



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS**  
Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

**Proteasas Digestivas del Insecto *Rhyzopertha dominica* (F.) Desarrollado  
en Diferentes Variedades de Trigos Hexaploides**

**TESIS**

que como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**

Presenta:

**M.C. Pablo Sergio Osuna Amarillas**

**Hermosillo, Sonora**

**Junio de 2013**

## RESUMEN

Los insectos dañan a las semillas para alimentarse utilizando su sistema enzimático digestivo que incluye proteasas y amilasas, entre otras enzimas. Actualmente es poca la información que se tiene sobre las características bioquímicas y cinéticas de la actividad proteolítica digestiva del insecto, además que se desconocen los mecanismos que utiliza para adaptarse al efecto inhibitorio que ejercen ciertos componentes de las semillas sobre la actividad de sus proteasas digestivas. En el presente trabajo se llevó a cabo la caracterización bioquímica y cinética de la actividad de las proteasas extraídas del tracto digestivo del insecto *Rhyzopertha dominica*. Además, se determinó el efecto de la variedad de trigo en la cual se desarrolló el insecto sobre su actividad proteolítica digestiva. El extracto proteolítico del tracto digestivo del insecto fue parcialmente purificado utilizando cromatografía de interacción hidrofóbica con fenil-sefarosa CL-4B. Por medio de zimografía en gel de poliacrilamida se observaron ocho bandas con actividad caseinolítica las cuales mostraron pesos moleculares en el rango de los 22 a 51.3 kDa. De acuerdo a los ensayos de inhibición, siete bandas presentaron actividad tipo tripsina. La actividad proteolítica se detectó en el rango de pH 6 a 11 observándose la máxima actividad a pH 8 y 10. La temperatura óptima de actividad fue 50 °C utilizando BApNA como sustrato. La fracción de albúminas del trigo variedad Kronstad suprimió totalmente *in vitro* la actividad proteolítica del extracto enzimático. Además mediante ensayos cinéticos se obtuvieron los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  de 0.07 mM y 2.8 mM/min, respectivamente, utilizando BApNA como sustrato. Experimentos de cinética de inhibición produjeron valores de  $IC_{50}$  y de  $K_i$  de 0.02  $\mu$ M y  $1.17 \times 10^{-8}$  M, respectivamente, utilizando el inhibidor SBTI. Asimismo la energía de activación  $E_a$  para el sustrato BApNA fue de 33.5 kJ/mol.

Mediante estudios de reproducción del insecto por varias generaciones se observaron cambios en el patrón de proteasas de las generaciones de progenies obtenidas. Al determinar el efecto de la variedad de trigo sobre la actividad proteolítica digestiva del insecto, se observó un incremento en la misma conforme emergieron las nuevas generaciones. La actividad proteolítica de las nuevas generaciones del insecto mostraron valores mayores en pH temperatura óptima que las registradas en extractos de progenitores. Adicionalmente, se encontró que los valores de las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{max}$  fueron diferentes en las distintas generaciones de insectos que emergieron, al igual que los valores de  $IC_{50}$  utilizando el inhibidor SBTI. Finalmente, mediante cromatografía de exclusión molecular fue posible separar distintas fracciones proteicas de la fracción de albúminas con actividad inhibitorias. Sin embargo, no fue posible separar las proteínas presentes en estas fracciones por medio de las técnicas cromatográficas de interacción hidrofóbica, intercambio aniónico e intercambio catiónico. De acuerdo a lo anterior se concluyó que la actividad proteolítica digestiva del insecto *Rhyzopertha dominica* es debida fundamentalmente a proteasas del tipo tripsina, además se observó que la variedad de trigo en la cual se desarrollan los insectos tiene un efecto sobre la misma.