 10 se muestran los perfiles electroforéticos de la fracción de actina para cada una de las enzimas. Los cuatro extractos enzimáticos degradaron la actina, siendo la cepa C61 la que más rápido actuó sobre ella.

Figura 8. Perfiles electroforéticos de las cinéticas de hidrólisis de proteasas de *P. fragi*, *P. fluorescens*, C61 y C20 sobre la fracción de actomiosina.

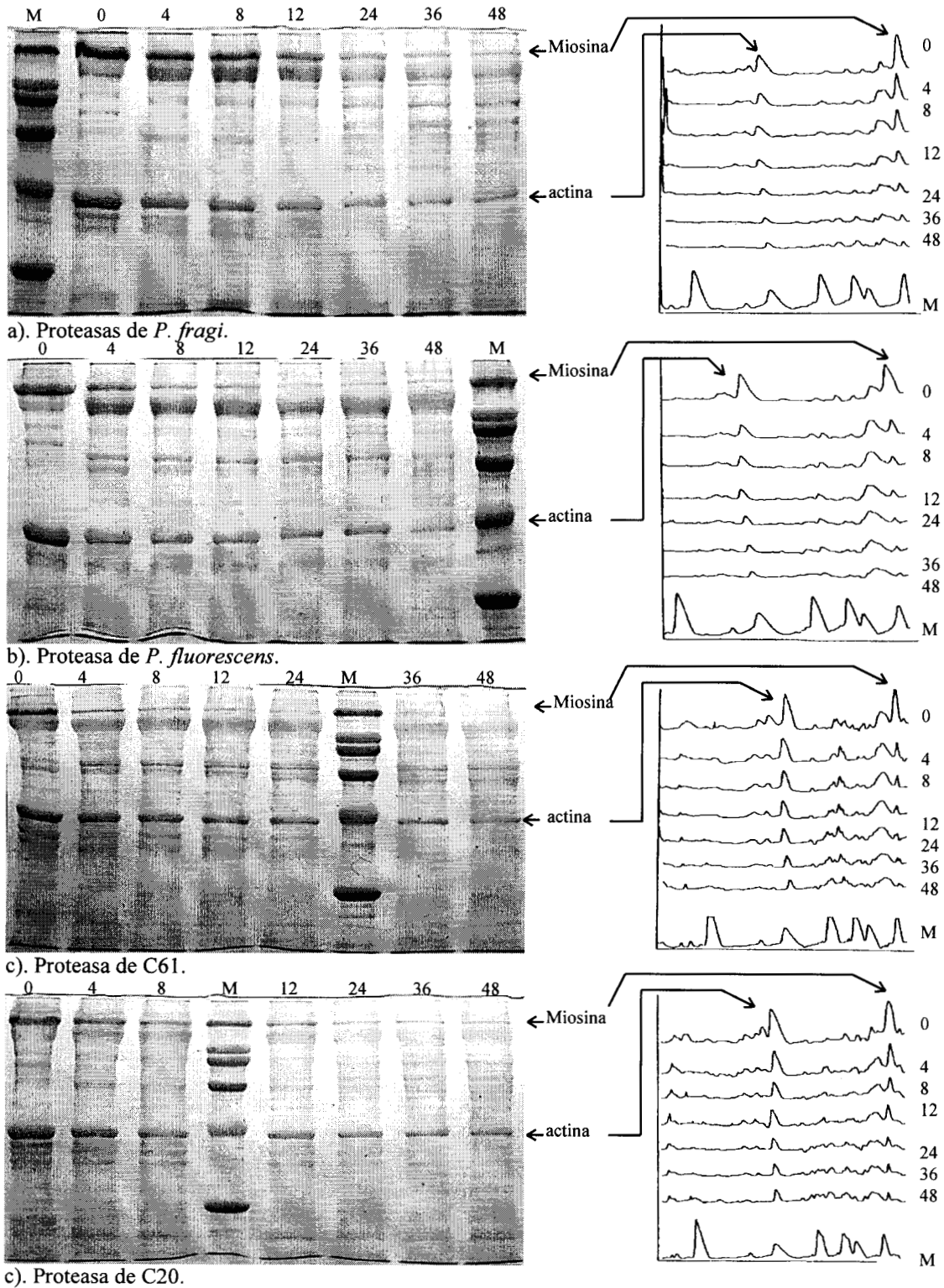


Figura 9. Perfiles electroforéticos de las cinéticas de hidrólisis de proteasas de *P. fragi*, *P. fluorescens*, C61 y C20 sobre la fracción de miosina, actina y proteínas reguladoras.

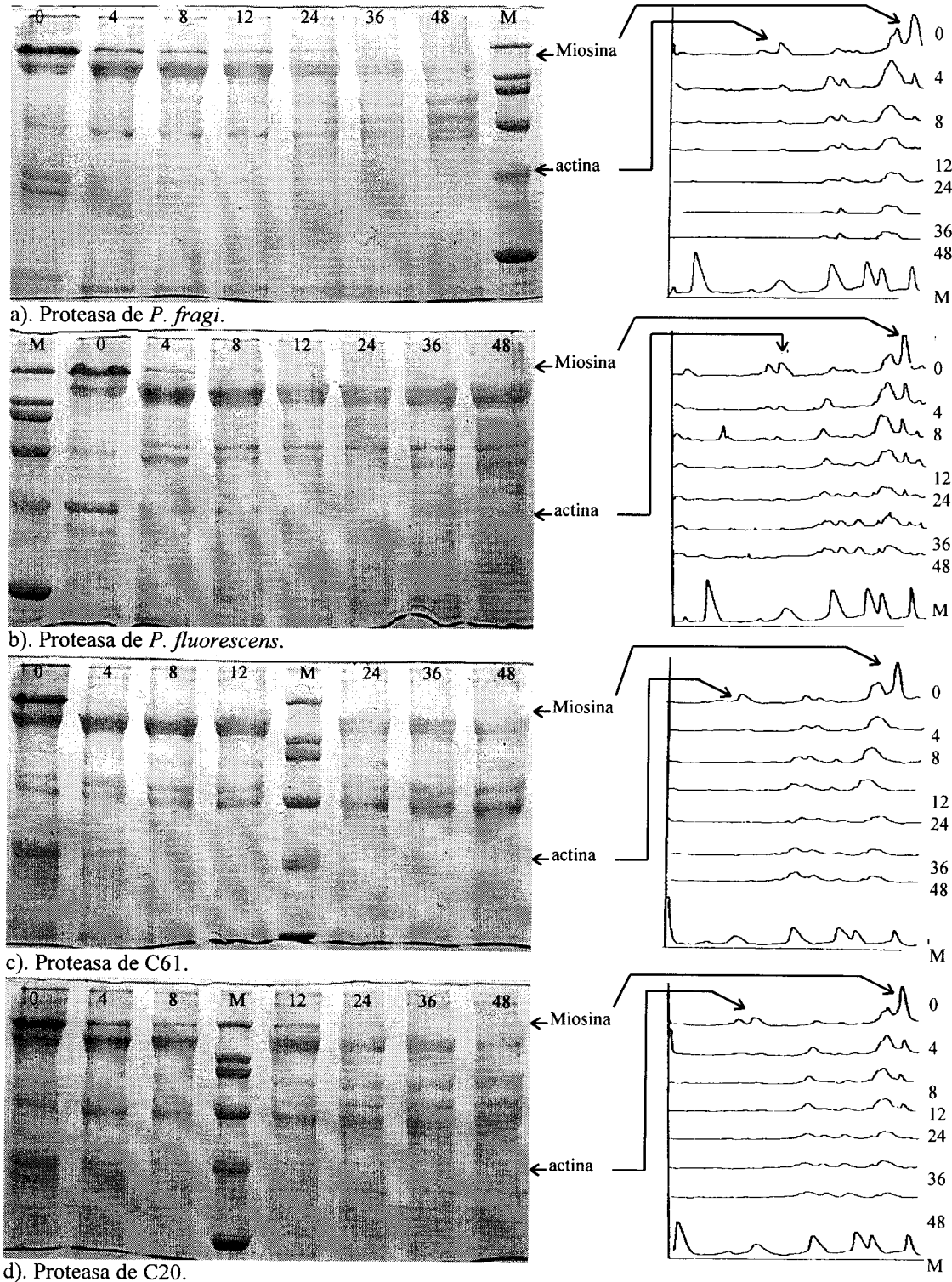
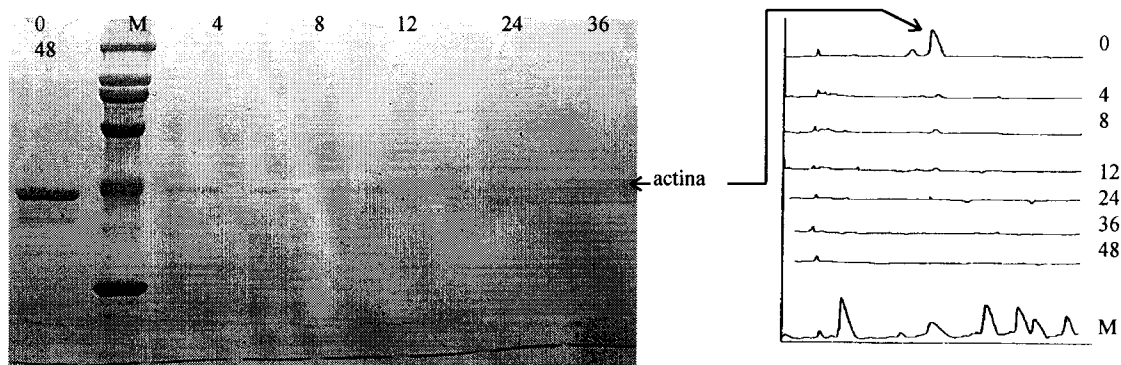
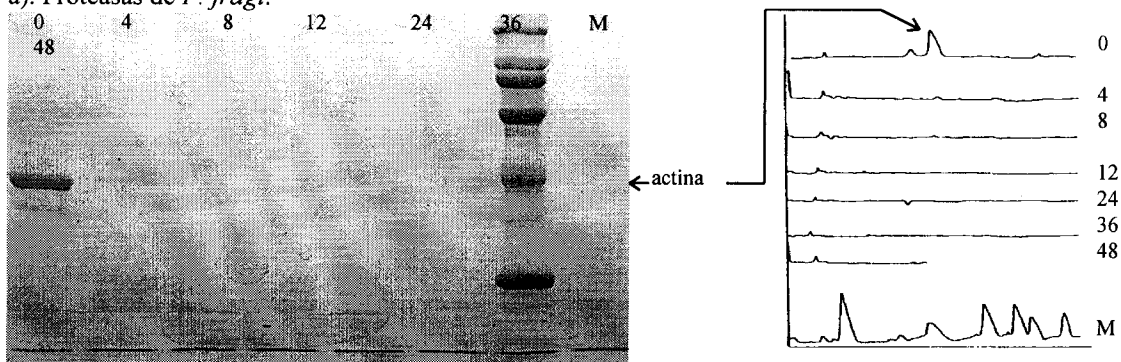


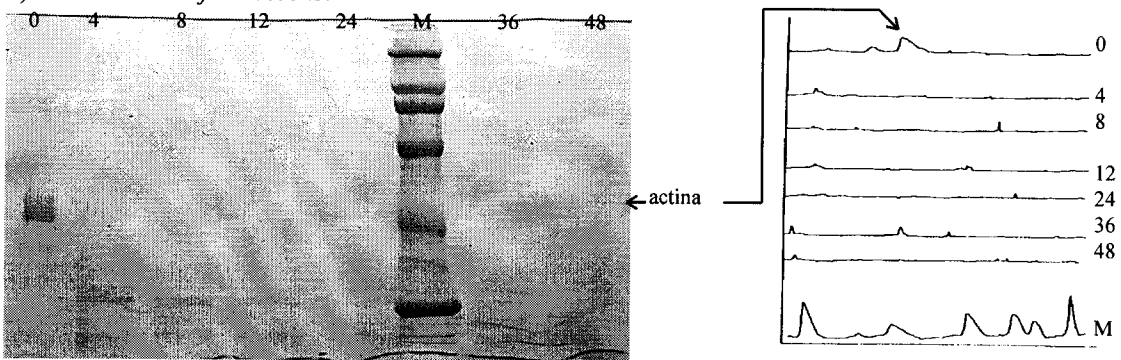
Figura 10. Perfiles electroforéticos de las cinéticas de hidrólisis de proteasas de *P. fragi*, *P. fluorescens*, C61 y C20 sobre la fracción de actina.



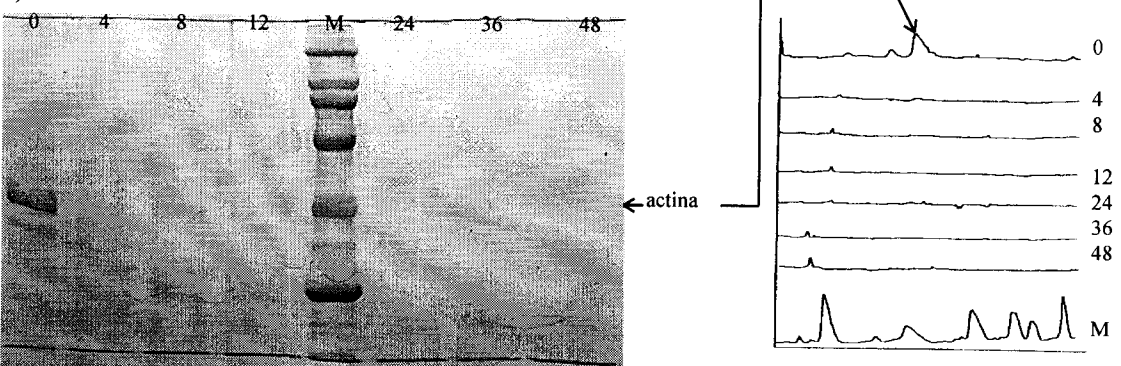
a). Proteasas de *P. fragi*.



b). Proteasa de *P. fluorescens*.



c). Proteasa de C61.



d). Proteasa de C20.

En la Tabla 12 se muestran la concentración de la fracción protéica y las unidades internacionales por ml ( $\mu\text{g}$  de Tyr/min ml) de los diferentes extractos enzimáticos, utilizados en las cinéticas de hidrólisis para proteínas de alto peso molecular ( $> 200$  KDa).

Tabla 12. Concentraciones de fracciones miofibrilares y actividad de extractos enzimáticos.

Fracción Protéica.	mg/ml	Extracto Enzimático	U/ml
Actomiosina	4.92	<i>P. fragi</i>	3.92
		<i>P. fluorescens</i>	2.83
		61	5.1

Las Figuras de la 11 a la 14 muestran los geles de electroforesis así como su respectivo perfil electroforético (lecturas de densitometría).

Las proteínas de alto peso molecular como titina, nebulina y filamina, que se localizan en la parte superior del cuerpo del gel (se señalan por recuadros de línea discontinua) se presentaron con poca resolución así como también el marcador de pesos moleculares, por lo que no se pudo calcular el peso molecular de estas bandas. Se puede observar que la banda que correspondería a titina (parte superior de los geles), en las Figuras de la 11 a la 13, disminuye su intensidad pero sin llegar a desaparecer, respecto a la nebulina (segunda banda), esta banda fué destruida por los tres extractos enzimáticos microbianos, siendo *P. fluorescens* la que más rápido la degradó, no observándose su presencia a las 4 hrs, no así C61 y *P. fragi* donde no se observó a las 8 hrs de actividad. En cuanto a la filamina, que se localiza en el tercer recuadro del cuerpo del gel, fué degradada por la C61; a las 36 hrs ya no se observó la banda, en cambio *P. fragi* y *P. fluorescens* presentan una banda muy tenue a este tiempo lo que indica que la degradación de esta proteína se dió en menor grado, observándose aún a las 48 hrs de hidrólisis. En cuanto a la acción de calpainas, solo la banda que correspondería a filamina fué destruida y las otras bandas de alto peso molecular así como también las bandas correspondientes a miosina pesada y actina no fueron degradadas. Estos resultados no concuerdan con lo reportado por **Uytterhaegen y col. (1994)**, quienes han reportado que las calpainas degradan las proteínas de la línea Z, titina, nebulina, así

como otras proteínas de bajo peso molecular teniendo un papel preponderante en la maduración de la carne.

Figura 11. Cinética de hidrólisis de proteasas de *P. fragi* sobre actomiosina a 13°C.

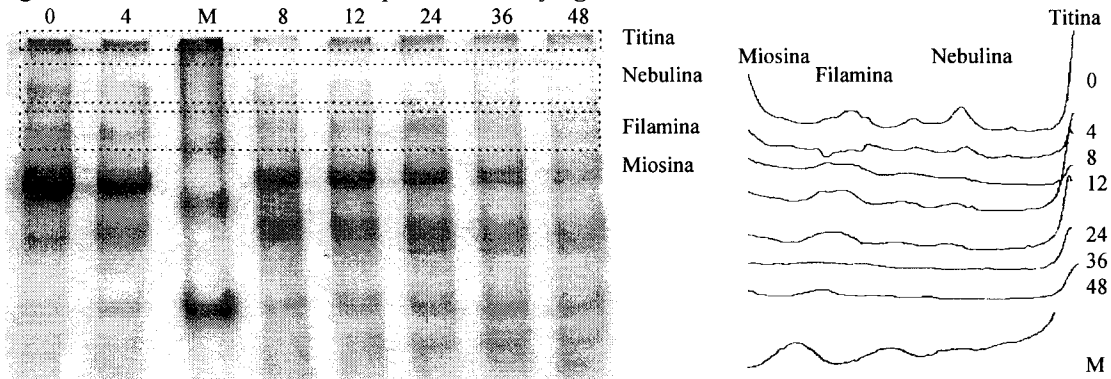


Figura 12. Cinética de hidrólisis de proteasas de *P. fluorescens* sobre actomiosina a 13°C.

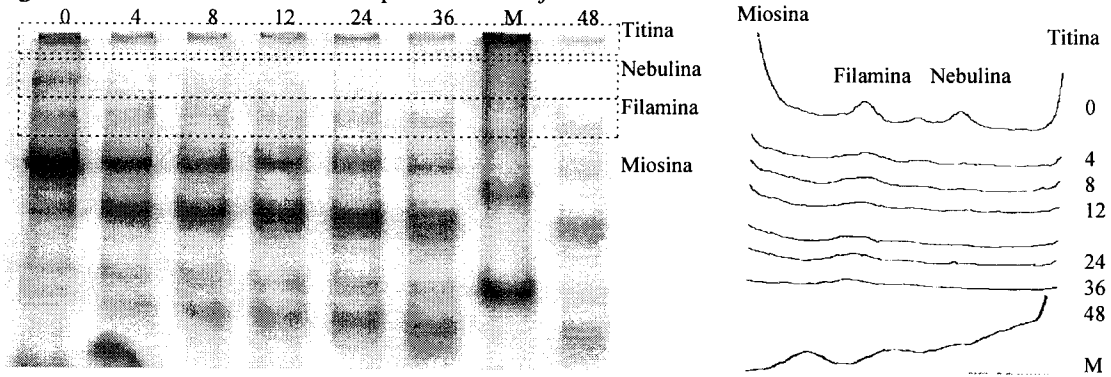


Figura 13. Cinética de hidrólisis de proteasas de C61 sobre actomiosina a 13°C.

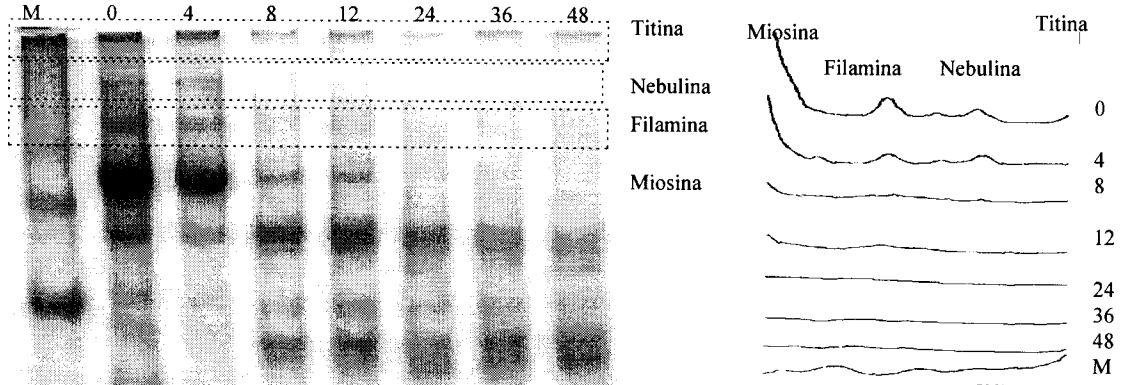
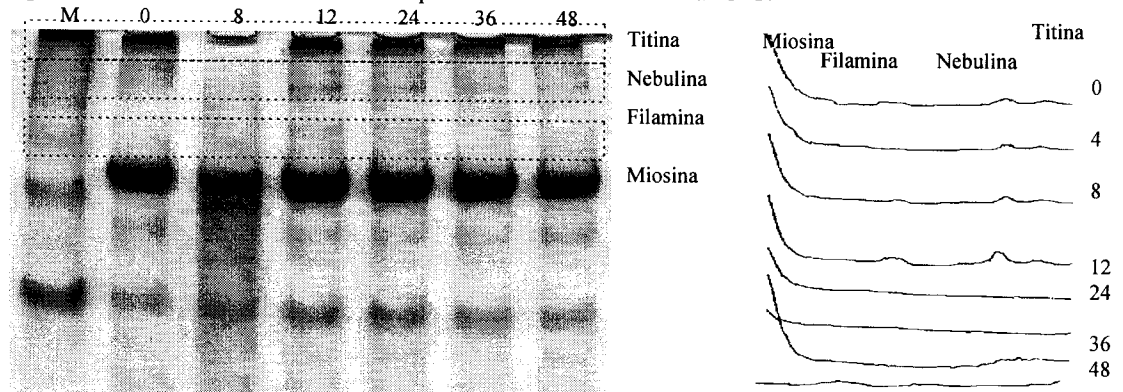


Figura 14. Cinética de hidrólisis de calpainas sobre actomiosina a 13°C.



## 6. Conclusiones.

Los métodos empleados para comprobar la producción de proteasas son sencillos, proporcionando evidencia contundente sobre la actividad proteolítica. Estas pruebas permitieron una preselección de las cepas que se emplearon en la obtención de los extractos enzimáticos.

Las fracciones protéicas obtenidas muestran, mediante su patrón electroforético, que sí se extrajeron las fracciones deseadas, es decir, la actomiosina muestra una gama de bandas de diferentes pesos moleculares que corresponden a miosina, actina y proteínas reguladoras, la actina se obtuvo con muy poca contaminación de tropomiosina como se observa en su patrón electroforético, no así para la fracción de miosina que se obtuvo con una cantidad considerable de actina y proteínas reguladoras.

Por medio de electroforesis para sustrato en PAGE-SDS se realizó la separación y obtuvo el peso molecular de las proteasas de los diferentes extractos enzimáticos, teniendo para *P. fluorescens* una proteasa con un peso molecular de 46.1 KDa, para la cepa C61 una proteasa de 46.8 KDa, para C20 una de 49.2 KDa y la presencia de dos proteasas para *P. fragi* de 49.2 y 34.2 KDa.

La formación de polipéptidos de alto peso molecular por acción de las proteasas de las cuatro cepas de *Pseudomonas* spp. indica que hay sitios en la miosina pesada muy susceptibles al rompimiento.

Al ajustar a un modelo con término lineal y cuadrático el tipo de rompimiento, se observó que para la fracción de actomiosina la mayoría de las bandas se ajustó y no así para las otras dos fracciones indicando con esto la aparición irregular de bandas como resultado de la degradación de proteínas de mayor peso molecular.

La proteasa de la cepa 61 mostró ser la más proteolítica de las cuatro cepas estudiadas, tanto en proteínas contráctiles de bajo y alto peso molecular.



Los extractos enzimáticos de *P. fragi*, *P. fluorescens* y C61 mostraron degradación de proteínas de alto peso molecular (titina, nebulina y filamina).

## 7. Bibliografía.

- Asghar, A. y Pearson, A. M.** 1980. Influence of ante- and post-mortem treatments upon muscle composition and meat quality. *Adv. Food Res.* 54:157.
- Ayres, J. C.** 1960. The relationships of organisms of the genus *Pseudomonas* to the spoilage of meat, poultry and eggs. *J. Appl. Bacteriol.* 23:471.
- Bala, K., Marshall, R. T., Stringer, W. C. y Naumann, H. D.** 1979. Stability of sterile beef and beef extract to protease and lipase from *Pseudomonas fragi*. *J. Food Sci.* 44:1294.
- Bala, K., Marshall, R. T., Stringer, W. C. y Naumann, H. D.** 1977. Changes of color of aqueous beef extract caused by *Pseudomonas fragi*. *J. Food. Prot.* 40:824.
- Beatty, S. A. y Collins, V. K.** 1939. Studies of fish spoilage. VI. Breakdown of carbohydrates, proteins and amino acids during spoilage of cod muscle press juice. *J. Fish. Res. Board Can.* 4:413.
- Borton, R. J., Bratzler, L. J. y Price, J. F.** 1970. Effects of four species of bacteria on porcine muscle. II. Electrophoretic patterns of extracts of salt-soluble protein. *J. Food Sci.* 35:783.
- Brown, A. D. y Weidemann, J. F.** 1958. The taxonomy of the psychrophilic meat spoilage bacteria: a reassessment. *J. Appl. Bacteriol.* 21:11.
- Briskey, E. J. y Fukazawa, T.** 1971. Myofibrillar proteins of skeletal muscle. *Adv. Food Res.* 1:279.
- Cheftel, J. C., Cuq, J. L. y Lorient D.** 1989. Los principales sistemas proteicos alimentarios. En: *Proteínas alimentarias*. Acribia, S. A. Zaragoza, España. p. 153
- Chung, J. R.** 1968. Post mortem degradation of fish muscle proteins: the role of proteolytic *Pseudomonas* spp. and their mechanism of action. Ph. D. thesis, University of Washington, Seattle.
- Cofrades, S.** 1994. Funcionalidad y características fisicoquímicas de actomiosina procedente de distintas especies. Influencia de la congelación y conservación en estado congelado. Tesis Doctoral, Universidad Complutense. Madrid.
- Dainty, R. H., Shaw, B. G., DeBoer, K. A. y Scheps, E. S. J.** 1975. Protein changes caused by bacterial growth on beef. *J. Appl. Bacteriol.* 39:73.

- Ebashi, S.** 1976. A simple method of preparing actin-free myosin from smooth muscle. *J. Biochem.* 19:229.
- Ebashi, S., Ebashi, F. y Kodama, A.** 1967. Troponin as a  $\text{Ca}^{+2}$  receptive protein in the contractile system. *J. Biochem.* 62:137.
- Flores, J. y Bermell, S.** 1984. Estructura, composición y propiedades bioquímicas de las proteínas miofibrilares. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 24(1):15.
- Frazier, W. C.** 1926. A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *J. Infectious Diseases.* 39:302.
- García-Carreño, F. L., Dimes, L. E., y Haard, N. F.** 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214:65.
- Gerhardt, B. y Beevers H.** 1959. Determination of proteins in "Tris" buffer by the Biuret reaction. *Anal. Chem.* 31:964.
- Gill, C. O.** 1982. Microbial interactions with meats. En: *Meat Microbiology*, Brown, M. H. (Ed.). Applied Science, Barking, Inglaterra. p. 225.
- Gill, C. O.** 1983. Meat spoilage and evaluation of the potencial storage life of fresh meat. *J. Food Protec.* 46(5):444.
- Gill, C. O.** 1986. The control of microbial spoilage in fresh meat. En: *Advances in Meat Research*, Vol. 2, Pearson, A. M. y Dutson, T. R., (Eds.). AVI Publishing, Westport. Connecticut. p. 49.
- Gill, C. O. y Newton, K. G.** 1977. The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* 43:189.
- Greer, G. G.** 1989. Red meats, poultry, and fish. En: *Enzymes of Psychrotrophos in Raw Food*. McKellar, C. R. (Ed.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. p. 270.
- Hamm, R.,** 1960. Biochemistry of meat hydration. *Adv. Food Res.* 10:355.
- Harbitz, O., Slide, E., Kryvi, Harald. y Totland K. G.** 1982. Preparation of myofibrils from bovine *M. semimembranosus* by density gradient centrifugation. *Anal. Biochem.* :105
- Jay, J. M.** 1966. Influence of post mortem conditions on muscle microbiology. En: *The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food*. Briskey, E. J., Cassens, R., y Marsh, B., (Eds.). University of Wisconsin Press, Madison. p. 389.

- Jay, J. M. y Kontou, K. S.** 1967. Fate of free amino acids and nucleotides in spoiling beef. *Appl. Microbiol.* 15:759.
- Jay, J. M. y Shelef, L. A.** 1976. Effect of microorganisms on meat proteins at low temperatures. *J. Agric. Food Chem.* 24(6):1113.
- Kirsch, R. H., Berry, F. E., Baldwin, C. L. y Foster, E. M.** 1952. The bacteriology of refrigerated ground beef. *Food Res.* 17:495.
- Krieg, N. R. y Holt, J. G. (Eds.).** 1984. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Vol I, Williams & Wilkins, Baltimore.
- Kunitz, M.** 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J. Gen. Physiol.* 30:291.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680.
- Lea, C. H., Parr, J. L. y Jackson, F. H.** 1969. Chemical and organoleptic changes in poultry meat resulting from the growth of psychrophilic spoilage bacteria at 1°C. 3. Glutamine, glutathione, tyrosine, ammonia, lactic acid, creatine, carbohydrate, heme pigment and hydrogen sulphide. *Br. Poult. Sci.* 10:229.
- Lerke, P., Farber, L., y Adams, R.** 1967. Bacteriology of spoilage of fish muscle. IV. Role of protein. *Appl. Microbiol.* 15:470.
- Mac, F. J. F.** 1993. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Panamericana, México.
- Margossian, S. S. y Lowey, S.** 1982. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. En: *Methods in Enzymology*. Colowick, S. P. y Kaplan, O. (Eds.). Academic Press, Inc., Nueva York. Vol. 85, p. 55.
- Martone, B. C., Busconi, L., Folco, E. J., Trucco, R. E. y Sanchez, J. J.** 1986. A simplified myosin preparation from marine fish species. *J. Food Sci.* 51:1554.
- Maruyama, K.** 1985. Myofibrillar cytoskeletal proteins of vertebrates striated muscle. En: *Development in Meat Science-3*. Lawrie, R. (Ed.). Elsevier applied Science Publishers. Londres, Inglaterra. Vol. 3. p. 44.
- Mikami, M., Miura, H. y Shirahata, H.** 1983. Changes in meat proteins cause by the psychrophilic bacteria. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 54:671.

- Miller, L. S. y Price, J. F.** 1971. The extract-release volume (ERV) phenomenon. *J. Food Sci.* 36:70.
- Miller, A. III, Scanlan, A. R., Lee, J. S., Libbey, M. L. y Morgan, E. M.** 1973. Volatile compounds produced in steril fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas perolens*. *Appl. Microbiol.* 25:257.
- Molin, G. y Ternstöm, A.** 1982. Numerical taxonomy of psychrotrophic pseudomonads. *J. General Microb.* 128:1249
- Molin, G. y Ternström, A.** 1986. Phenotypically based taxonomy of psychrotrophic *Pseudomonas* isolated from spoiled meat, water and soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36:257.
- Neurath, H.** 1989. The diversity of proteolytic enzymes. En: *Proteolytic enzymes, a practical approach*. Beynon, R. J. y Bond, J. S. (Eds.). IRL Press. Oxford, Inglaterra. p. 2.
- Ockerman, H. W., Cahill, V. R., Weiser, H. H., Davis, C. E., y Siefker, J. R.** 1969. Comparison of sterile and inoculated beef tissue. *J. Food Sci.* 34:93.
- Offer, G., Moos, C. y Starr, R.** 1973. A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal muscle myofibrils. Extraction, purification and characterization. *J. Mol. Biol.* 74:653.
- Pardee, J. D. and Spudich, J.A.** 1982. Purification of Muscle Actin. En: *Methods in Enzymology*. Colowick, S. P. y Kaplan, O. (Eds.). Academic Press, Inc., Nueva York. Vol. 85. p. 164.
- Pearson, D.** 1968. Application of chemical methods for the assessment of beef quality. II. Methods related to protein breakdown. *J. Sci. Food Agric.* 19:366.
- Perry, S. V.** 1955. Myosin adenosinetriphosphate. En: *Methods in enzymology*. Colowick, S. P. y Kaplan, O. (Eds.). Academic Press, Inc., Nueva York. Vol. 2. p 582.
- Porzio, M. A. y Pearson, A. M.** 1975. Isolation of an extracellular neutral proteinase from *Pseudomonas fragi*. *Biochem. Biophys. Acta.* 384:235.
- Porzio, M. A., Pearson, A. M. y Cornforth, D. P.** 1979. M-line proteins: Presence of two non-equivalent high molecular weight components. *Meat Sci.* 3(1):31
- Putter, J. D. y Gergely, J.** 1975. The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 250(4):628.
- Redinbaugh, M. G. y Turley, R. B.** 1986. Adaptation of the bicinchoninic acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose gradient fractions. *Anal. Biochem.* 153:267.

- Shaw, B. G. y Latty, J. B.** 1981. The taxonomy of *Pseudomonadaceae* responsible for low-temperature aerobic spoilage of meats. En: *Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity*, Roberts, T. A., Hobbs, G., Christian, J. H. B. y Skovgaard, N. (Eds.). Academic Press, Nueva York. p 259.
- Shaw, B. G. y Latty, J. B.** 1982. A numerical taxonomy study of *Pseudomonas* strains from spoiled meat, *J. Appl. Bacteriol.* 52:219.
- Shaw, B. G. y Latty, J. B.** 1984. A study of the relative incidence of different *Pseudomonas* groups on meat using computer-assisted identification techniques employing only carbon source test. *J. Appl. Bacteriol.* 57:59.
- Shelef, L. A.** 1974. Hydration and pH of microbially spoiling beef. *J. Appl. Bacteriol.* 37:531.
- Sigma Chemical Company.** 1988 Cross-Linked Phosphorylase b SDS Molecular Weight Markers. Boletín No. MWS-877X (4-88). St. Louis, Missouri.
- Smith, N.R., Gordon, R.E y Clark, F. E.** 1952. Aerobic spore-forming bacteria. US Department of Agriculture, Agriculture Monograph No. 16. Washington DC.
- Suhren, G.** 1989. Producer microorganisms. En: *Enzymes of Psychrotrophos in Raw Food*. McKellar, C. R. (Ed.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. p. 4.
- Tarrant, P. J. V., Jenkins, N., Pearson, A. M. y Dutson, T. R.** 1973. Proteolytic enzyme preparation from *Pseudomonas fragi*: its action on pig muscle. *Appl. Microbiol.* 25:996.
- Tarrant, P. J. V., Pearson, A. M., Price, J. F. y Lechowich, R. V.** 1971. Action of *Pseudomonas fragi* on the proteins of pig muscle. *Appl. Microbiol.* 22:224.
- Thompson, S. S., Naidu, Y. M., y Pestka, J. J.** 1985. Relationship between extracellular neutral protease production and appearance of bleb-like evaginations in *Pseudomonas fragi*. *J. Food Prot.* 48:1067.
- Uytterhaegen, L., Claeys, E. y Demeyer, D.** 1994. Effects of exogenous protease effectors on beef tenderness development and myofibrillar degradation and solubility. *J. Anim. Sci.* 72:1209.
- Walsh, K. A.** 1986. Methods in protein sequence analysis. Humana Press. Clifton, N. J.
- Wang, K.** 1981. Nebulin, a giant protein component of N2-line in striated muscle. *J. Cell Biol.* 91:355a.

- Wang, K. y Ramirez-Mitchell, R.** 1979. Titin: possible candidate as putative longitudinal filaments striated muscle. *J. Cell. Biol.* 83:389a.
- Yada, R. Y. y Skura, B. J.** 1981. Some Biochemical changes in sarcoplasmic depleted, intact beef muscle inoculated with *Pseudomonas fragi*. *J. Food Sci.* 46:510.

## Anexo.

### Medios de cultivo

#### Medio F.

Peptona de caseína	10 g
Peptona de carne	10 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5 g
Agar bacteriológico	12 g
Glicerol	10 g
Agua destilada	1000 ml

#### Medio de gelatina (Molin y Ternström, 1953).

Extracto de carne	3 g
Peptona de caseína	5 g
Gelatina	120 g
Agar bacteriológico	12 g
Agua destilada	1000 ml

\* pH final de 6.8-7.

#### Medio de caseína (Molin y Ternström, 1953).

Leche descremada en polvo	100 g
Agar bacteriológico	15 g
Agua destilada	1000 ml

#### Medio tripticaseína y soja (TSA).

Tripticaseína y soja (Difco)	30 g
Agar bacteriológico	15 g
Agua destilada	1000 ml

#### Caldo Tripticaseína y soja (TSB).

Tripticaseína y soja (Difco)	30 g
Agua destilada	1000 ml



## Análisis estadístico (regresión lineal múltiple).

Tabla A. Extracto de actomiosina.

modelo: $Arel = \beta_0 + \beta_1 t + \beta_2 t^2 + \varepsilon$		P>F						
Cepa	Compuesto	P	R <sup>2</sup>	tiempo	tiempo <sup>2</sup>	$\beta_0$	$\beta_1$	$\beta_2$
<i>P. fragi</i>	a (miosina)	0.006	0.924	0.027	0.159	31.679	-0.912	0.009
	b	0.347	0.506	0.235	0.324	12.470	0.790	-0.012
	c	0.154	0.976	0.119	0.138	1.731	0.247	-0.004
	d	0.960	0.040	0.947	0.903	4.690	-0.018	0.001
	e	0.329	0.671	0.952	0.777	6.294	0.036	0.003
	f	0.018	0.868	0.462	0.634	2.725	0.110	0.001
	g	0.242	0.611	0.127	0.151	7.834	-0.331	0.006
	h	0.746	0.443	0.539	0.540	2.480	0.423	-0.009
	i	0.061	0.754	0.051	0.101	18.115	-0.777	0.012
	j	0.201	0.657	0.963	0.605	5.773	-0.008	-0.002
	k (actina)	0.258	0.595	0.318	0.208	4.140	0.151	-0.004
	l	0.671	0.550	0.553	0.494	2.474	-0.002	0.001
	m	0.663	0.561	0.492	0.471	1.346	0.056	-0.001
<i>P. fluorescens</i>	a (miosina)	0.018	0.866	0.017	0.041	28.539	-1.563	0.024
	b	0.149	0.614	0.067	0.082	24.721	1.505	-0.028
	c	0.312	0.442	0.302	0.466	4.709	-0.078	0.001
	d	0.021	0.979	0.123	0.542	1.576	0.125	-0.001
	e	0.000	0.988	0.002	0.083	3.500	0.381	-0.003
	f	0.096	0.904	0.183	0.110	6.578	-0.271	0.007
	g	0.013	0.853	0.021	0.051	21.875	-1.020	0.016
	h	0.208	0.649	0.143	0.214	7.798	-0.486	0.010
	i (actina)	0.301	0.550	0.710	0.991	4.447	0.103	0.000
	j	0.826	0.317	0.628	0.620	2.475	-0.072	0.001
	k	0.729	0.271	0.955	0.871	1.961	-0.008	-0.001
C61	a (miosina)	0.145	0.619	0.131	0.237	15.939	-0.699	0.010
	b	0.040	0.799	0.017	0.017	19.695	1.215	-0.025
	c	0.015	0.939	0.367	0.527	2.466	0.066	0.001
	d	0.344	0.882	0.930	0.794	3.841	0.044	0.003
	e	0.325	0.895	0.590	0.916	5.396	0.092	0.001
	f	0.223	0.633	0.354	0.230	7.859	-0.346	0.009
	g	0.160	0.705	0.155	0.280	1.445	0.071	-0.001
	h	0.000	0.986	0.001	0.004	22.148	-0.763	0.010
	i	0.129	0.871	0.196	0.444	9.257	-0.506	0.010
	j	0.392	0.464	1.000	0.703	6.398	0.000	-0.002
	k (actina)	0.849	0.103	0.672	0.730	2.866	0.058	-0.001
	l	0.087	0.913	0.103	0.215	6.413	-0.285	0.005
C20	a (miosina)	0.011	0.896	0.030	0.123	25.172	-0.970	0.012
	b	0.096	0.790	0.570	0.923	25.803	-0.353	-0.001
	c	0.423	0.821	0.486	0.734	5.661	0.167	-0.001
	d	0.220	0.531	0.119	0.102	4.178	0.218	-0.005
	e	0.199	0.659	0.147	0.232	3.187	0.460	-0.007
	f	0.003	0.943	0.062	0.644	2.457	0.215	-0.001
	g	0.692	0.217	0.430	0.448	4.345	0.128	-0.002
	h	0.005	0.972	0.309	0.379	1.171	0.058	0.001
	i	0.002	0.957	0.041	0.007	1.600	-0.077	0.003
	j (actina)	0.054	0.768	0.052	0.111	21.013	-0.752	0.011
	k	0.073	0.927	0.058	0.101	6.674	-0.703	0.020
	l	0.007	0.963	0.101	0.021	4.031	0.088	-0.004
	m	0.034	0.815	0.151	0.055	3.809	0.081	-0.003
	n	0.520	0.730	0.481	0.561	1.825	0.095	-0.001
	o	0.289	0.711	0.185	0.227	6.219	-0.638	0.014
p	0.533	0.343	0.776	0.972	6.702	-0.047	0.000	

Tabla B. Extracto de miosina, actina y proteínas reguladoras.

		modelo: $Ar = \beta_0 + \beta_1 t + \beta_2 t^2 + \varepsilon$						
Cepa	Compuesto	P	R <sup>2</sup>	P>F		$\beta_0$	$\beta_1$	$\beta_2$
				tiempo	tiempo <sup>2</sup>			
<i>P. fragi</i>	a (miosina)	0.137	0.631	0.093	0.152	25.926	-1.824	0.030
	b	0.692	0.521	0.747	0.622	38.040	1.087	-0.047
	c	0.224	0.776	0.132	0.159	64.646	-2.625	0.045
	d	0.132	0.740	0.075	0.099	4.017	0.304	-0.005
	e	0.004	0.975	0.042	0.350	8.547	0.250	-0.002
	g	0.548	0.699	0.554	0.459	15.023	-0.386	0.010
	h (actina)	0.032	0.822	0.026	0.054	8.098	-0.481	0.008
	i	0.416	0.827	0.328	0.371	3.850	-0.245	0.004
	<i>P. fluorescens</i>	a (miosina)	0.011	0.893	0.024	0.086	29.190	-1.305
b		0.869	0.089	0.810	0.746	27.658	0.245	-0.007
d		0.013	0.987	0.026	0.061	3.331	0.338	-0.005
f		0.266	0.929	0.430	0.621	-2.338	0.903	-0.011
h		0.000	1.000	0.001	0.007	1.421	0.368	-0.003
i		0.758	0.169	0.550	0.610	14.229	-0.288	0.005
k (actina)		0.111	0.769	0.086	0.148	7.990	-0.673	0.014
n		0.848	0.281	0.691	0.662	2.293	-0.057	0.001
r		0.991	0.009	0.974	0.994	4.952	0.008	0.000
C61	a (miosina)	0.099	0.685	-	-	-	-	-
	b	0.010	0.990	0.070	0.367	61.030	-1.286	0.008
	c	0.005	0.969	0.004	0.006	2.603	0.622	-0.010
	d	0.113	0.987	0.185	0.457	10.653	0.403	-0.003
	f	0.222	0.778	0.304	0.479	7.215	0.565	-0.007
	h (actina)	0.129	0.983	0.118	0.174	9.815	-1.734	0.092
C20	a (miosina)	0.081	0.919	0.073	0.134	36.635	-3.685	0.099
	b	0.239	0.761	0.337	0.246	31.745	1.553	-0.039
	c	0.725	0.474	0.525	0.542	20.723	-1.211	0.026
	d	0.172	0.970	0.223	0.447	3.275	0.677	-0.008
	e	0.028	0.973	0.083	0.309	3.172	0.445	-0.003
	g (actina)	0.141	0.859	0.098	0.147	8.475	-0.951	0.029
	h	0.095	0.905	0.055	0.064	7.376	-0.664	0.012

Tabla C. Extracto de actina.

modelo: $Ar = \beta_0 + \beta_1 t + \beta_2 t^2 + \epsilon$								
Cepa	Compuesto	P	R <sup>2</sup>	P>F		$\beta_0$	$\beta_1$	$\beta_2$
				tiempo	tiempo <sup>2</sup>			
<i>P. fragi</i>	a (actina)	0.244	0.506	0.157	0.230	44.633	-2.785	0.046
	b	0.951	0.049	0.905	0.860	7.248	0.039	-0.001
	c	0.777	0.396	0.975	0.943	15.042	-0.094	-0.006
	e	0.635	0.597	0.604	0.697	7.479	0.193	-0.003
	k	0.045	0.955	0.893	0.259	11.813	0.164	0.045
<i>P. fluorescens</i>	a (actina)	0.303	0.908	0.241	0.311	62.085	-12.416	0.739
	f	0.264	0.930	0.361	0.278	7.049	0.103	-0.003
	h	0.494	0.756	0.453	0.598	6.835	0.382	-0.006
	k	0.961	0.026	0.857	0.891	19.496	0.423	-0.007
C61	a (actina)	0.574	0.427	0.356	0.347	43.900	-2.811	0.059
	c	0.714	0.490	0.829	0.896	17.530	-0.576	0.006
	j	0.168	0.972	0.202	0.277	-6.655	2.408	-0.029
C20	a (actina)	0.448	0.552	0.291	0.361	46.833	-4.942	0.157
	b	0.154	0.976	0.243	0.166	15.139	-2.311	0.096
	j	0.987	0.025	0.904	0.900	13.610	0.929	-0.033

### Cinética de hidrólisis de proteínas contráctiles.

Figura A.1. Proteólisis de actomiosina por proteasas de *P. fragi*.

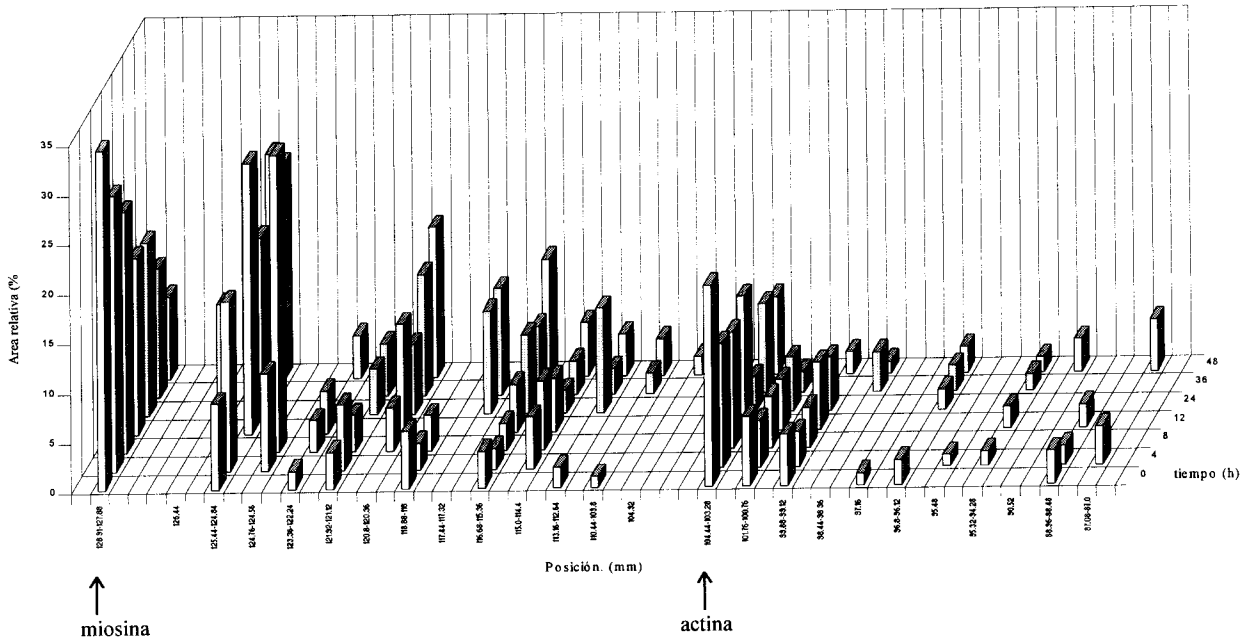


Figura A.2. Proteólisis de actomiosina por proteasa de *P. fluorescens*

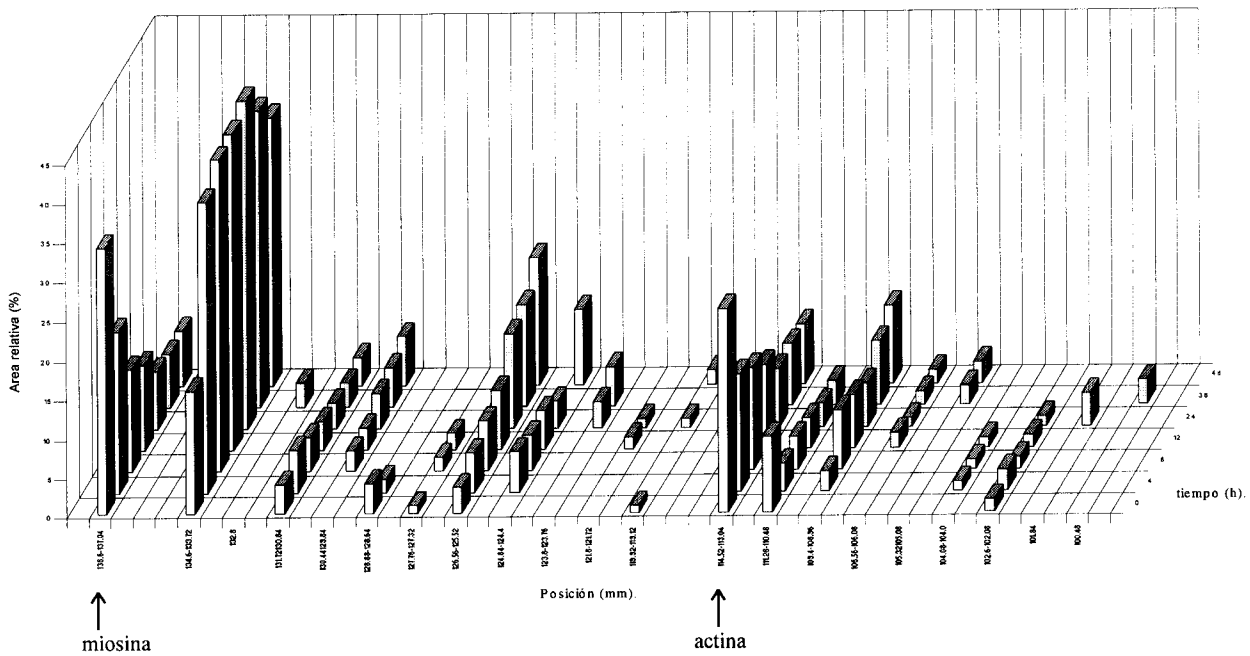


Figura A.3. Proteólisis de actomiosina por proteasa de C61.

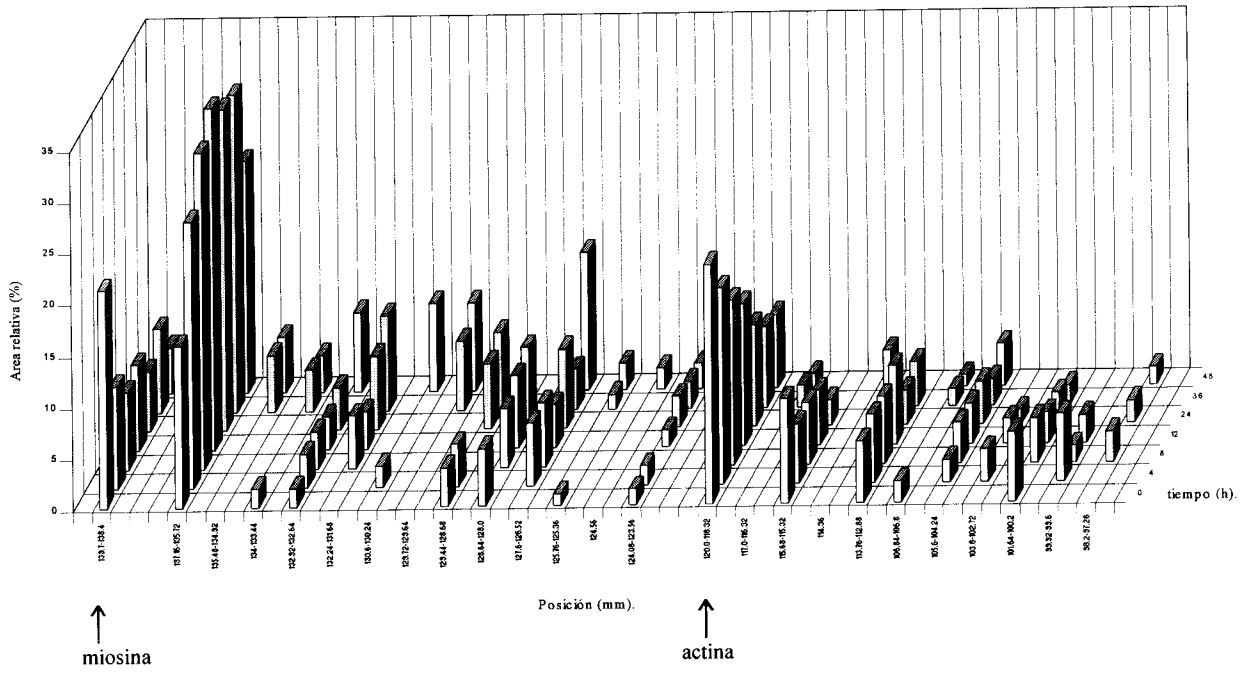


Figura A.4. Proteólisis de actomiosina por proteasa de C20.

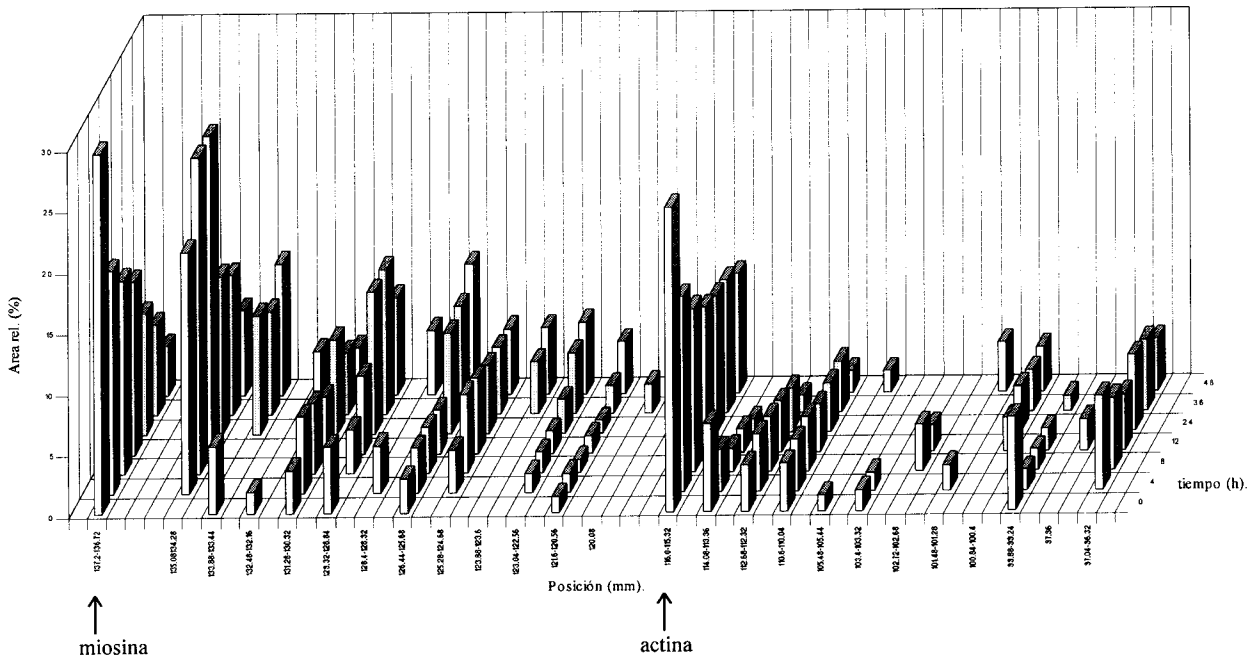


Figura B.1. Proteólisis de miosina, actina y proteínas reguladoras por proteasas de *P. fragi*.

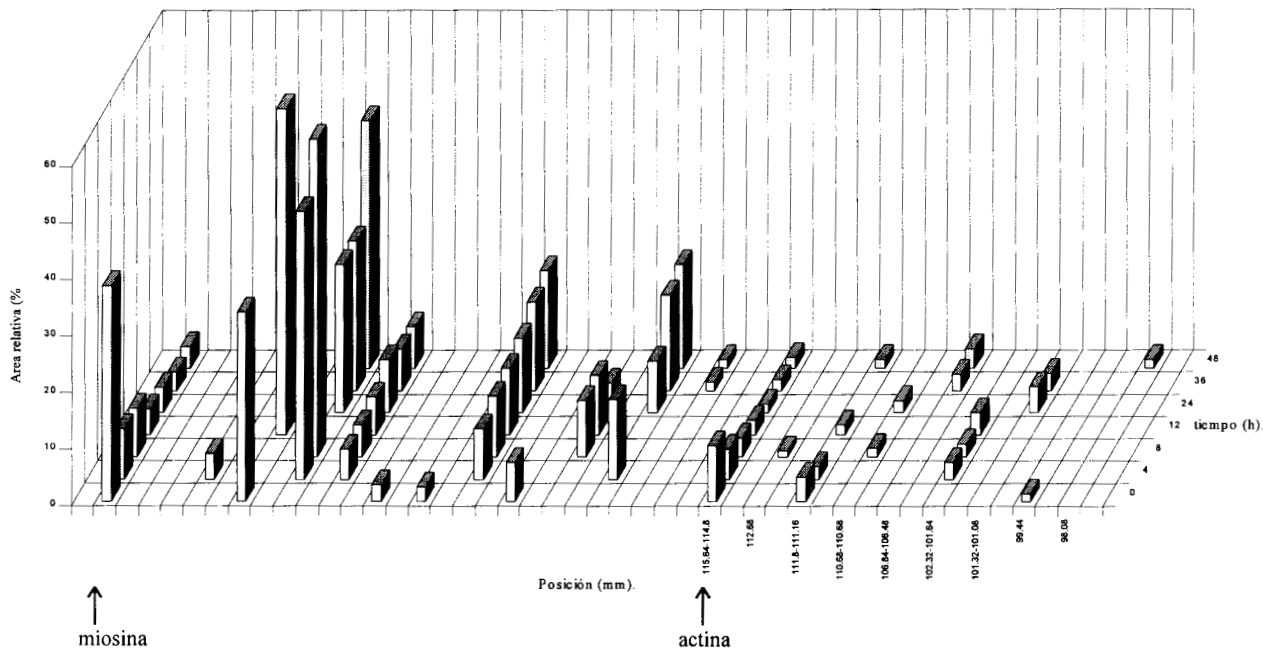
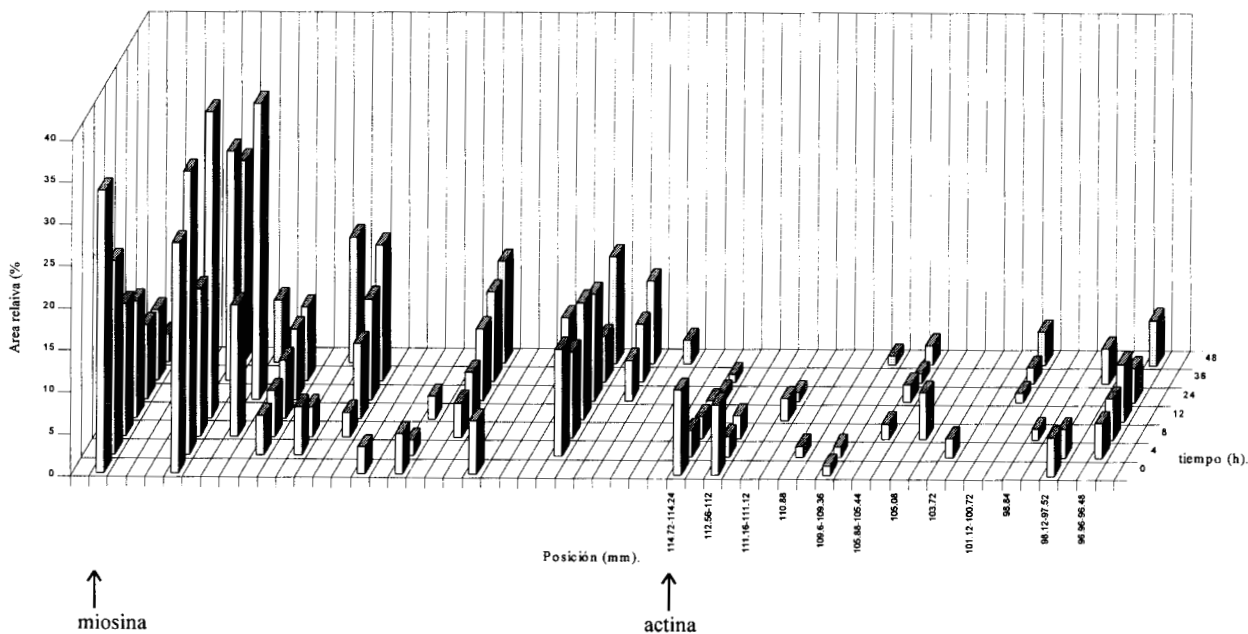


Figura B.2. Proteólisis de miosina, actina y proteínas reguladoras por proteasa de *P. fluorescens*.



225547

Figura B.3. Proteólisis de miosina, actina y proteínas reguladoras por proteasa de C61.

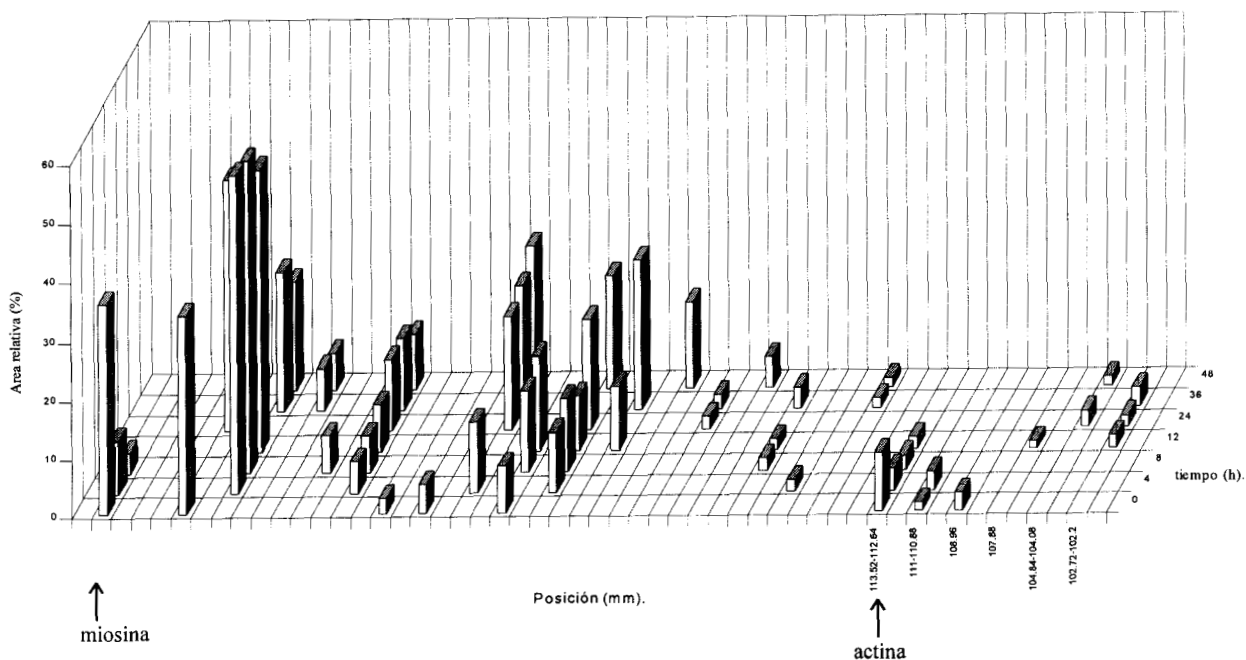


Figura B.4. Proteólisis de miosina, actina y proteínas reguladoras por proteasa de C20.

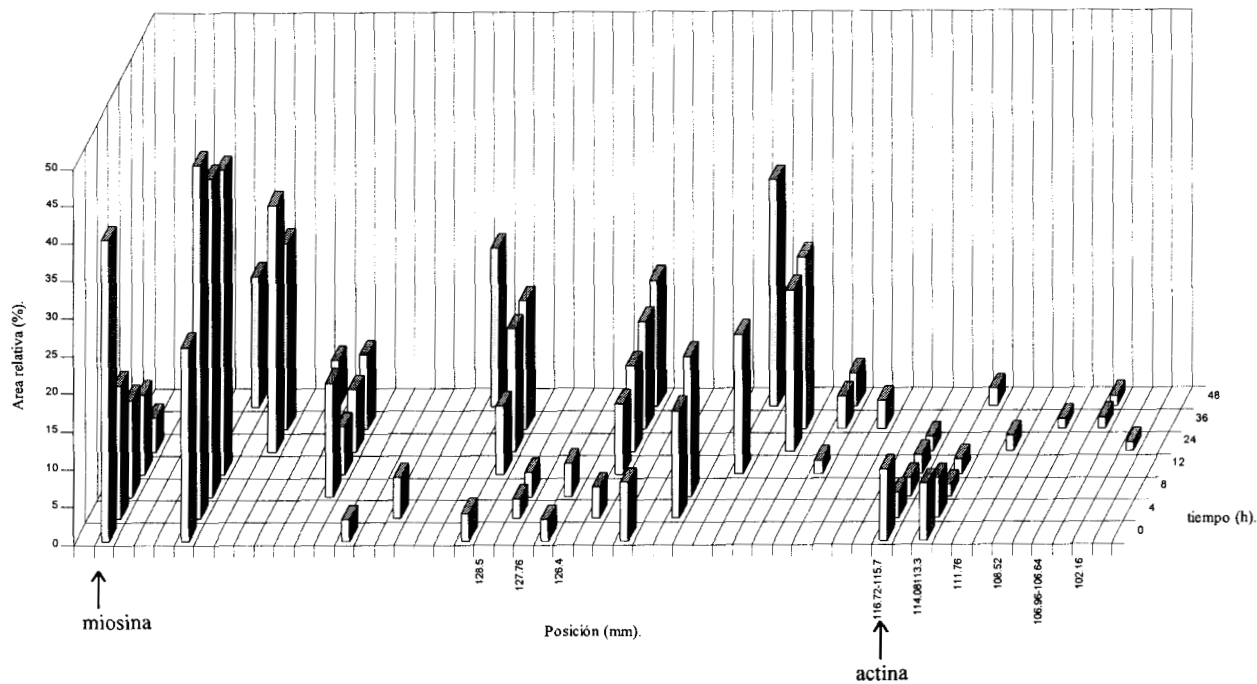


Figura C.1. Proteólisis de actina por proteasas de *P. fragi*.

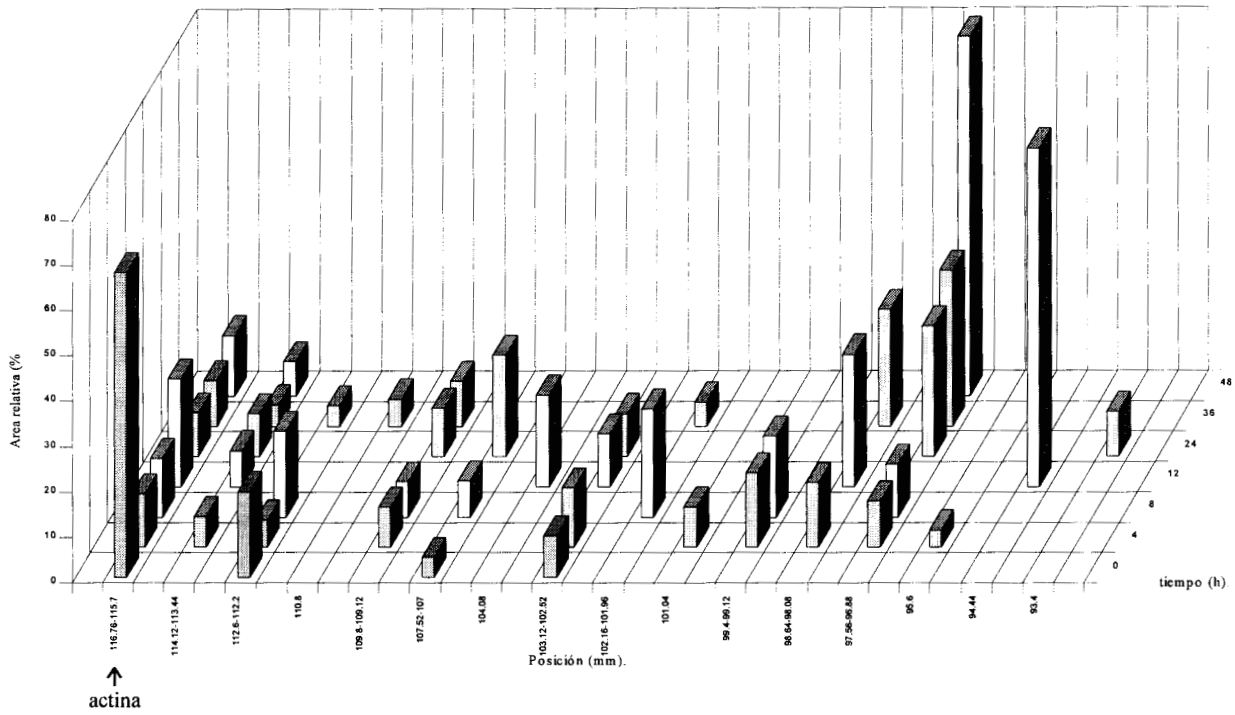


Figura C.2. Proteólisis de actina por proteasa de *P. fluorescens*.

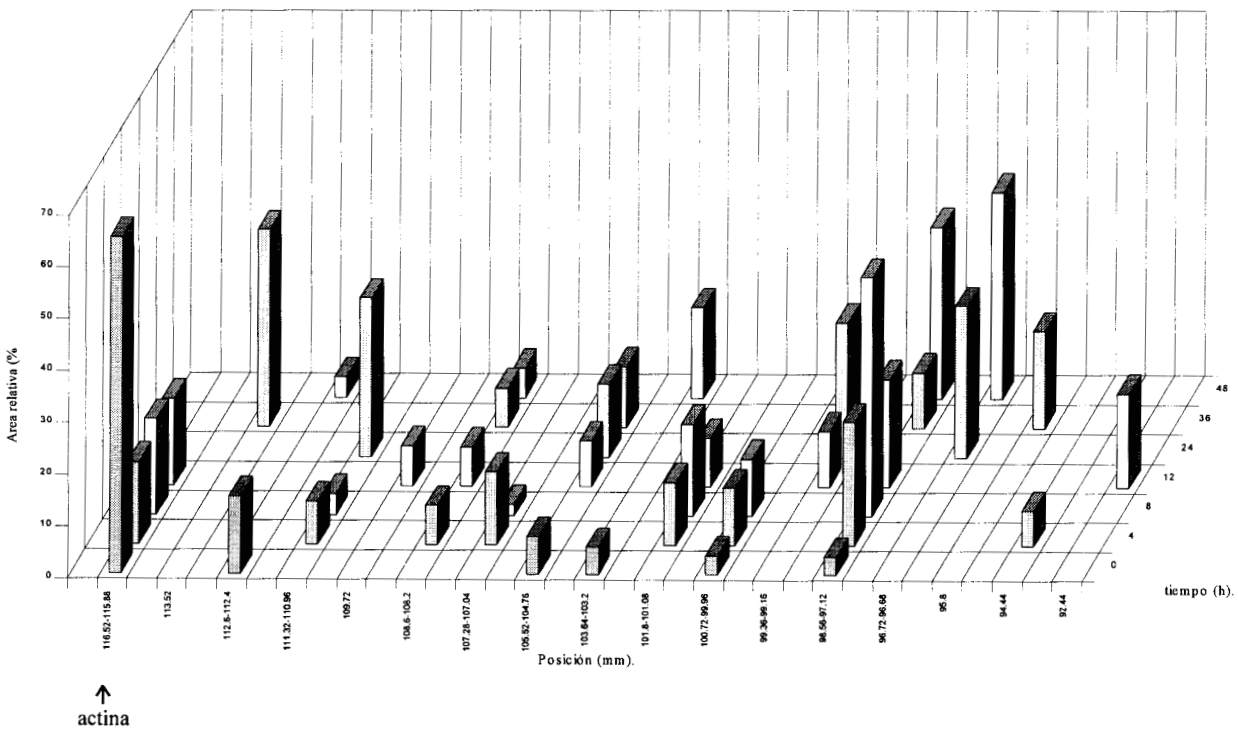




Figura C.3. Proteólisis de actina por proteasa de C61.

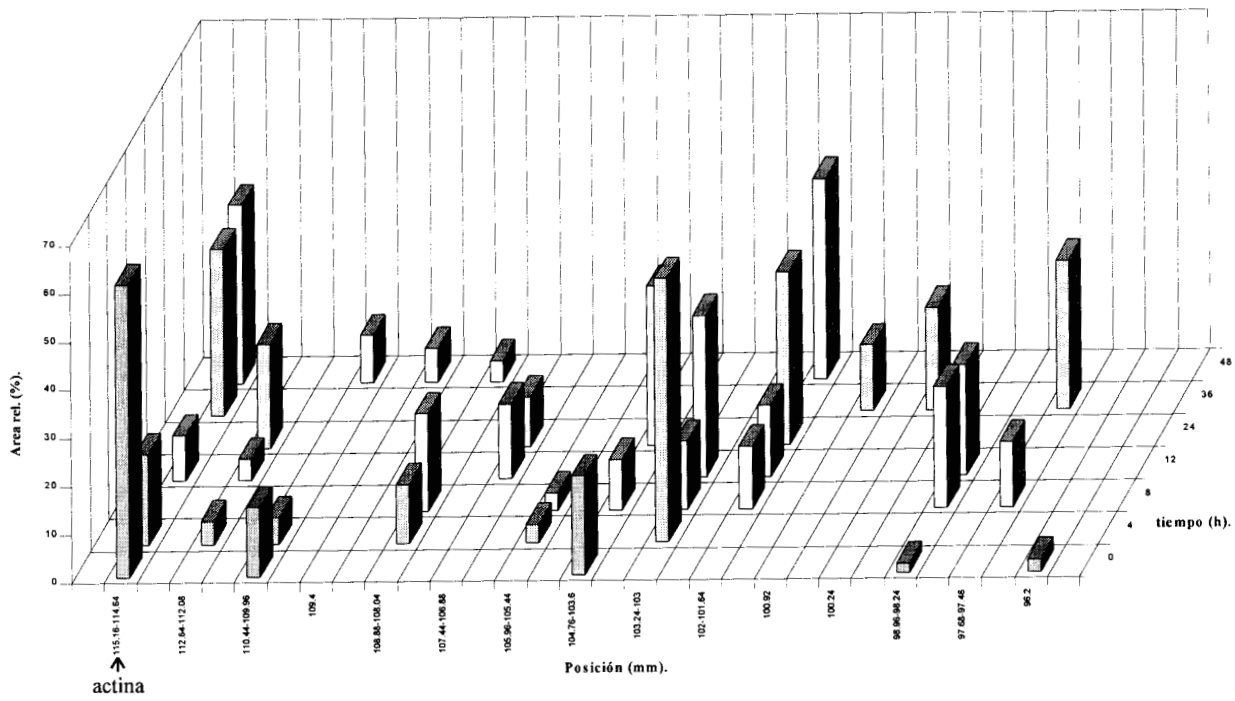


Figura C.4. Proteólisis de actina por proteasa de C20.

