



XX REUNIÓN CIENTÍFICA-TECNOLÓGICA FORESTAL Y AGROPECUARIA TABASCO
22 y 23 de abril de 2008, Villahermosa, Tab.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE AMINOPEPTIDASA (tcAPE) Y AMPLIFICACIÓN DE cDNA DE GENES APE DURANTE LOS PROCESOS DE FERMENTACIÓN Y GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.).

* Aguilar Roman, L.; Álvarez Jiménez, L.; González Cruz, M.; Bautista Muñoz, C.
Área de Ciencia de Alimentos e Ingeniería. Colegio de Postgraduados campus Tabasco. Periférico Carlos A. Molina Km 3.5, Carr. Cárdenas-Huimanguillo. H. Cárdenas, Tab. C.P. 86500. Tabasco, Mex. Tel: 01937-3724099 Ext. 5012 Fax: 01-937-3722297. cbautistam@colpos.mx

INTRODUCCIÓN

Theobroma cacao L., (cacao) es una planta perenne que pertenece a la familia Esterculiaceae y es cultivada por sus granos, los cuales son usados para la elaboración del chocolate y manteca de cacao (López-Andrade y col. 2003). En las semillas dicotiledóneas, como en el caso del cacao, la degradación de proteínas de reserva (albúmina y globulina), da lugar a la acumulación de aminoácidos libres en los cotiledones (Voigh y col., 1994). La aminopeptidasa (tcAPE) es una enzima que se ha involucrado en la formación de los precursores del aroma del cacao generados durante el proceso de fermentación (Hanse y col., 1998). Sin embargo, hasta el momento, no se conocen los genes que codifican para dicha actividad. El objetivo del presente trabajo, es determinar los niveles de actividad enzimática de tcAPE, durante los procesos de germinación y fermentación de la semilla de cacao, así como aislar de fragmentos de cDNA de los posibles genes codificantes.

OBJETIVO

Determinación bioquímica y aislamiento de fragmentos de cDNA de los posibles genes codificantes de proteasas con actividad de aminopeptidasa (tcAPE) presentes en la semilla de *T. cacao* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon semillas de cacao criollo almendra blanca desprovistas de mucilago, las cuales fueron germinadas en el sustrato inerte agrolita (Hansen et al., 1998) y fermentadas en cajas de cedro (López et al., 2003). Las semillas fermentadas y germinadas fueron molidas con nitrógeno líquido, siguiendo el protocolo descrito por Hansen y col., (1998). Los polvos secos de acetona, fueron preparados de acuerdo a Hansen y col., (1998) y sirvieron como fuente de enzima para la determinación de la actividad enzimática de tcAPE (Hansen y col. 1998). La actividad enzimática de tcAPE fue determinada con 100 µl de extracto enzimático; 370 µl de regulador (Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0, Triton X-100 al 1%); 30 µl del sustrato cromogénico Leucina-p-NA (H-Leu-pNA) a una concentración de 10 mM. La mezcla fue agitada en vortex, incubada a 37 °C en baño de agua durante 30 minutos. A continuación, la reacción fue detenida con 400 µl de ZnSO₄ al 5 % y 100 µl de Ba (OH)₂ al 7.5%, seguido de agitación en vortex y centrifugación a 13,201 x g durante 10 minutos. La p-nitroanilina liberada fue leída a una longitud de onda de 405 nm, en un Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25. Una **unidad de actividad enzimática de tcAPE** se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µmol de p-nitroanilina por min a 37°C y pH 7.0. El RNA total, fue extraído siguiendo la técnica descrita por Da Silva Gesteira y col., (2003). La búsqueda de secuencias nucleotídicas de DNA, codificantes de enzimas con actividad APE descritas en otros organismos (bacterias, levaduras, hongos y plantas), fue realizada accediendo a la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los alineamientos múltiples fueron realizados y analizados con los programas Clustalx versión 1.8 (Thompson et al., 1997) y GeneDoc versión 2.3 (Nicholas y Nicholas, 1997). El alineamiento gráfico mostró las regiones con un alto grado de identidad y permitió el diseño de iniciadores degenerados para la amplificación de los extremos 3 y 5 del cDNA por la técnica RACE 3 (Rapid Amplification of cDNA Ends) de los posibles genes APE expresados durante los procesos de germinación y fermentación de la semilla de *T. cacao*. Los fragmentos de cDNA amplificados están siendo enviados a secuenciar para su posterior análisis bioinformático.



RESULTADOS

La actividad de tcAPE esta presente durante el proceso de fermentación, observándose una disminución progresiva a partir del día 2 hasta el día 6, con una actividad residual del 21.88%. La actividad específica de tcAPE es altamente significativa. El día 1 presento la mayor actividad y el día 6 resulto ser el de menor actividad de tcAPE. La actividad de tcAPE esta presente durante el proceso de germinación, la cual empieza a disminuir a partir del día 3. Existe diferencia altamente significativa entre las actividades específicas de tcAPE a lo largo de los 15 días de germinación. Siendo el día 2 el de mayor actividad y el día 13 el de menor. Se encontraron 9360 secuencias APE descritas, de las cuales 150, 70, 94 y 72 secuencias de DNA pertenecen a bacterias, hongos, animales y plantas, respectivamente. Los alineamientos múltiples permitieron construir un dendograma, mismo que agrupó a las secuencias de plantas con mayor homología. Las secuencias de DNA de APE de plantas depositadas en la base de datos de la NCBI, presentan regiones conservadas, mismas que permitieron diseñar 6 oligos degenerados para la amplificación de los extremos 3 y 5 del cDNA obtenido a partir del RNA total de los posibles genes APE expresados durante los procesos de germinación y fermentación de la semilla de *T. cacao*. Los fragmentos amplificados por las técnicas de RACE 3 y 5 tienen un tamaño de 400 pb aproximadamente, y se están enviando a secuenciar al INSP, y realizar el posterior análisis bioinformático..

DISCUSIÓN

Para el desarrollo de este trabajo, se tomo como base, la metodología propuesta por Hansen y col., (1998). En este contexto, se procedió a la remoción de los polifenoles, lo cual es esencial para la cuantificación confiable de las actividades enzimáticas. Todas las actividades enzimáticas fueron analizadas en los cotiledones, empleando el mismo conjunto de muestras de polvos secos de cotiledones, provenientes de las semillas fermentadas del genotipo criollo almendra blanca, cultivado en el Estado de Tabasco. Para analizar los niveles enzimáticos iniciales (tiempo 0 h de la fermentación) de cada una de las enzimas analizadas, se tomaron muestras de semillas no fermentadas. Es importante mencionar, que las semillas de cacao no fermentadas presentaron niveles importantes de actividad enzimática específica de tcAPE. Sobre la tcAPE, Hansen y col., (1998), ha reportado que esta enzima es muy sensible al proceso de fermentación, debido a que solamente el 5% de la actividad es retenida después de dos días de fermentación. Sin embargo, los datos obtenidos en este trabajo, indican que la tcAPE es una enzima relativamente termoestable. Dado que hasta el momento no se han descritos los genes responsables de la actividad de tcAPE en *T. cacao*, el análisis bioinformático, nos indicará si las secuencias obtenidas, podrían pertenecer a genes con dicha actividad.

CONCLUSION

Se determino la presencia de actividad de APE durante los procesos de fermentación y germinación de la semilla de cacao, con diferencias altamente significativas. Durante el proceso de fermentación, el día 1, resultó ser el de mayor actividad de tcAPE. Durante el proceso de fermentación, el día 2, resultó ser el de mayor actividad de tcAPE. Los fragmentos de cDNA de posibles genes tcAPE, pudieron ser amplificados por la técnica de RACE 3 y 5 (Rapid Amplification of cDNA Ends 3 y 5) y el uso de iniciadores degenerados, diseñados a partir de secuencias APE's previamente descritas en plantas.

LITERATURA CITADA

- Biehl, B., E. Brunner, D. Passern, V. C. Quesnel, y D. Adomako. 1985. Acidification, proteolysis and flavour potencial in fermentating cocoa beans. *J. Sci. Food Agric.* 36:583-598.
- Hansen, C. E., M. del Olmo y C. Burri. 1998. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 77:273-281.
- López-Andrade, P. A., V. H. Delgado-Nuñez, y A. Azpeitia-Morales. 2003. El cacao (*Theobroma cacao* L.) en Tabasco. INIFAP-Huimanguillo, México.
- Voigt, J., H. Enrich, G. Voigt. Y B. Biehl. 1994b. Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds. *Food Chem.* 50:177-184.