



EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS DE PEPINO DE MAR *Isostichopus fuscus* RECOLECTADO EN EL GOLFO DE CALIFORNIA, MÉXICO

EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF SEA CUCUMBER *Isostichopus fuscus* PROTEASES, COLLECTED AT THE GULF OF CALIFORNIA, MEXICO

A.C. Hernández-Sámamo¹, X. Guzmán-García¹, R. García-Barrientos², F. Ascencio-Valle³, A. Sierra-Beltrán³, B. Vallejo-Córdoba⁴, A.F. González-Córdova⁴, M.J. Torres-Llanez⁴, I. Guerrero-Legarreta^{1*}

¹Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. San Rafael Atlixco 186. C.P. 09340. México D.F., México.

²Universidad Politécnica de Tlaxcala. Av. Universidad Politécnica 1. C.P. 90180. Tlaxcala, México.

³Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., Instituto Politécnico Nacional 195. C.P. 23096. Baja California Sur. México.

⁴Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a la Victoria Km. 0.6. C.P. 83304. Hermosillo, Sonora.

Recibido 9 de Julio de 2014; Aceptado 22 de Febrero de 2015

Resumen

Se estudiaron extractos enzimáticos del músculo ventral de *Isostichopus fuscus*. Se observó máxima actividad proteolítica a pH 2, 6 y 8, y 50-60°C. La mayor estabilidad enzimática fue a pH 2-6 (excepto pH 3), y a 0-40°C. Se detectó una actividad residual mayor a 74% después del calentamiento a 70°C y 80°C por 1 h, confirmando la presencia de enzimas termo resistentes. Asimismo, los extractos retuvieron 59% de la actividad inicial después de almacenarse a 4-5°C por 21 días. Hg²⁺ aumentó la actividad proteolítica 16%, mientras Cu²⁺ y Mn²⁺ la inhibieron parcialmente, lo que sugirió la presencia de cisteín y metalo proteasas. El extracto enzimático se inhibió por pepstatina A, β-mercaptoetanol y EDTA, confirmando la predominancia de aspartil, cisteín y metalo proteasas. Por SDS-PAGE se identificaron cuatro proteínas (180.6, 114.5, 91.7 y 52.9 kDa) y estudios de zimografía corroboraron la presencia de proteasas. Después de purificar el extracto por intercambio aniónico se detectó una proteasa de 49 kDa, posiblemente metalo proteasa. Por espectrometría de masas se encontró homología con tripsina y con la cadena E del complejo inhibidor de tripsina (LDTI). Debido a que no se confirmó homología con ninguna metalo proteasa previamente descrita, se sugirió que esta proteasa es una enzima novedosa.

Palabras clave: pepino de mar, *Isostichopus fuscus*, músculo ventral, proteasas, caracterización enzimática.

Abstract

Enzyme extracts obtained from *I. fuscus* ventral muscle were studied. Peak activity was observed at pH 2, 6, and 8, and 50-60°C, whereas maximum enzymatic stability occurred at pH 2 to 6 (except pH 3) and 0 to 40°C. More than 74% residual activity was retained after heating at 70°C and 80°C for 1 h, confirming the presence of heat-resistant enzymes. The extracts also retained 59% initial activity after 21-day storage at 4-5°C. Hg²⁺ increased the proteolytic activity in 16%, whereas Cu²⁺ and Mn²⁺ caused partial inhibition, suggesting the presence of cysteine- and metallo- proteases. Extracts were inhibited by pepstatin A, β-mercaptoethanol and EDTA, confirming the predominance of aspartyl-, cysteine-, and metallo-, proteases. Four proteins were identified by SDS-PAGE (180.6, 114.5, 91.7 and 52.9 kDa). Zymograms on casein confirmed the presence of proteolytic enzymes. After purification by anion exchange chromatography a 49 kDa protease, possible metalloprotease, was detected. Mass spectrometry of the partially purified protein showed homology with trypsin and chain E, leech-derived trypsin inhibitor trypsin complex (LDTI). Due that no homology was found with any previously described metalloproteases, the presence of a novel enzyme is suggested.

Keywords: sea cucumber, *Isostichopus fuscus*, ventral muscle, proteases, enzyme characterization.

*Autora para la correspondencia. E-mail: : isabel.guerrero.legarreta@yahoo.com

1 Introducción

El pepino de mar café *Isostichopus fuscus* (Ludwig, 1875), phylum: Echinodermata; clase: Holothuroidea, es un invertebrado marino cuyo hábitat se encuentra en aguas desde 20 hasta 61 m de profundidad (Salgado-Castro, 1993). Se distribuye desde la península de Baja California, México, hasta Ecuador, incluyendo las islas Galápagos, Socorro, Cocos y Revillagigedo (Deichmann, 1958; Maluf, 1988). Tiene una alta demanda en el mercado de alimentos del sureste de Asia, principalmente en China y Japón, debido a su gran tamaño y textura suave (FAO, 2010). Asimismo, una cantidad considerable de compuestos bioactivos se han obtenido y estudiado de dicho holotúrido (Bordbar y col., 2011). Entre estos compuestos, los intereses de investigación se han enfocado en sus enzimas proteolíticas, debido a que los holotúridos poseen alta capacidad digestiva y una excepcional respuesta autolítica a factores ambientales y mecánicos (Dai, 1990).

Las enzimas del grupo de las hidrolasas, particularmente las proteasas, representan al menos el 60% de las ventas globales de enzimas en el mundo. Lo anterior debido a que estos biocatalizadores poseen múltiples aplicaciones en procesos industriales como la producción de detergentes, alimentos, textiles y medicamentos (Salazar-Leyva y col., 2014). Una de sus aplicaciones, es la producción de hidrolizados de proteína, los cuales tienen alta importancia en la industria de alimentos como ingredientes funcionales. Ésta funcionalidad de los hidrolizados depende de la naturaleza y composición de los péptidos generados durante la hidrólisis (Rodríguez-Huezo y col., 2010). En el mismo contexto, para la obtención de dichas enzimas proteolíticas es necesario emplear varios pasos de bioseparación como fraccionamiento, recuperación y purificación, los cuales dependen altamente del recurso, la pureza final requerida y/o la aplicación final del producto (González-Valdez y col., 2014), por lo que es necesario realizar estudios preliminares para determinar si una proteasa puede ser de interés para la industria.

En general, las enzimas marinas ofrecen ventajas sobre las de animales terrestres o las microbianas debido a su actividad y estabilidad en condiciones de reacción extremas, tales como eficiencia catalítica y estabilidad a pH neutros y alcalinos, como resultado de la adaptación de los organismos marinos a diversas condiciones ambientales (Haard y Simpson, 2000). Posiblemente, la especie de pepino de mar cuyas enzimas han sido más ampliamente estudiadas es

Stichopus japonicus (Jiaxin, 2004; Liao, 1997), capturado en las costas de Japón y noreste de China. Contrariamente, son escasos los reportes sobre las proteasas de *Isostichopus fuscus*, una especie predominante en las costas mexicanas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de pH, temperatura, inhibidores de proteasas, y efecto de iones metálicos sobre la actividad de extractos enzimáticos obtenidos de la pared muscular de *I. fuscus*, así como identificar la proteasa de mayor actividad en el extracto.

2 Materiales y métodos

2.1 Reactivos

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma Chemicals (St. Louis, Misuri): caseína, hemoglobina, β -mercaptoetanol, pepstatina A, quimostatina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), Na-tosil-L-lisin clorometilcetona (TLCK), inhibidor de tripsina (TI), ácido etilendiamino tetra acético (EDTA), albúmina sérica bovina (BSA), ditiotreitól (DDT), iodoacetamida (IAA) y tripsina. La columna Sephadex G-25 PD-10 se obtuvo de Amersham Biosciences (Piscataway, Nueva Jersey) y los marcadores de alto peso molecular de Bio-Rad (Richmond, California). Todos los otros reactivos empleados fueron grado analítico.

2.2 Captura de los especímenes y preparación de las muestras

La captura de los especímenes y preparación preliminar de las muestras se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. Se capturaron 10 especímenes adultos de *Isostichopus fuscus* de una edad estimada de 5 a 6 años, 385 g peso promedio y 23.25 longitud promedio; dicha captura se llevó a cabo en las costas de las islas Tiburón (28°42'48.60" N; 112°17'22.81" W) y Espíritu Santo (24°24' - 24°36' N; 110°18' - 110°27' W), ambas en el Golfo de California, México. La colecta de muestra se llevó a cabo siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010), una vez obtenida la licencia de captura correspondiente (licencia número SGPA/DGVS/00616/11). Los especímenes vivos de pepino de mar se conservaron en agua de mar a 10-15°C por 24 h previo a su sacrificio y disección, separando las secciones anterior y posterior, las partes

ventral y dorsal del cuerpo y piel externa. Estas muestras se lavaron con agua destilada para eliminar residuos orgánicos y de tejidos.

2.3 Obtención de los extractos enzimáticos

La obtención y caracterización de extractos crudos se llevó a cabo en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Se homogenizaron 30 g de tejido de cada muestra con 60 mL de amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7, y se centrifugó a 10,000 g por 30 min a 4°C. El sobrenadante, conteniendo las enzimas solubles, se almacenó a -25°C hasta su análisis. Se empleó el método reportado por Lowry y col. (1951) para analizar el contenido proteico, empleando albúmina sérica bovina como estándar.

2.4 Análisis de actividad proteolítica

El análisis de actividad proteolítica de los extractos enzimáticos se llevó a cabo empleando el método reportado por Anson (1938) para proteasas ácidas, y el reportado por Kunitz (1946) para proteasas alcalinas. El análisis de proteasas ácidas se basó en la hidrólisis de hemoglobina (hemoglobina al 1%, p/v, en una solución ácida: ácido bórico 0.025 M + ácido fosfórico 0.025 M + ácido acético 0.25M). Las proteasas alcalinas se analizaron por hidrólisis de caseína (solución de caseína al 1%, p/v, en amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7). Para determinar la actividad específica del extracto, 80 μ L se hicieron reaccionar con 250 μ L de sustrato (caseína o hemoglobina); la mezcla se incubó por 15 min a una temperatura previamente determinada en la que se obtenía la actividad enzimática óptima. La reacción se detuvo con 175 μ L TCA al 25% (p/v); las muestras se centrifugaron a 10,000 g por 10 min, y la solución de péptidos obtenida se leyó a 280 nm, reportando los resultados como actividad específica (U/mg_{proteína}), donde 1 unidad de actividad proteolítica (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para cambiar la absorbancia 0.001 unidad/min a 280 nm a las condiciones experimentales definidas (Ec. 1) (Yamaguchi y col., 1983):

$$U = \frac{(Abs_{280nm})(\text{factor dilución})}{(0.001)(\text{tiempo de reacción, min})} \quad (1)$$

2.5 Efecto del pH

Se determinó el pH donde ocurre la máxima actividad a 37°C analizando el efecto hidrolítico de extractos crudos sobre sustrato de hemoglobina a pH 2 a 5,

y de caseína a pH 6 a 10, tomando como respuesta la actividad proteolítica por la metodología que se describe en el párrafo anterior. La estabilidad enzimática a diversos pH se evaluó incubando el extracto a 25°C por 1 h en los siguientes amortiguadores: KCl-HCl, 0.1 M (pH 2); Gly-HCl, 0.2 M (pH 3-4); amortiguador de fosfatos, 0.1 M (pH 5-8); Tris-HCl, 0.1 M (pH 9-10) (Fu y col., 2005). La actividad proteolítica se midió después del período de incubación por el método descrito anteriormente, determinando la actividad en las condiciones óptimas de pH y temperatura (pH 6, 60°C).

2.6 Efecto de la temperatura

La máxima actividad proteolítica se determinó en el intervalo de 0 a 70°C, al pH óptimo de actividad obtenido previamente (pH 6). La estabilidad proteolítica se estudió al incubar los extractos proteicos en el intervalo de 0 a 80°C por 1 h, y analizando la actividad proteolítica por el método descrito anteriormente. La cinética de inactivación térmica se calculó calentando los extractos a 70°C y 80°C con una subsecuente incubación por 60 min. La actividad residual se determinó a las condiciones óptimas (pH 6, 60°C) cada 10 min hasta 1 h de incubación. La constante de inactivación (Kd) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) se calcularon graficando Ln (actividad final/actividad inicial) vs. tiempo de incubación (min) (Hernández-Martínez, 2011), donde: $Kd = \text{pendiente}$; $t_{1/2} = \text{Ln}(2/Kd)$.

2.7 Efecto de la refrigeración

Los extractos proteolíticos se almacenaron a 4-5°C por 21 días, tomando muestras cada 24 h para analizar la actividad enzimática por el método descrito anteriormente. Los resultados se reportaron como actividad residual.

2.8 Efecto de algunos inhibidores de proteasas

Se estudiaron los siguientes inhibidores: PMSF (5 mM) y TLCK (10 mM) para serín proteasas; EDTA (10 mM) para metalo proteasas; TI (0.6 g/L) para tripsina; pepstatina A (1 μ M) para aspartil proteasas; β -mercaptoetanol (1 mM) para cisteín proteasas; quimostatina (0.1 mM) para otras proteasas tales como quimotripsina y cisteín proteasas lisosomales (catepsinas A, B, C, H y L). El efecto inhibitorio se analizó incubando el extracto enzimático con un

inhibidor determinado (1:1, v/v) por 1 h a 25°C (Fu y col., 2005). La actividad proteolítica se determinó a las condiciones de pH y temperatura de actividad óptima (pH 6, 60°C).

2.9 Efecto de iones metálicos

Se estudiaron los siguientes iones (10 mM): MnSO_4 , CuSO_4 , y como sales de cloro, K^+ , Ca^{2+} , Na^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , y Hg^{2+} . Los extractos proteolíticos se incubaron con los iones (1:1, v/v) por 1 h a 25°C. La actividad residual se analizó a las condiciones de pH y temperatura óptimas, por el método para la determinación de actividad proteolítica descrito anteriormente.

2.10 SDS-PAGE y zimogramas

La probable presencia de diversas enzimas se evaluó con SDS-PAGE en geles de poliacrilamida de separación al 8-10% y geles de concentración al 4-5% en celdas de electroforesis Mini-Protean II (Bio-Rad) de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). Se desnaturalizaron las proteínas del extracto mediante ebullición por 1 min. Se aplicaron 5 mg/mL de la muestra desnaturalizada y un marcador de pesos moleculares en el intervalo de 200 a 45 kDa, conteniendo miosina (200 kDa), β -galactosidasa (116.25 kDa), fosforilasa b (97.4 kDa), albúmina sérica bovina (66.22 kDa) y ovoalbúmina (45 kDa). El análisis se llevó a cabo a voltaje constante de 150 V, 30 mA, 4°C. Asimismo, los extractos proteolíticos fueron sujetos a precipitación con solución de sulfato de amonio saturada al 60%, la sal se eliminó en una columna de filtración en gel Sephadex G-25, empleando un amortiguador de fosfatos, pH 7, y se analizó por SDS-PAGE como se describió anteriormente. De igual forma, se llevó a cabo una electroforesis no desnaturalizante en gel de poliacrilamida a un amperaje constante de 15 mA/gel, 150 V, 4°C. Los geles se sumergieron por 1 h en una solución de caseína al 2%, pH 6, 4°C; se incubaron por 2 h a 60°C y finalmente se lavaron con agua destilada (García-Carreño y Haard, 1993). Todos los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 al 0.1% (p/v) en una solución 40% (v/v) metanol y 10% (v/v) ácido acético. Los densitogramas se obtuvieron leyendo los geles en un equipo Gel-Doc 2000 (Bio-Rad) acoplado con el software Quantity One, versión 4 (Bio-Rad).

2.11 Purificación de la enzima

La semipurificación se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. La proteína del extracto enzimático crudo se precipitó con solución de sulfato de amonio saturada al 60%; el precipitado se disolvió en amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7 y se dializó contra el mismo amortiguador por 12 h a 4°C. Subsecuentemente, se fraccionó por cromatografía de intercambio aniónico empleando un cartucho Econo-Pac High Q (Bio-Rad), equilibrado con Tris-HCl 25 mM, pH 8.1. La muestra se eluyó con Tris-HCl 25 mM, pH 8.1 y NaCl 0.5 M, con un flujo de 0.5 mL/min. Las fracciones con una absorbancia máxima de 280 nm se recolectaron, dializaron y concentraron. La proteína parcialmente purificada se analizó con SDS-PAGE, de la forma descrita anteriormente. Los geles se tiñeron con plata empleando un sistema de tinción comercial (Rapid-Ag-Stain, Schwarz/Mann Biotechnology, Cleveland, Ohio).

2.12 Purificación e identificación de la enzima por espectrometría de masas

La purificación e identificación de la proteasa se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. La enzima obtenida del paso anterior se purificó por cromatografía de alta resolución empleando un equipo Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Baden-Württemberg, Alemania) al que se adaptó una columna Agilent 300 Extend-C18-5 μ m (4.6 \times 250 mm), y un software Value Solution ChemStation (Agilent). Las fracciones se eluyeron con un flujo de 0.5 mL/min, en un gradiente lineal de solvente A (TFA en agua, 0.04%, v/v) en solvente B (TFA en ACN, 0.03%, v/v), con un incremento de 0 a 60% (v/v) de B en 30 min. El eluido se leyó a 214 nm empleando un detector Agilent G1314A VWD. La actividad proteolítica se analizó por el método ya descrito. Asimismo, aproximadamente 10 μ g de la enzima purificada que mostró la máxima actividad proteolítica se sometió a digestión trípica. Los puentes disulfuro se redujeron con ditioneitol (DDT) durante un tratamiento de desnaturalización a 95°C por 5 min; posteriormente se llevó a cabo una alquilación con yodoacetamida (IAA) durante 20 min en condiciones de oscuridad. Subsecuentemente, la muestra se hidrolizó con tripsina a 37°C por 5 h, inactivando la enzima por calentamiento a 95°C por 15 min. La proteína digerida se analizó por

espectrometría de masas en un equipo Agilent 1100 Series LC/MSD (G2445D) Ion Trap System (Agilent). La identificación de las proteínas se llevó a cabo empleando las bases de datos SwissProt y NCBItr adaptadas a un sistema Mascot MS/MS Ions Search ($p < 0.05$).

2.13 Diseño experimental y análisis estadístico

Las muestras se asignaron a un diseño totalmente al azar. Los resultados se analizaron por ANOVA y comparación múltiple de medias de Tukey empleando un sistema SPSS para Windows (Versión 15.0). Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado; en las tablas y figuras se reportan los valores medios. Las diferencias se aceptaron estadísticamente a $p < 0.05$.

3 Resultados y discusión

Algunas especies de pepino de mar como *Holothuria forskali* (DeMoor y col., 2003), *Holothuria glaberrima* (Quiñones y col., 2002), *Cucumaria frondosa* (Tipper y col., 2003), *Parastichopus californicus* (Liu y col., 2010) y principalmente *Stichopus japonicus* (Fu y col., 2005; Cui y col., 2007, Qi y col., 2007; Zhu y col., 2008; Sun y col., 2011) han sido objeto de estudios bioquímicos. Sin embargo, no se tienen reportes en la literatura sobre enzimas proteolíticas de *Isostichopus fuscus*.

3.1 Efecto de pH sobre la actividad proteolítica

Se llevó a cabo un análisis preliminar de la actividad proteolítica a diferente pH de extractos obtenidos a partir de seis regiones del músculo de *I. Fuscus* (Fig. 1). La piel externa ventral y el músculo ventral anterior mostraron mayor actividad proteolítica que otros extractos ($p < 0.001$). Sin embargo, la cantidad de extracto obtenido a partir de la piel externa ventral fue muy baja, insuficiente para proceder con otras pruebas, por lo que los extractos del músculo ventral anterior fueron utilizados para los análisis; la actividad proteolítica de dichos extractos no fue significativamente diferente ($p > 0.05$). Fu y col. (2006) demostraron que existe variabilidad en la actividad de las proteasas de diferentes regiones anatómicas del tracto digestivo de *S. japonicus*.

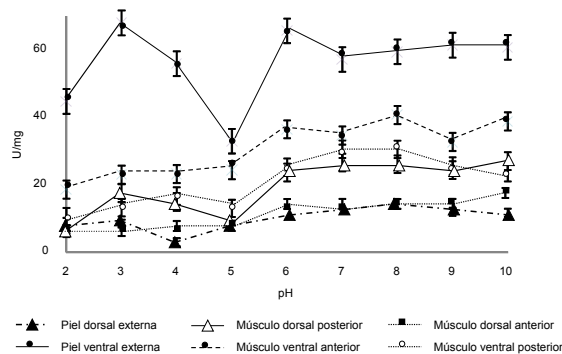


Fig. 1. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica de extractos de la piel y del músculo de *I. fuscus* (37°C).

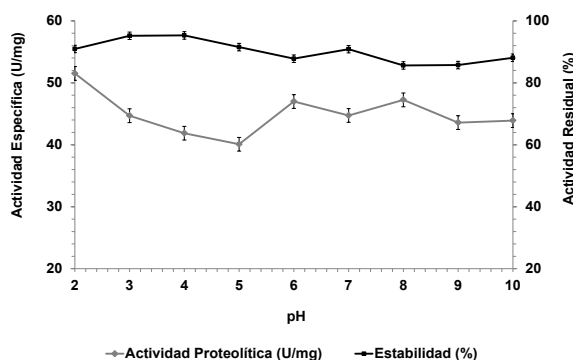


Fig. 2. Efecto del pH sobre la actividad específica y residual de extractos enzimáticos del músculo ventral de *I. fuscus*.

Se observó que la actividad proteolítica del extracto muscular ventral fue más alta ($p < 0.001$) a pH 2, 6, y 8 (37°C) (Fig. 2). Los resultados fueron similares a los informes de Qi y col. (2007), Zhu y col. (2008), Sun y col. (2011), y Wu y col. (2013b) para cisteín proteasas de *S. japonicus* con actividad óptima a pH 7 (50°C), pH 5 (37°C), pH 5.5 (40°C) y pH 6.1 (46°C), respectivamente. La actividad proteolítica máxima a pH 8, concordó con lo obtenido por Wu y col. (2013a) y Fu y col. (2005) para metalo proteasas de *S. japonicus* con actividad óptima a pH 8-9 (37°C).

La actividad proteolítica fue estable en el intervalo de pH 2-6 con 66-79% de actividad residual, excepto a pH 3, donde se perdió 48% de la actividad inicial (Fig. 2). Sin embargo, las proteasas neutras y alcalinas retuvieron de 64-74% de la actividad inicial a pH 7-10. La estabilidad proteolítica observada estuvo de acuerdo con lo reportado por los autores mencionados anteriormente, quienes informaron estabilidad a pH 4-7 para cisteín proteasas de *S. japonicus*. Por el contrario, nuestros resultados en la región alcalina

difirieron con los reportados por dichos autores quienes encontraron disminución significativa de actividad a pH básico, ya que nuestros datos muestran que las proteasas se mantuvieron estables. Sin embargo, la estabilidad en la región alcalina fue similar a la presentada por metalo proteasas gelatinolíticas de *S. japonicus* estables a pH 6-9 (Wu y col., 2013a). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que las enzimas con óptimos de actividad a pH 6 y pH 8 pueden ser similares a las cisteín y metalo proteasas de *S. japonicus*, respectivamente. El pH del hábitat en el que se desarrollan estas especies, podría influir en la actividad de sus enzimas digestivas. Wang y col. (2004) y Liu y col. (2004) encontraron que el intervalo de pH 7.5-8.4 es el óptimo para el cultivo de *S. japonicus*, con un valor máximo a pH 7.8. Mientras que Mercier y col. (2004) y Herrero-Perezrul y col. (1999) informaron un intervalo de pH 8.4-8.5 para el crecimiento de *I. fuscus*. En ambos informes, se observa que es necesario un ambiente ligeramente alcalino para el desarrollo de estos holotúridos. Muchos factores tales como características fisiológicas, temperatura, clima, régimen nutricional, y componentes bioquímicos específicos, se pueden utilizar para explicar los cambios en la actividad de proteasas digestivas (Fu y col., 2006).

3.2 Efecto de temperatura sobre la actividad proteolítica

La máxima actividad ($p < 0.001$) se observó a 50-60°C (Fig. 3), lo cual estuvo de acuerdo con los resultados reportados por Qi y col. (2007) y Zhu y col. (2008), quienes mencionaron 50°C como temperatura óptima de actividad para proteasas de *S. japonicus*. Por otro lado, los resultados demostraron actividad proteolítica de 0 a 10°C. Sin embargo, no es posible comparar con estudios previos debido a que se ha evaluado la actividad proteolítica a temperatura mayor a 20°C. No obstante, la literatura ha demostrado que las proteasas marinas son altamente eficientes a baja temperatura (Haard y Simpson, 2000).

El extracto enzimático presentó estabilidad de 0 a 40°C, manteniendo cerca de 100% de actividad residual. Se calcularon parámetros cinéticos de inactivación térmica (Fig. 4). Los extractos calentados durante 1 h a 70°C y 80°C retuvieron más de 74% de la actividad inicial después de 60 min de incubación, con vida media de 3.5 h y 2.5 h, respectivamente (Tabla 1). Esta característica fue similar a lo reportado para diferentes proteasas inmovilizadas (con esferas

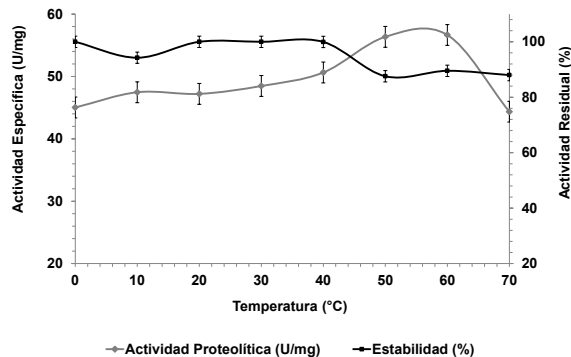


Fig. 3. Efecto de la temperatura sobre la actividad específica y residual de extractos enzimáticos del músculo ventral de *I. fuscus*.

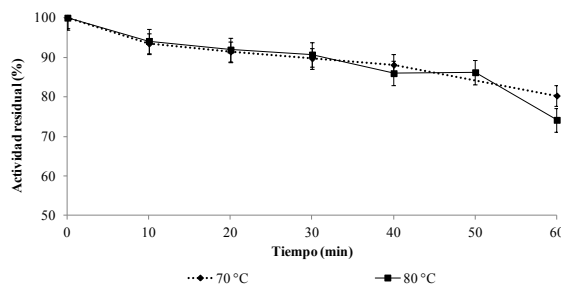


Fig. 4. Cinética de inactivación térmica de extracto enzimático del músculo ventral de *I. fuscus* incubado a 70 y 80°C

Tabla 1. Constante de inactivación (Kd) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de extractos de músculo ventral de *I. fuscus*, incubados a 70 y 80 °C por 1 h (pH 6, 60 °C)

Temperatura (°C)	Kd	$t_{1/2}$ (h)	R ²
70	-0.0033	3.50	0.9556
80	-0.0046	2.51	0.9398

de quitosano activadas con glutaraldehído) con mayor estabilidad a la temperatura que en su forma soluble (Salazar-Leyva y col., 2014). Este comportamiento puede ser debido a las condiciones fisicoquímicas del entorno en el que la especie evolucionó. El pepino de mar *S. japonicus* utilizado en los estudios mencionados anteriormente fue obtenido de las costas de Bohai y del mar Amarillo, en China, donde la temperatura superficial del agua es de 3-4°C en invierno y de 24-26°C en verano; mientras que los especímenes de *I. fuscus* empleados en el presente estudio fueron extraídos del Golfo de California,

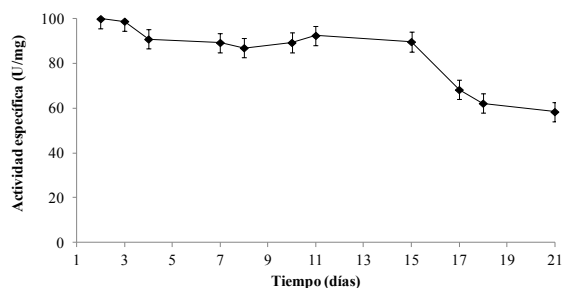


Fig. 5. Efecto del almacenamiento a 4-5°C en la actividad residual del extracto enzimático del músculo ventral de *I. fuscus*.

México, donde la temperatura del agua superficial oscila entre 8-12°C en invierno y más de 30°C en verano (Bernal y col., 2001; Lluch y col., 2007). Gao y col. (2009) mostraron que la actividad proteolítica puede ser afectada por la temperatura del agua en la que se cultivan los pepinos de mar *Apostichopus japonicus*. Además, se ha demostrado que la estabilidad térmica de tripsinas de peces varía dependiendo de la especie (Shahidi y col., 2001). En consecuencia, los resultados sugieren la presencia de enzimas resistentes a altas temperaturas.

Por otra parte, el extracto proteolítico fue estable al ser almacenado en refrigeración ya que se observó 59% de actividad residual después de 21 días a 4-5°C (Fig. 5). Otras enzimas marinas se ven afectadas considerablemente en esta condición. Los extractos enzimáticos obtenidos del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) mostraron actividad proteolítica de 20 a 40 U/mL a 4°C en comparación con la máxima actividad a 35°C (40-75 U/mL) (Dublán y col., 2006). Al igual que otros poiquilótermos, la temperatura en los pepinos de mar varía según las condiciones ambientales, debido a la falta de mecanismos de regulación térmica. Por lo tanto, ocurren modificaciones estructurales en las proteínas de estos animales para evitar los efectos de la temperatura, lo que no se sucede en especies de sangre caliente (Foegeding y col., 2000).

3.3 Efecto de inhibidores de proteasas sobre la actividad proteolítica

A fin de caracterizar en forma preliminar el tipo de enzimas que se encuentran en el músculo ventral de *I. fuscus*, se probaron siete inhibidores de proteasas a pH 6, comparados con una muestra control (Tabla 2). Se obtuvo 68% de actividad residual con pepstatina A, inhibidor de

Tabla 2. Actividad residual de extractos enzimáticos de músculo ventral de *I. fuscus* tratados con inhibidores de proteasas.

Inhibidor	Concentración	Actividad residual (%)
Control		100
PMSF	5 mM	77.18
TLCK	10 mM	96.74
TI	0.6 g/L	80.32
TI (pH 8)	0.6 g/L	54.4
EDTA	10 mM	76.79
EDTA (pH 8)	10 mM	40.51
Pepstatina A	1 µg/mL	68.02
β-mercaptoetanol	1 mM	75.90
quimostatina	0.1 mM	79.61

aspartil proteasas, seguido de β-mercaptoetanol (75.9%), inhibidor de cisteín proteasas, EDTA (76.8%), inhibidor de metalo proteasas, y PMSF (77.2%), inhibidor de serín proteasas. Nuestros resultados concordaron con Qi y col. (2007) y Zhu y col. (2008) quienes informaron la inhibición de cisteín proteasas de *S. japonicus*. Los inhibidores de serín proteasas pueden interactuar con proteasas que contienen residuos de histidina cerca del sitio activo (Aranishi y col., 1997), como es el caso de las cisteín proteasas, lo que explicaría la alta inhibición mostrada por PMSF. Se probaron a pH 8 los efectos de TI y EDTA, obteniéndose valores de actividad residual de 54.4% y 40.5%, respectivamente (Tabla 2). Los resultados fueron análogos a lo obtenido por Wu y col. (2013a) y Fu y col. (2005) para metalo proteasas de *S. japonicus*, inhibidas fuertemente por EDTA. Wu y col., (2013b) demostraron que la hidrólisis de proteínas no colágenas de *S. japonicus* no fue totalmente ocasionada por cisteín proteasas. Por otra parte, los autores mencionados no estudiaron el efecto de inhibidores de aspartil proteasas (Marcial y col., 2011), por lo que no fue posible descartar la presencia de estas proteasas en *I. fuscus*. Por lo tanto, con base a los resultados experimentales y a los reportes en la literatura, se sugiere la presencia de varios tipos de proteasas en el extracto muscular de *I. fuscus*, predominantemente aspartil, cisteín y metalo proteasas.

3.4 Efecto de iones sobre la actividad proteolítica

Las proteasas del extracto del músculo retuvieron 42% y 59% de actividad inicial en presencia de

Tabla 3. Efecto de algunos iones metálicos (10 mM) en la actividad residual de extractos enzimáticos de músculo ventral de *I. fuscus*

Ion	Actividad Residual (%)
Control	100
Cl ⁻	80.12
Na ⁺	97.99
Zn ⁺	84.09
Mn ²⁺	59.01*
Cu ²⁺	41.93*
Ca ²⁺	89.39
Mg ²⁺	95.09
Ba ²⁺	88.53
Hg ²⁺	115.74*

*Diferencia significativa ($p < 0.05$).

Cu²⁺ y Mn²⁺, respectivamente, mientras que se observó un efecto parcial con actividades residuales de entre 80% a 88.5% de los siguientes iones, en orden decreciente: Ba²⁺ > Zn⁺ > Cl⁻. Se observaron actividades residuales de 89% a 98%, no significativas, de los siguientes iones en orden decreciente: Na⁺ > Mg²⁺ > Ca²⁺. Finalmente, Hg²⁺ aumentó la actividad proteolítica 16% (Tabla 3). Se ha reportado que algunos iones como Cu²⁺ pueden tener afinidad por grupos sulfhidrilo e inactivar específicamente a proteínas, como cisteín proteasas (Aranishi y col., 1997). Adicionalmente, el efecto de Cu²⁺ y Mn²⁺ fue similar a lo obtenido por Qi y col., (2007) y Zhu y col. (2008b) para cisteín proteasas de *S. japonicus*. Por lo tanto, se sugirió la presencia de cisteín proteasas en el extracto muscular de *I. fuscus*. Por otro lado, el aumento de actividad en presencia de Hg²⁺ puede estar relacionado con el mecanismo de activación de la matriz metaloproteína (MMP), que es una familia de enzimas peptidasas que contribuyen a regular el comportamiento celular mediante la degradación de componentes de la matriz extracelular (colágeno, gelatina) (Nagase y col., 1999). Se ha reportado que la MMP puede ser activada por proteasas o *in vitro* por agentes químicos como HgCl₂ (Visse y Nagase, 2003).

3.5 Análisis electroforético

Se observó una banda predominante a 180.6 kDa en extractos crudos del músculo ventral de *I. fuscus* por SDS-PAGE, mientras que los extractos precipitados con (NH₄)₂SO₄ saturado al 60% mostraron tres bandas adicionales de 114.5, 91.7 y 52.9 kDa (Fig.

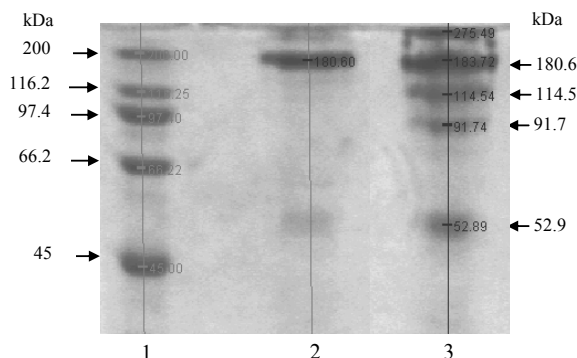


Fig. 6. SDS-PAGE de extractos enzimáticos del músculo ventral de *I. fuscus*. 1. Marcadores; 2. Extracto crudo; 3. Extracto precipitado [60% (NH₄)₂SO₄].

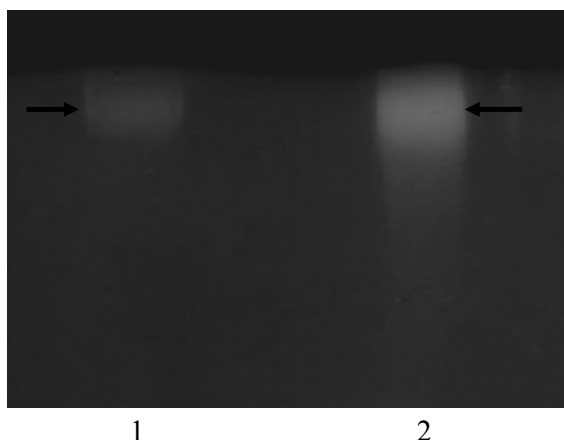


Fig. 7. Zimograma del extracto enzimático del músculo ventral de *I. fuscus*. 1. Extracto crudo; 2. Extracto precipitado [60% (NH₄)₂SO₄].

6). El perfil electroforético fue similar al reportado por Sun y col. (2011) y Zhu y col. (2008) para cisteín proteasas de *S. japonicus*, y con Wu y col. (2013a) para metalo proteasas del mismo organismo. Nuestros resultados sugirieron la presencia de enzimas de alto peso molecular en los extractos, similar a las identificadas en *S. japonicus* (Fu y col., 2005). Los zimogramas con sustrato de caseína confirmaron la presencia de enzimas proteolíticas (Fig. 7).

3.6 Purificación parcial del extracto

El extracto proteolítico estudiado se purificó parcialmente con un factor de purificación de 10.5 y un porcentaje de recuperación global de 3% (Tabla 4). El extracto parcialmente purificado mostró una proteína de aproximadamente 49 kDa por tinción con

Tabla 4. Esquema de purificación de proteasas a partir de músculo ventral de *I. fuscus*.

Etapa de purificación	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (unidades de actividad recuperadas, %)
Extracto crudo	75475.0	116.3	648.7	1.0	100.0
Fracción (NH ₄) ₂ SO ₄	2340.0	3.42	684.2	1.1	3.1
Cartucho Econo-Pac High Q	2277.5	0.33	6827.3	10.5	3.0
HPLC- C ₁₈	342.7	0.02	17251.7	26.6	0.5

Tabla 5. Proteasas identificadas músculo ventral de *I. fuscus*, identificadas por LC-MS/MS

Identidad de la proteína	Base de datos	Taxonomía	Valor (score)	Masa nominal/ pI calculado	Secuencia cubierta (%)	Similitud (match)
Cadena E complejo inhibidor de tripsina (LDTI)	NCBI Inr gi— 3318722	<i>Sus scrofa</i>	83	23457 / 8.26	8	3
Tripsina	SwissProt	<i>Sus scrofa</i>	60	24394 / 7.00	7	3

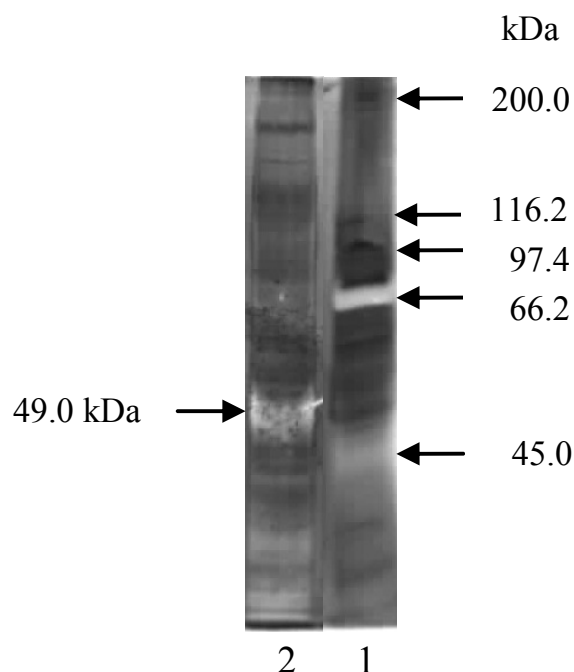


Fig. 8. SDS-PAGE de proteína parcialmente purificada por cromatografía de intercambio aniónico del músculo ventral de *I. fuscus*. Tinción en plata. 1. Marcadores; 2. Proteína parcialmente purificada.

plata en SDS-PAGE (Fig. 8). El peso molecular estimado de las proteínas presentes fue similar a lo

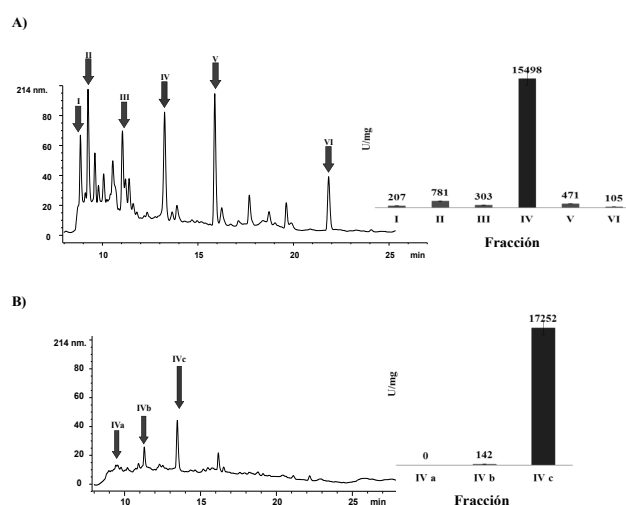


Fig. 9. Cromatogramas (HPLC) y actividad proteolítica de proteasa parcialmente purificada del músculo ventral de *I. fuscus*. A) proteasas purificadas; B) proteasa de referencia (proteasa IV).

reportado por Wu y col. (2013a) para metalo proteasas gelatinolíticas de *S. japonicus* de 45 kDa.

3.7 Purificación e identificación de proteínas por espectrometría de masas

El extracto parcialmente purificado se purificó por HPLC obteniéndose seis proteínas con alta

concentración. La proteasa número cuatro (IV) tuvo la mayor actividad proteolítica ($p < 0.001$) (15 498 U/mg) (Fig. 9A) por lo que fue seleccionada para estudios posteriores. Esta proteasa fue purificada y recolectada (IVc) (17 251.7 U/mg) (Fig. 9B) presentando un factor de purificación de 26.6 y una baja recuperación global de 0.5% (Tabla 4). Dicha proteasa (IVc) se analizó por espectrometría de masas. Los resultados mostraron homología con tripsina y cadena E, complejo inhibidor de triptasa (LDTI) (Tabla 5). La identificación de péptidos concordó con lo reportado por Sun y col. (2011), quienes purificaron una catepsina B (cisteína proteasa) de *S. japonicus* que no mostró ninguna homología con las catepsinas descritas anteriormente, por lo que concluyeron que puede ser un nuevo tipo de proteasa.

Conclusiones

Las proteasas marinas tienen características únicas que pueden estar relacionadas con el medio ambiente en el que las especies habitan. Contrario a la abundancia de estudios sobre *S. japonicus*, no se han estudiado las proteasas de *I. fuscus*. Los extractos enzimáticos obtenidos a partir del músculo y de la piel de este holotúrido presentaron considerable actividad proteolítica. Los extractos musculares ventrales fueron los más activos. Por SDS-PAGE y los zimogramas de hidrólisis de caseína confirmaron la presencia de proteasas, estables dentro de los intervalos de pH y temperatura estudiados (pH 2 a 10; 0 a 70°C). Se observó resistencia a la desnaturalización por calentamiento y estabilidad a almacenamiento en refrigeración. El efecto de iones e inhibidores específicos sugirió la presencia de cisteína y metalo proteasas. Los resultados sugieren que las proteasas de *I. fuscus* son similares a las enzimas que se encuentran en *S. japonicus* pero con mayor estabilidad a pH, calentamiento y bajas temperaturas. Al no encontrarse homología con metalo proteasas ya descritas, se propone que la proteasa de mayor actividad es un miembro no reportado de esta familia.

Agradecimientos

Arisaí C. Hernández-Sámano agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) una beca de postgrado con la cual curso los programas de Maestría y Doctorado en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Referencias

- Anson, M.L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology* 22, 79-89.
- Aranishi, F., Hara, K., Osatomi, K., y Ishihara, T. (1997). Purification and characterization of cathepsin B from hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 118, 531-537.
- Bernal, G., Ripa, P., y Herguera, J.C. (2001). Oceanographic and climatic variability in the lower Gulf of California: Links with the tropics and north. *Journal of Marine Science* 27, 595-617.
- Bordbar, S., Anwar, F., y Saari, N. (2011). High-Value Components and Bioactives from Sea Cucumbers for Functional Foods-A Review. *Marine Drugs* 9, 1761-1805.
- Chang, Y., Yu, C. y Songxin. (2004). Pond culture of sea cucumbers, *Apostichopus japonicus*, in Dalian. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper* 463, 269-272.
- Cui, F., Xue, C., Li, Z., Zhang, Y., Dong, P. y Fu, X. (2007). Characterization and subunit composition of collagen from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Food Chemistry* 100, 1120-1125.
- Dai, Z. (1990). A review on autolysis in fish. *Journal of Zhejiang College of Fisheries* 9, 51-56.
- Daniel, R.M., Toogood, H.S. y Bergquist, P.L. (1995). Thermostable proteases. *Biotechnology and Genetic Engineering* 13, 50-100.
- Deichmann, E. (1958). The Holothuroidea collected by The Velero II and IV during the years 1932 to 1954. Part II. Aspidochirota. *Allan Hancock Pacific Expedition* 2, 253-348.
- DeMoor, S., Waite, J.H., Jangoux, M. y Flammang, P. (2003). Characterization of the adhesive from Cuvierian tubules of the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothuroidea). *Marine Biotechnology* 5, 45-57.
- Dublán, O., Salazar, A., Cruz-Camarillo, R., Guerrero-Legarreta, I. y Ponce, E. (2006). Effect of refrigerated storage on proteolytic

- activity, physicochemical and microstructural properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle. *Journal of Muscle Foods* 17, 291-310.
- Foegeding, E.A., Lanier, T.C. y Hultion, H.O. (2000). Características de los tejidos musculares comestibles. En: *Química de los Alimentos*, (O.R. Fennema ed.). Acirbia, Zaragoza, España.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2010). Managing sea cucumber fisheries with an ecosystem approach. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper* 520.
- Fu, X., Xue, C., Miao, B., Li, Z., Gao, X. y Hirata, T. (2006). Distribution and seasonal activity variation of proteases in digestive tract of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Fisheries Science* 72, 1130-1132.
- Fu, X., Xue, C., Miao, B., Li, Z., Gao, X. y Yang, W. (2005). Characterization of proteases from the digestive tract of sea cucumber (*Stichopus japonicus*): High alkaline protease activity. *Aquaculture* 246, 321-329.
- Gao, F., Yang, H., Xu, Q., Wang, F. y Liu, G. (2009). Effect of water temperature on digestive enzyme activity and gut mass in sea cucumber *Apostichopus japonicas* (Selenka), with special reference to aestivation. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 27, 714-722.
- García-Carreño, F.L. y Haard, N.F. (1993). Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *Journal of Food Biochemistry* 17, 97-113.
- González-Valdez, J., Mayolo-Deloisa, K., González-González, M., Rito-Palomares M. (2014). Trends in bioseparations. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 19-27.
- Haard, N. y Simpson, B. (2000). *Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*. Editorial Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Hernández-Martínez, R., Gutiérrez-Sánchez, G., Bergmann, C.W., Loera-Corral, O., Rojo-Domínguez, A. y Huerta-Ochoa, S. (2011). Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochemistry* 46, 2001-2006.
- Herrero-Perezrul, M.D., Reyes-Bonilla, H., García-Domínguez, F. y Cintra-Buenrostro, C.E. (1999). Reproduction and growth of *Isostichopus fuscus* (Echinodermata: Holothuroidea) in the southern Gulf of California, Mexico. *Marine Biology* 135, 521-532.
- Jiixin, C. (2004). Present status and prospects of sea cucumber industry in China. *Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper* 463.
- Kunitz, M. (1946). Crystalline soybean trypsin inhibitor II. *Journal of General Physiology* 30, 291-310.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structure proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lawrence, J.M. (1982). Digestion. En: *Echinoderm nutrition*, (J.M. Lawrence, M. Jangoux eds). Pp. 283-316. Balkema, Rotterdam.
- Liao, Y.L. (1997). Fauna Sinica, Phylum Echinodermata, Class Holothuroidea. *Science Press, Beijing, China* 334.
- Liu, X., Zhu, G., Zhao, Q., Wang, L. y Gu, B. (2004). Studies on hatchery techniques of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper* 463, 287-296.
- Liu, Z., Oliveira, A.C.M. y Yi-Cheng, S. (2010). Purification and characterization of pepsin-solubilized collagen from skin and connective tissue of giant red sea cucumber (*Parastichopus californicus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 1270-1274.
- Lluch-Cota, S.E., Aragon-Noriega, E.A., Arreguin-Sanchez, F., Auriolles-Gamboa, D., Bautista-Romero, J.J., Brusca, R.C., Cervantes-Duarte, R., Cortes-Altamirano, R., Del-Monte-Luna, P., Esquivel-Herrera, A., Fernandez, G., Hendrickx, M.E., Hernandez-Vazquez, S., Herrera-Cervantes, H., Kahru, M., Lavin, M., Lluch-Belda, D., Lluch-Cota, D.B.,

- Lopez-Martinez, J., Marinone, S.G., Nevarez-Martinez, M.O., Ortega-Garcia, S., Palacios-Castro, E., Pares-Sierra, A., Ponce-Diaz, G., Ramirez-Rodriguez, M., Salinas-Zavala, C.A., Schwartzlose, R.A. y Sierra-Beltran, A.P. (2007). The Gulf of California: review of ecosystem status and sustainability challenges. *Progress in Oceanography* 73, 1-26.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. y Farr, A.L. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Ludwig, H.L. (1875). Beitrage zur Kenntniss der Holothurien. *Arbeiten aus dem Zoologisch-Zoatomischen Institut in Wurzburg* 2, 77-120.
- Maluf, L.Y. (1988). Composition and distribution of the Central Eastern Pacific echinoderms. *Natural History Museum of Los Angeles County Technical Representative* 2, 1-242.
- Marcial J., Pérez de los Santos A.I., Fernández F.J., Díaz-Godínez G.D, Montiel-González A.M. y Tomasini A. (2011). Characterization of an aspartic protease produced by *Amylomyces rouxii*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10, 9-16.
- Mercier, A., Ycaza, R. y Hamel, J.F. (2004). Aquaculture of the Galápagos sea cucumber, *Isostichopus fuscus*. *Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper* 463, 347-358.
- Nagase, H. y Woessner Jr., J.F. (1999). Matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry* 274, 21491-21494.
- Qi, H., Dong, X.P., Cong, L.N., Gao, Y., Liu, L. y Mikiro, T. (2007). Purification and characterization of a cysteine-like protease from the body wall of the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 33, 181-188.
- Quiñones, J.L., Rosa, R., Ruiz, D.L., y García, J.E. (2002). Extracellular matrix remodeling and metalloproteinase involvement during intestine regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *Developmental Biology* 250, 97-181.
- Rodríguez-Huezo M.E., Villagómez-Zavala D.L., Lozano-Valdés B. y Pedroza-Islas R. (2010). Surface properties of maize, fish and bovine serum protein hidrolysates. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 9, 241-250.
- Salazar-Leyva J.A., Lizardi-Mendoza J., Ramírez-Suarez J.C., García-Sánchez G., Ezquerra-Brauer J.M., Valenzuela-Soto E.M., Carvallo-Ruiz M.G., Lugo-Sánchez M.E. y Pacheco-Aguilar R. (2014). Utilization of chitin and chitosan based materials for protease immobilization: Stabilization effects and applications. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 129-150.
- Salgado-Castro, L.R. (1993). Sea cucumber fisheries of the Pacific Coast (*Parastichopus parvimensis*) and *P. californicus* and *Isostichopus fuscus*, from the Gulf of California. *National Fisheries Institute. Ministry of Fisheries* 114.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (2010). NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Dirección General de Vida Silvestre, México.
- Shahidi, F. y Janak-Kamil, Y.V.A. (2001). Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science and Technology* 12, 435-464.
- Sun, L.M., Zhu, B.W., Wu, H.T., Yu, L., Zhou, D.Y., Dong, X., Yang J.F., Li D.M., Ye W.X. y Murata Y. (2011). Purification and characterization of cathepsin B from the gut of the sea cucumber (*Stichopus japonicus*). *Food Science and Biotechnology* 20, 919-925.
- Tipper, J.P., Lyons-Levy, G., Atkinson, M.A.L., y Trotter, J.A. (2003). Purification, characterization and cloning of tensilin, the collagen-fibril binding and tissue-stiffening factor from *Cucumaria frondosa* dermis. *Matrix Biology* 21, 625-635.
- Visse, R., y Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. *Circulation Research* 92, 39-827.
- Wang, F. (1997). Nutrient analysis of frozen sea cucumber (*Acaudina molpadioides*) East China Sea. *Journal of Marine Science* 15, 65-67.

- Wang, R., y Cheng, Y. (2004). Breeding and culture of the sea cucumber *Apostichopus japonicas*, Liao. *Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 463*, 277-286.
- Wu, H.L., Hu, Y.Q., Shen, J.D., Cai, Q.F., Liu, G.M., Su, W.J. y Cao, M.J. (2013a). Identification of a novel gelatinolytic metalloproteinase (GMP) in the body wall of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) and its involvement in collagen degradation. *Process Biochemistry* 48, 871-877.
- Wu, H.T., Li, D.M., Zhu, B.W., Sun, J.J., Zheng J., Wang, F.L., Konno, K. y Jiang X. (2013b). Proteolysis of noncollagenous proteins in sea cucumber, *Stichopus japonicus*, body wall: Characterization and the effects of cysteine protease inhibitors. *Food Chemistry* 141, 1287-1294.
- Yamaguchi, T., Yashita, Y., Takeda, I., y Kiso, H. (1983). Proteolytic enzymes in green asparagus kiwi fruit and miut: Occurrence and partial characterization. *Agricultural and Biological Chemistry* 46, 1983-1986.
- Zhu, B.W., Zhao, L.L., Sun, L.M., Li, D.M., Murata, Y., Yu, L. y Zhang, L. (2008). Purification and characterization of a cathepsin L-like enzyme from the body wall of the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72, 1430-1437.