



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  
*Facultad de Ciencias Experimentales*  
*Grado en Biología*

Trabajo Fin de Grado

# **AMINOPEPTIDASAS BACTERIANAS**

**Alumno: Sánchez Merlo, Laura**

**Jaén, junio, 2023**



**UNIVERSIDAD  
DE JAÉN**



**Trabajo Fin de Grado**

# **AMINOPEPTIDASAS BACTERIANAS**

**Alumno: Sánchez Merlo, Laura**

**Jaén, Junio, 2023**

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1 AMINOPEPTIDASAS BACTERIANAS</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS AMINOPEPTIDASAS</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3 PROPIEDADES ENZIMÁTICAS</b> .....	<b>5</b>
<b>1.4 APLICACIONES TERAPÉUTICAS Y BIOTECNOLÓGICAS DE LAS AMINOPEPTIDASAS</b> .....	<b>6</b>
1.4.1 Tipos de aplicaciones industriales de las aminopeptidasas .....	7
1.4.1.1 Síntesis de péptidos bioactivos .....	8
1.4.1.2 Degradación de compuestos organofosforados .....	8
1.4.1.3 Aplicaciones de procesamiento de alimentos .....	8
1.4.1.4 Productos cárnicos curados .....	9
1.4.1.5 Quesos madurados .....	9
1.4.1.6 Productos pesqueros fermentados .....	9
1.4.1.7 Procesamiento de cacao .....	10
<b>2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>11</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>12</b>
<b>4.1. APLICACIONES TERAPÉUTICAS</b> .....	<b>12</b>
<b>4.2. APLICACIONES INDUSTRIALES</b> .....	<b>17</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>26</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>27</b>

## **RESUMEN**

Las aminopeptidasas bacterianas son exopeptidasas que liberan residuos de aminoácidos N-terminales de polipéptidos y proteínas de forma selectiva. Estas enzimas se pueden encontrar en el citoplasma, en las membranas, asociadas a la envoltura celular o incluso pueden ser secretadas al medio extracelular. En los últimos treinta años se han realizado diversos estudios acerca del sistema aminopeptídico bacteriano, siendo de especial interés en futuros campos biotecnológicos. Las aminopeptidasas tienen diversas aplicaciones tanto terapéuticas como industriales. Estos estudios reflejan que las aminopeptidasas juegan un papel fundamental en procesos terapéuticos de importancia, como son el tratamiento de infecciones, la estabilización de péptidos farmacéuticos y la inhibición bacteriana. Por otro lado, su aplicación en la industria está principalmente destinada a producir hidrolizados de proteínas, que juegan un papel fundamental en la industria alimentaria. Estas enzimas son capaces de generar hidrolizados de proteínas no amargas con propiedades antioxidantes, nutricionales y con funciones mejoradas.

## **ABSTRACT**

Bacterial aminopeptidases are exopeptidases that selectively release N-terminal amino acid residues from polypeptides and proteins. These enzymes can be found in the cytoplasm, membranes, associated with the cell envelope, or they can even be secreted into the extracellular medium. In the last thirty years, various studies have been carried out on the bacterial aminopeptidase system, being of special interest in future biotechnological fields. Aminopeptidases have various therapeutic and industrial applications. These studies reflect that aminopeptidases play a fundamental role in certain significant therapeutic processes, such as the treatment of infections, stabilization of pharmaceutical peptides and bacterial inhibition. On the other hand, its application in industry is intended mainly to produce protein hydrolysates, which play a fundamental role in the food industry. These enzymes are capable of generating non-bitter protein hydrolysates with antioxidant and nutritional properties and improved functions.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 AMINOPEPTIDASAS BACTERIANAS

Las aminopeptidasas son un tipo de proteasas encargadas de catalizar la rotura de los residuos de aminoácidos amino-terminales de proteínas y péptidos; por tanto, son exopeptidasas y se encuentran en organismos procariotas y eucariotas. Estas enzimas suelen estar localizadas en el citoplasma o en componentes de membrana (Bielawski y Jankiewicz, 2003). Hay una amplia variedad de aminopeptidasas que forman parte de los microorganismos (Gonzales y Robert-Baudouy, 1996) y tienen un papel fundamental en muchas funciones biológicas. Las aminopeptidasas se encuentran en las células y sus principales funciones son: procesamiento de proteínas sintetizadas, procesamiento de varias enzimas y participación en la descomposición de hormonas peptídicas (Chandú y Nandi, 2003; Taylor, 1993a). Son importantes para la síntesis de biopéptidos y aminoácidos. Además, son capaces de hidrolizar compuestos organofosforados, al tener una gran importancia biológica y ambiental. Las aminopeptidasas pueden ser clasificadas de acuerdo a tres rasgos: el número de aminoácidos escindidos de las cadenas polipeptídicas, la especificidad de sustrato y la sensibilidad a varias proteasas inhibidoras.

Por otro lado, muchos estudios demuestran que algunos compartimentos celulares que presentan las células microbianas generan actividad aminopeptidasa. Uno de estos estudios es la actividad de la aminopeptidasa como predictor del deterioro de las aves a través de parámetros microbiológicos y parámetros sensoriales evaluados. Sin embargo, este estudio se basa en un tamaño de muestra pequeño y su aplicación general aún no ha sido confirmada (Guevara-Franco et al., 2010). En cambio, la mayor parte de estas enzimas aparecen en fracciones solubles, ya sea en el citoplasma, asociadas a la pared celular o secretadas en el medio (Goldberg et al., 1997). A través de técnicas de secuenciación del ADN se ha demostrado que las aminopeptidasas no muestran una secuencia de señal en el extremo N-terminal y son reconocidas como citoplasmáticas (Arima et al., 2018; Bauvois y Dauzonne, 2006; Ben-Bassat et al., 1991).

La estructura de las aminopeptidasas, es cuaternaria, que suelen estar formadas por una frecuencia de 2, 4 y 6 monómeros, las cuales son las más conocidas. Estas aminopeptidasas muestran en gran parte la esencia de Michaelis-Menten; en cambio, la ventaja de presentar una estructura multimérica sigue siendo cuestionada. Solo se conocen dos ejemplos de aminopeptidasas que presentan una estructura heteromultimérica: la aminopeptidasa APM y la aminopeptidasa AP1 (Godsell y Olson, 1993).

La investigación sobre las aminopeptidasas se centra sobre todo en la clonación y la expresión de genes, purificación y caracterización de proteínas, mecanismos catalíticos y evaluaciones in silico (Arif et al., 2018; Arima et al., 2004; Arima et al., 2006a; Labrie et al., 2019; Nampoothiri y Nandan, 2014; Sonoda et al., 2009). Las secuencias génicas y funciones bioquímicas de las aminopeptidasas son dos de los factores claves en la especificidad de sustrato de las aminopeptidasas (Rawlings et al., 2004). A día de hoy se sigue investigando sobre las aminopeptidasas al participar en diversos procesos vitales; entre ellos se encuentra el procesamiento y renovación de proteínas, invasión de tejidos, regulación de síntesis de hormonas y la determinación de la especificidad de sustrato de las aminopeptidasas (Petrovic et al., 2007). Se ha planteado la aplicación de tecnologías innovadoras que utilizan ADN recombinante y mutagénesis para el desarrollo de aminopeptidasas con una mejor especificidad de sustrato (Nampoothiri y Nandan, 2017a).

## **1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS AMINOPEPTIDASAS**

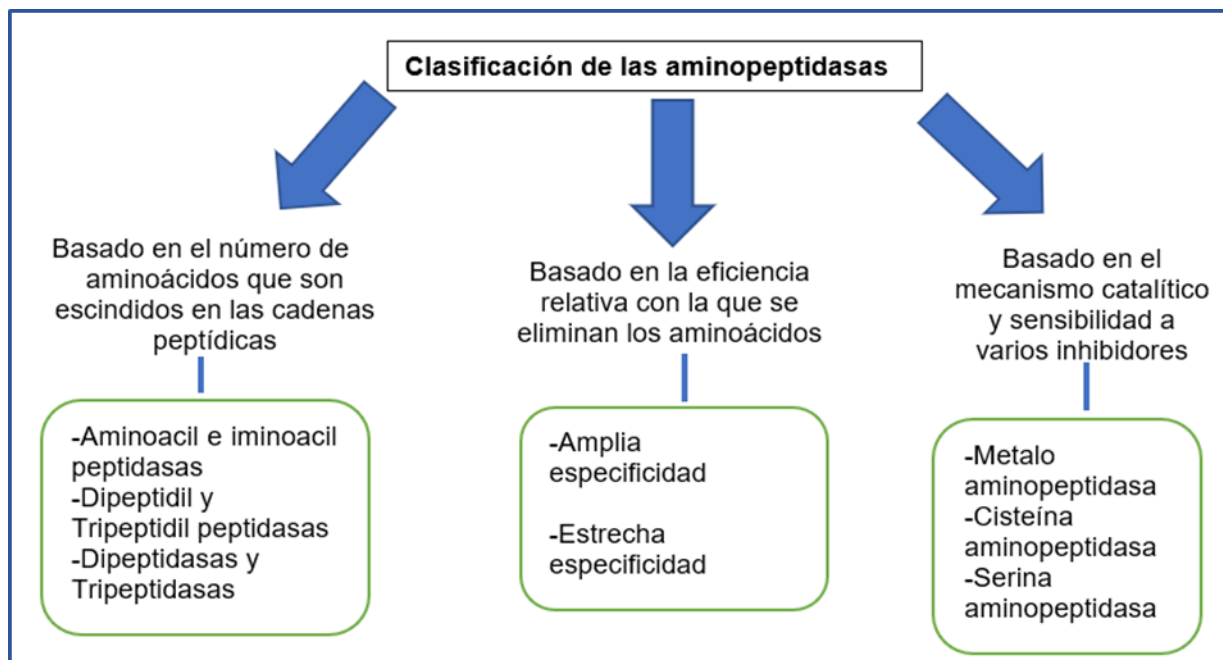
Como se ha comentado anteriormente, las aminopeptidasas se pueden clasificar atendiendo a tres rasgos:

a) Según el número de aminoácidos que son escindidos en las cadenas polipeptídicas, estas pueden clasificarse en: aminoacil peptidasas, dipeptidil y tripeptidil peptidasas y, por último, dipeptidasas y tripeptidasas. Estas enzimas hidrolizan un enlace peptídico en una cadena polipeptídica liberando residuos de aminoácidos (Umezawa et al., 2004).

b) Según la especificidad de sustrato y el mecanismo catalítico, las aminopeptidasas pueden ser de amplia especificidad y estrecha especificidad, localizadas en diferentes microorganismos (Holz et al., 2003; Lowther y Matthews, 2002). Estas se encargan de eliminar varios aminoácidos o solo un tipo en las posiciones N-terminales o P1.

c) Según el mecanismo catalítico y la sensibilidad a varias proteasas inhibitoras. Las metaloaminopeptidasas son el grupo más grande de las aminopeptidasas y estas son inhibidas por agentes quelantes de metales. La mayor parte de estas enzimas las encontramos en formas solubles en el citoplasma, asociadas a la pared celular o incluso secretadas en el medio (Goldberg et al., 1997).

Figura 1. Clasificación de las aminopeptidasas (Elaboración propia a partir de Nandan y Nampoothiri, 2020).

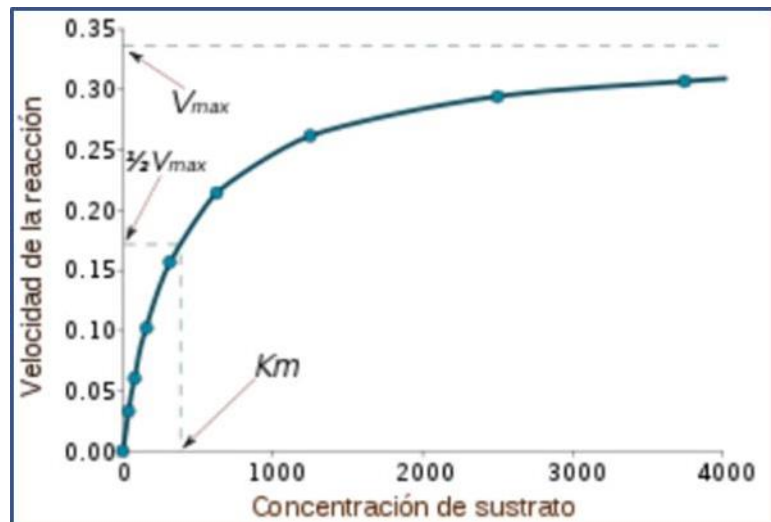


### 1.3 PROPIEDADES ENZIMÁTICAS

Las aminopeptidasas bacterianas presentan una estructura multimérica, muchas tienen una cinética de saturación de Michaelis-Menten (Fig 2.), donde describe la velocidad de reacción de muchas reacciones enzimáticas con respecto a la concentración de su sustrato. Si algo caracteriza a estas enzimas, es que presentan una afinidad débil o moderada por su sustrato. Además, puede ocurrir que muchas de las aminopeptidasas puedan estar activas in vivo con tasas muy pequeñas

con respecto a su tasa máxima (Vitale et al.,1985).

Figura 2. Representación gráfica de Michaelis-Menten (KM) (Hwang, Kaminogawa y Yamauchi, 1981).



La temperatura y el pH óptimo para la actividad de las aminopeptidasas es muy variable entre una aminopeptidasa y otra. Lo más común es que presenten un pH en torno a 6.9, pero en algunos casos puede haber excepciones y que tengan una gran variación de pH. Al aumentar la temperatura crecen las aminopeptidasas aisladas de bacterias. En general, suelen tener una excelente termoestabilidad. Sin embargo, la base molecular de esta termoestabilidad no se conoce bien. Muchos estudios afirman que presentan pequeñas modificaciones, como es la estabilización de los extremos peptídicos de la proteína o sustitución de enlaces de hidrógeno, los cuales son imprescindibles para mantener la estructura por enlaces iónicos de mayor energía (Adams, 1993).

## 1.4 APLICACIONES TERAPÉUTICAS Y BIOTECNOLÓGICAS DE LAS AMINOPEPTIDASAS

Las aminopeptidasas bacterianas muestran importantes aplicaciones distribuidas en varios campos, esto se debe a su especificidad de sustrato, reacciones químicas que forman uno o más elementos nuevos casi idénticos en una molécula de sustrato y una elevada estabilidad térmica (Arima et al., 2006b). El primer campo reconocido fue el de la industria alimentaria y en él, su utilidad abarca aspectos como el procesamiento de alimentos, maduración, desamargado, maduración de la carne y queso. Hay proteínas alimentarias, como la caseína, el gluten y el colágeno, ricas en

residuos de L-prolina. Debido a la estructura cíclica que presenta la prolina, estas proteínas están protegidas de la degradación enzimática por las enzimas digestivas típicas. Las peptidasas específicas de prolina (Psp) pertenecen a varias familias de hidrolasas que actúan sobre los enlaces peptídicos. Pueden actuar sobre varios organismos como bacterias, hongos, plantas e insectos. Dependiendo de sus características bioquímicas las Psp las podemos clasificar en varias subclases, mostrando un importante interés para las aplicaciones en biotecnología alimentaria. (Mika et al., 2015).

Las aminopeptidasas se encargan de llevar a cabo varios procesos celulares tales como modificación y degradación de proteínas, control del ciclo celular y regulación del nivel hormonal, pudiendo de esta forma participar en condiciones fisiopatológicas de infecciones referentes al cáncer (Taylor, 1993a; Taylor, 1993b). Los microorganismos son las principales fuentes de aminopeptidasas, con un alto rendimiento en su producción, suponiendo a su vez una importante productividad económica. Por ello, las aminopeptidasas también son utilizadas para aplicaciones farmacéuticas, ya que tienen la capacidad de controlar los efectos fisiopatológicos o contribuir al desarrollo de las herramientas de diagnóstico como pueden ser los biomarcadores. Los estudios relacionados sobre el mecanismo del sitio catalítico activo de las aminopeptidasas se utilizan para crear nuevos inhibidores de las aminopeptidasas, los cuales son usados como productos farmacéuticos (Holz, 2002; Lowther y Matthews, 2002). Las aminopeptidasas son también importantes para el análisis estructura-función, ya que usan y producen proteínas recombinantes.

#### **1.4.1. Tipos de aplicaciones industriales de las aminopeptidasas**

Existen varios tipos de aplicaciones industriales, en concreto, en el sector de la industria alimentaria, donde las aminopeptidasas específicas de sustrato presentan unas características especiales.

### **1.4.1.1 Síntesis de péptidos bioactivos**

En el contexto de las aplicaciones biotecnológicas, las aminopeptidasas de prolina son de gran ayuda para sintetizar péptidos que tienen prolina y se encargan de catalizar la reacción de aminólisis. Muchos estudios muestran que los péptidos que tienen prolina presentan propiedades nutraceuticas (Yamamoto et al., 2010).

### **1.4.1.2 Degradación de compuestos organofosforados**

El consumo de compuestos organofosforados es un grave problema para la salud de las personas debido a su toxicidad. Estos compuestos son conocidos por sus efectos tóxicos, ya sea por la inactivación de la enzima acetilcolinesterasa o por desactivar las funciones nerviosas. Dicho esto, la protección y la seguridad contra la desintoxicación de estos compuestos es muy preocupante para la sociedad. En diversos estudios científicos, se afirma estar buscando un método de biodegradación ecológico para la eliminación de estos compuestos en el medio como los de origen microbiano para la degradación biológica de plaguicidas organofosforados (Sidhu et al., 2019).

### **1.4.1.3 Aplicaciones en procesamiento de alimentos**

El procesamiento de alimentos se realiza a través del hidrolizado de proteínas y desamargado. El hidrolizado de proteínas alimentarias es una de las aplicaciones industriales más importantes de las aminopeptidasas. Los hidrolizados proteicos derivados de leche, cereales o soja, son preparados a través de la mezcla de endopeptidasas con exopeptidasas (Chevalet et al., 2001; Meyer-Barton et al., 1994; Scharf et al., 2006). Estos hidrolizados proteicos son muy utilizados para generar péptidos bioactivos con carácter nutricional y farmacológico. Como se ha descrito anteriormente, la especificidad de sustrato de las aminopeptidasas es importante en la eficiencia de hidrólisis que determina las propiedades de los hidrolizados. Muchos estudios afirman que la bioactividad de hidrolizados peptídicos es determinada por la cantidad de ácidos grasos libres (Rahulan et al., 2012).

Por otro lado, algunos estudios han mostrado que el amargor en la industria alimentaria es menor en los hidrolizados de proteínas alimentarias. Cuando se añaden aminopeptidasas, disminuyen el amargor ya que aumentan el grado de hidrólisis y se liberan los aminoácidos libres (Giesler et al., 2013).

#### **1.4.1.4 Productos cárnicos curados**

Los productos cárnicos se preparan a través de varios procesos como son el secado y la maduración de la carne. A lo largo del procedimiento, las proteínas que tienen la carne se hidrolizan por endopeptidasas musculares y más tarde por exopeptidasas. Además, gran parte de las exopeptidasas participan en la liberación de péptidos pequeños, aminoácidos libres y ciertos bioactivos (Virgili et al., 1998).

#### **1.4.1.5 Quesos madurados**

Para la preparación de un queso excelente, hace falta que la proteína de la leche, es decir, la caseína, se descomponga de forma equilibrada en pequeños péptidos y aminoácidos. Esta proteína es rica en residuos de prolina. Muchas de las aminopeptidasas específicas de prolina, han sido encontradas en organismos iniciadores que participan en la fabricación del queso. En el proceso de maduración del queso, las aminopeptidasas de las bacterias termófilas del ácido láctico se encuentran activas durante todo el proceso. (Gatti et al., 1999).

#### **1.4.1.6 Productos pesqueros fermentados**

La fermentación del pescado consiste en un proceso natural que depende tanto de bacterias naturales como de enzimas. Estos productos pesqueros presentan diferentes características como el aroma y textura que presentan a lo largo del proceso de fermentación. En la actualidad, se conocen estudios sobre la evolución de la calidad de la salsa del pescado a través de la optimización de las cepas de los inóculos iniciales (Zheng et al., 2017). La salsa que está hecha a base de pescado es un complemento para las comidas asiáticas. Dicho esto, los estudios se basan en el diseño de cultivos iniciadores halófilos para hacer una salsa de pescado de calidad. La actividad aminopeptidasa endógena presente en la salsa de pescado fue

estudiada por Vo-Van et al. 1984. Estos estudios describen la identificación y purificación de aminopeptidasas que están en la fermentación de la salsa de pescado (Vo-Van et al., 1984).

### **1.4.1.7 Procesamiento de cacao**

El cacao tiene un sabor amargo agrio al tener taninos y polifenoles. Durante el procesado del cacao se produce la fermentación que disminuye el amargor. La fermentación provoca que la pulpa de la fruta se degrade por la acción de varios microbios, como bacterias del ácido láctico, del ácido acético y levaduras. Las reacciones enzimáticas tienen un importante papel en la hidrólisis de proteínas en semillas de cacao para generar compuestos precursores aromatizantes. El proceso de la proteólisis es fundamental para el desarrollo del sabor del cacao (Voigt et al., 1994 a, b). En el estudio que realizó Oliveira et al. 2011 se mostraba que la mejor calidad del chocolate se conseguía mediante la acción proteasa de serina y la carboxipeptidasa, utilizadas en el procesamiento de semillas de cacao (Oliveira et al., 2011).

## **2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

Mediante este trabajo se pretende realizar un estudio sobre diferentes investigaciones científicas que nos permitan resumir de forma esquemática la producción de aminopeptidasas bacterianas en organismos procariotas, partiendo de la hipótesis de que la presencia de estas aminopeptidasas es frecuente y que en gran medida afectan a la salud humana.

- El objetivo principal es conocer las funcionalidades que presentan las aminopeptidasas bacterianas en procariotas y cómo afectan a la salud humana.
  
- Con respecto a los objetivos específicos se enumeran los siguientes:  
Analizar la actividad enzimática de las aminopeptidasas y sus aplicaciones terapéuticas.

- Estudiar los efectos de los inhibidores de las aminopeptidasas bacterianas para el tratamiento de varias infecciones.
- Estudiar la aplicación de las aminopeptidasas en la industria.
- Investigar el uso de las aminopeptidasas para producir hidrolizados de proteínas no amargos con propiedades coloidales mejoradas.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

En esta revisión sobre aminopeptidasas bacterianas se ha llevado a cabo dos búsquedas a través de bases de datos online como PUBMED y dentro de esta, unos artículos han llevado a otros, al ser interesantes y relevantes para este trabajo. De este modo, filtrando la información encontrada sobre la hipótesis de este trabajo bibliográfico, se buscan los puntos claves que responden a los objetivos e hipótesis propuestos y aparezcan las publicaciones más recientes de los últimos años.

Las palabras clave de esta revisión bibliográfica son “aminopeptidasas, therapeutical applications, bacteria” en la primera búsqueda y “aminopeptidasas, industrial applications, bacteria” en la segunda.

Los criterios de exclusión han sido:

- Revisiones bibliográficas muy amplias que ya se han incluido en la sección de introducción.
- Estudios muy específicos no interesantes para esta revisión (estudios estructurales, por ejemplo).
- Información ya incluida en otro artículo seleccionado previamente.
- El artículo aparezca en ambas búsquedas y esté más claramente relacionado con una de ellas.

- Que no tenga relación directa con el tema porque las palabras clave aparezcan de manera secundaria en el resumen del artículo.

De acuerdo con la información obtenida, se elabora unos resultados que puedan recoger los aspectos más importantes y que respondan a la hipótesis y objetivos y, seguidamente, una discusión crítica de los mismos.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En esta sección, se discute una selección de los artículos encontrados y seleccionados siguiendo el protocolo expuesto en el anterior apartado de “Materiales y Métodos”, separados en las dos líneas principales establecidas (terapéutica e industrial) y que se han considerado de importancia en el tema tratado en esta revisión bibliográfica. Adicionalmente profundizaremos en algunos de los artículos que nos han parecido de mayor interés.

### **4.1. APLICACIONES TERAPÉUTICAS**

**a) M1 aminopeptidasas as drug targets: broad applications or therapeutic niche? FEBS J, 2017 May;284(10):1473-1488. Drinkwater N, Lee J, Yang W, Malcolm TR, McGowan S.**

Las aminopeptidasas M1 son enzimas que pertenecen a la familia de las metaloenzimas destacando una estructura conservada y su especificidad de reacción. Sus funciones más importantes son crecimiento y desarrollo celular, defensa y mantenimiento de la célula. Este artículo se centra en evaluar estudios previos sobre la utilidad de las aminopeptidasas M1 como dianas terapéuticas para enfermedades infecciosas y crónicas de los humanos y el desarrollo de gran cantidad de inhibidores. El análisis realizado muestra que continuamente se pasa por alto la validación temprana de las aminopeptidasas M1 como dianas terapéuticas y esto impide que las enzimas se puedan confirmar como dianas farmacológicas. Esta comprobación debe realizarse y no dejarla pasar por alto, ya que debe incluir una caracterización exhaustiva de las funciones específicas de las enzimas dentro de vías fisiológicas complejas. Más aún, la utilización de sondas químicas debe ser diseñada

cuidadosamente para garantizar con certeza que se ha conseguido la especificidad sobre las enzimas relacionadas. Mientras que muchos programas para el descubrimiento de fármacos dirigidos especialmente a las aminopeptidasas M1 siguen en sus inicios de estudio, algunos inhibidores están mostrando que pueden ser claves para el tratamiento de gran variedad de enfermedades como puede ser el cáncer, la hipertensión y la malaria.

Las aminopeptidasas M1 desempeñan funciones importantes que, junto con un sitio activo fácilmente adaptado al diseño del inhibidor, dio lugar a que muchos grupos de investigación se centren en su actividad de proteasa para desarrollar nuevos tratamientos para los humanos. Sin embargo, por extraño que parezca, estos atributos pueden ser una combinación de funciones fisiológicas relacionadas con la enfermedad en sitios activos farmacológicos, no los racionaliza solo como objetivos farmacológicos válidos. Los enzimas que participaron en el estado de la enfermedad fueron estudiados con más detalle, lo que ilustraba la complejidad de las redes fisiológicas y las funciones de la aminopeptidasa M1. En otros casos, especialmente LTA4H, ERAP1, ERAP2 e IRAP (Tabla 1) utilizan las sondas químicas como herramienta para un estudio más exhaustivo de las funciones fisiológicas exactas de las enzimas in vivo. Por tanto, los inhibidores de la aminopeptidasa M1 son prometedores para el tratamiento de una variedad de enfermedades.

Tabla 1. Aminopeptidasas M1 que se han investigado como dianas para el tratamiento de enfermedades humanas (Drinkwater et al. 2017).

Aminopeptidasa M1	Rol fisiológico caracterizado	Indicación terapéutica potencial	Estrategia terapéutica propuesta: ¿molécula pequeña o diana vacunal?	Estrategia de apoyo a la evidencia experimental	Información estructural disponible
<i>Ec</i> APN (aminopeptidasa <i>N</i> humana)	Función probable en la adquisición de nutrientes y las vías metabólicas	antibacteriano	Inhibidores de molécula pequeña	No disponible	Muchas (> 20) estructuras cristalinas disponibles, incluidas las sin ligar ( 2HPO ) y ligadas (producto o inhibidor)
<i>Nm</i> APN ( <i>Neisseria meningitidis</i> aminopeptidasa <i>N</i> )	Función probable en la adquisición de nutrientes y las vías metabólicas	antibacteriano	Inhibidores de molécula pequeña	No disponible	Estructura cristalina de <i>Nm</i> APN sin ligar ( 2GTQ ) y múltiples estructuras con ligando (inhibidor o análogo del producto)
<i>Brucella</i> spp. PepN	Desconocido, investigación limitada al antígeno de diagnóstico	Brucelosis	Objetivo de la vacuna	Aún no validado. La proteína es inmunogénica	Ninguno disponible
<i>C. parvum</i> M1	Posible papel en la exquistación	Criptosporidiosis	Objetivo de la vacuna	Aún no validado. La proteína es inmunogénica	Ninguno disponible
<i>T. gondii</i> M1	Desconocido, la investigación hasta ahora se limita a la inmunogenicidad	toxoplasmosis	Objetivo de la vacuna	Aún no validado. La proteína es inmunogénica	Ninguno disponible
<i>Pf</i> A-M1 ( <i>Plasmodium falciparum</i> M1 aminopeptidasa)	Digestión de hemoglobina por <i>Plasmodium</i> spp. dentro de los parásitos intraeritrocíticos	Malaria	Inhibidores de molécula pequeña	Control <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de <i>Plasmodium</i> spp. ( <i>P. falciparum in vitro</i> y <i>P. chabaudi chabaudi in vivo</i> )	Muchas (> 20) estructuras cristalinas disponibles, incluidas sin ligando ( 3EBG ) y unidas a inhibidores
<i>Un</i> APN1	Media la adhesión de células del parásito en el intestino medio del mosquito	Malaria	Objetivo de la vacuna	Estructura cristalina de An APN1 sin ligando ( 4WZ9 )	Bloqueo de la transmisión <i>in vivo</i> de los parásitos <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> en especies anofelinas
APN (aminopeptidasa <i>N</i> humana)	Receptor de entrada de células humanas para algunos coronavirus de ARN plus (CoV) envueltos	Antivirico	Vacuna para atacar CoV y prevenir la interacción con APN	El anticuerpo neutralizante bloquea la entrada viral	Estructura cristalina del dominio de unión al receptor de pico CoV respiratorio porcino unido al ectodominio pAPN ( 4F5C )

Enfermedades crónicas de los humanos.					
APA (aminopeptidasa A humana)	Regulación de la presión arterial dentro del sistema renina-angiotensina del cerebro	Hipertensión	Inhibidores de molécula pequeña	Los inhibidores de APA bloquean la formación de AngIII en el cerebro y normalizan la presión arterial en ratas hipertensas	Estructuras cristalinas de APA en una gama de formas que incluyen sin ligando ( 4KX7 ), unido a inhibidor ( 4KX8 , 4KXB ) y unido al producto en presencia y ausencia de $Ca^{+2}$ ( 4KX9 , 4KXA , 4KXC , 4KXD )
LTA4H (leucotrieno A4 hidrolasa)	Papel bifuncional en la inflamación: antiinflamatorio (descomposición de PGP) y proinflamatorio (síntesis de leucotrieno B4)	Enfermedad inflamatoria	Inhibidores de molécula pequeña	La inhibición de LTA4H por Bufexamac alivia la lesión pulmonar aguda inducida por lipopolisacáridos en modelos de ratón. Inhibición selectiva de la síntesis de leucotrieno B4 lograda con ARM1	Muchas (> 50) estructuras cristalinas disponibles, incluidas formas ligadas (inhibidor, producto y análogo de sustrato) y formas no ligadas
APN (aminopeptidasa N human)	Involucrado en una amplia gama de procesos que incluyen el procesamiento de neuropéptidos y quimiocinas, la adhesión celular	Quimioterapéutico	Inhibidores de molécula pequeña	Inhibidores de APN en uso clínico	Estructura cristalina de APN sin ligando disponible ( 45YQ ), así como forma unida a inhibidor ( 4FYR , 4FYT ) y forma unida a producto ( 4FYS )
ERAP1 (aminopeptidasa del retículo endoplásmico), ERAP2 (aminopeptidasa del retículo endoplásmico) y IRAP (aminopeptidasa regulada por insulina)	Procesamiento de péptidos antigénicos para presentación a células T	Inmunomodulación	Inhibidores de molécula pequeña (inhibición parcial o completa)	La inhibición de las tres enzimas por los ácidos fosfónicos (p. ej., DG013A) aumenta la respuesta citotóxica en líneas celulares murinas	ERAP1: estructura cristalina de forma no ligada en conformación abierta ( 3QNF ) y forma unida a bestatina en conformaciones cerradas ( 2DY0 ) y abiertas ( 3MDJ ) ERAP2: Estructuras cristalinas de ERAP2 en conformación libre de metal y sin ligando ( 5CU5 ), así como unidas al producto ( 5AB2 , 3SE6 ), análogo de sustrato ( 5AB0 ) e inhibidor ( 4JBS ) IRAP: estructura cristalina de IRAP en conformación sin ligando ( 5C97 ), así como unida al sustrato análogo ( 4Z71 ) y producto ( 4P8Q , 4PJ6 )

**b) To protect peptide pharmaceuticals against peptidases, J Pharmacol Toxicol Methods 2010 Mar-Apr;61(2):210-8. Rink R, Arkema-Meter A, Baudoin I, Post E, Kuipers A, Nelemans SA, Akanbi MH, Moll GN.**

El principal obstáculo en la aplicación y administración de los productos farmacéuticos peptídicos es su rápida degradación in vivo. En este estudio se combinan dos enfoques para conseguir estabilizar los péptidos farmacéuticos: la

introducción de D-aminoácidos y la ciclación. Los datos demuestran de manera convincente la amplia perspectiva de la generación estereoespecífica y regioespecífica de productos farmacéuticos de péptidos ciclados con un potencial terapéutico significativamente mejorado.

**c) Specificity for inhibitors of metal-substituted methionine aminopeptidase. Biochem Biophys Res Commun 2003 Jul 18;307(1):172-9. Li JY, Chen LL, Cui YM, Luo QL, Li J, Nan FJ, Ye QZ.**

Las metionina aminopeptidasas (MetAP) se han estudiado in vitro como enzimas Co (II), pero aún no se ha definido su metal in vivo. Los resultados de este artículo demuestran claramente que la sustitución de metales ha cambiado la especificidad de la enzima para sustratos e inhibidores. Las aplicaciones terapéuticas requieren inhibidores específicos para MetAP con un metal fisiológicamente relevante en su sitio activo.

**d) Metal-mediated inhibition is a viable approach for inhibiting cellular methionine aminopeptidase. Bioorg Med Chem Lett. 2009 Dec 15;19(24):6862-4. Chai SC, Ye QZ.**

La metionina aminopeptidasa (MetAP) juega un papel esencial para la supervivencia celular. Por lo tanto, MetAP es un objetivo prometedor para el desarrollo de agentes antibacterianos de amplio espectro. MetAP puede activarse in vitro por varios metales divalentes, y las estructuras de rayos X muestran que el sitio activo puede acomodar dos cationes. En este artículo, se demuestra la inhibición del crecimiento bacteriano por un compuesto que se dirige a MetAP mediante el reclutamiento de un tercer metal auxiliar. Contrariamente a las creencias anteriores, esto muestra que la inhibición mediada por metales es un enfoque viable para descubrir inhibidores de MetAP que sean efectivos para la aplicación terapéutica.

**e) Synthesis and structure-function analysis of Fe (II)-form-selective antibacterial inhibitors of *Escherichia coli* methionine aminopeptidase. Bioorg Med Chem Lett. 2009 Feb 15;19(4):1080-3. Wang WL, Chai SC, Ye QZ.**

Este artículo es un desarrollo del anterior. Como se dijo anteriormente, la metionina aminopeptidasa (MetAP) es un objetivo prometedor para el desarrollo de nuevas terapias antibacterianas, antifúngicas y anticancerígenas. En resultados anteriores, los derivados de catecol acoplados con un resto de tiazol o tiofeno mostraron una alta potencia y selectividad hacia la forma Fe (II) de MetAP de *Escherichia coli*, y algunos de ellos mostraron claramente actividad antibacteriana, lo que indica que es probable que Fe (II) sea el metal fisiológicamente relevante para MetAP en *E. coli* y otras células bacterianas. Estos hallazgos brindan información útil para el diseño y descubrimiento de inhibidores de MetAP más efectivos para aplicaciones terapéuticas.

**f) Transmissible gastroenteritis virus targets Paneth cells to inhibit the self-renewal and differentiation of Lgr5 intestinal stem cells via Notch signaling. Cell Death Dis. 2020 Jan 20; 11(1):40. doi: 10.1038/s41419-020-2233-6. PMID: 31959773; PMCID: PMC6971083. Wu A, Yu B, Zhang K, Xu Z, Wu D, He J, Luo J, Luo Y, Yu J, Zheng P, Che L, Mao X, Huang Z, Wang L, Zhao J, Chen D.**

Se estudia sobre la infección por el virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV) que se ha asociado con atrofia de las vellosidades en un intervalo de 48 horas, lo que provoca que se altere la homeostasis intestinal a través de la autorrenovación y la diferenciación en las células madre intestinales (ISC) Lgr 5. Entre otras cosas descritas en el artículo, se indica que el receptor viral en las células de Paneth es también el receptor de la aminopeptidasa N. Este y otros descubrimientos retratan una posible relación entre la infección por el virus de la diarrea y la reacción de las células de cripta que regularía la función de las células de Paneth y el destino de las células ISC Lgr5, lo que podría utilizarse para el desarrollo de aplicaciones terapéuticas.

## **4.2. APLICACIONES INDUSTRIALES**

**a) Over-expression of a proline specific aminopeptidase from *Aspergillus oryzae* JN-412 and its application in collagen degradation. Appl Biochem Biotechnol. 2014 Aug;173(7):1765-77. doi: 10.1007/s12010-014-0963-6. Epub 2014 May 31. Ding GW (1), Zhou ND, Tian YP.**

En este artículo se aisló una cepa que mostró actividad intracelular de aminopeptidasa específica de prolina (PAP) a partir de salsa de soja koji y se identificó como *Aspergillus oryzae* JN-412. El gen que codifica la PAP fue clonado y expresado eficientemente en *Escherichia coli* BL21 en una forma biológicamente activa. Al usar colágeno como sustrato, la prolil aminopeptidasa recombinante purificada contribuyó a la hidrólisis del colágeno cuando se usó en combinación con proteasa neutra, y los aminoácidos libres en los hidrolizados de colágeno aumentaron significativamente.

**b) Biochemical properties and potential applications of recombinant leucine aminopeptidase from *Bacillus kaustophilus* CCRC 11223. Int J Mol Sci. 2011;12(11):7609-25. doi: 10.3390/ijms12117609. Epub 2011 Nov7. Shen Y (1), Wang F, Lan D, Liu Y, Yang B, Wang Y.**

En este estudio llevaron a cabo experimentos para investigar los efectos de varios factores sobre la actividad y conformación de la leucina aminopeptidasa recombinante de *Bacillus kaustophilus* CCRC 11223 (BkLAP) y la posible utilización de BkLAP en la hidrólisis de proteína de anchoa. Se evaluó la potencial aplicación de BkLAP a través de la combinación con la enzima comercial o endógena para la hidrólisis de la proteína de anchoa. Los resultados mostraron que la combinación de BkLAP con otras enzimas podría aumentar significativamente el grado de hidrólisis y el componente de aminoácidos del hidrolizado. En este sentido, BkLAP es una enzima potencial que se puede utilizar en la industria de hidrolizados de proteínas.

**c) Production and characterization of novel thermo- and organic solvent stable keratinase and aminopeptidase from *Pseudomonas aeruginosa* 4-3 for effective poultry feather degradation. Environ Sci Pollut Res Int. 2023 Jan;30(2):2480-2493. doi: 10.1007/s11356-022-22367-4. Epub 2022 Aug 5Pei XD (1), Li F (1), Yue SY (1), Huang XN (1), Gao TT (1), Jiao DQ (1), Wang CH (2).**

La biodegradación de las plumas es una premisa importante para el desarrollo y la utilización eficiente de las mismas. En este artículo se describe una *Pseudomonas aeruginosa* aislada de un matadero. La queratinasa 4-3 y la aminopeptidasa de *P. aeruginosa* demostraron ser proteasas ideales para aplicaciones potenciales en la degradación de la queratina, además de abrir nuevos cauces para la degradación

sinérgica de la queratina por múltiples enzimas.

**d) Aminopeptidase activity by spoilage bacteria and its relationship to microbial load and sensory attributes of poultry legs during aerobic cold storage. J Food Prot. 2010 Feb; 73(2):322-6. doi: 10.4315/0362-028x-73.2.322. Guevara - Franco JA (1), Alonso-Calleja C, Cápita R.**

En este artículo se evaluó la vida útil de muslos de ave almacenados en condiciones de aerobiosis y el posible papel de la actividad aminopeptidasa de las bacterias Gram-negativas (prueba de p-nitroanilina) como marcador del deterioro de las aves, utilizando parámetros microbiológicos y sensoriales. Sin embargo, los autores advierten de que estas recomendaciones se basan en un pequeño conjunto de muestras y su aplicación general aún no se ha verificado.

**e) Cloning, expression, and chromosomal stabilization of the *Propionibacterium shermanii* proline iminopeptidase gene (pip) for food-grade application in *Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol. 1998 Dec;64(12):4736-42. doi: 10.1128/AEM.64.12.4736-4742.1998. Leenhouts K (1), Bolhuis A, Boot J, Deutz I, Toonen M, Venema G, Kok J, Ledebøer A.**

La prolina iminopeptidasa producida por *Propionibacterium shermanii* juega un papel esencial en el desarrollo del sabor de los quesos tipo suizo. La enzima (Pip) se purificó y caracterizó, y el gen (pip) se clonó y expresó en *Escherichia coli* y *Lactococcus lactis*, siendo esta última especie un cultivo iniciador de queso primario ampliamente estudiado que es menos exigente en sus requisitos de condiciones de crecimiento que *P. shermanii*.

**f) Prolyl-specific peptidases for applications in food protein hydrolysis. Appl Microbiol Biotechnol. 2015 Oct;99(19):7837-46. Mika N (1), Zorn H, Rühl M.**

Varias proteínas alimentarias, como por ejemplo el gluten, el colágeno y la caseína, son ricas en residuos de L-prolina. Debido a la estructura cíclica de la prolina, estas proteínas están bien protegidas de la degradación enzimática por las enzimas digestivas típicas. Las peptidasas específicas de prolina (PsP) pertenecen a diferentes

familias de hidrolasas que actúan sobre enlaces peptídicos (EC 3.4.xx). Ocurren en varios organismos incluyendo bacterias, hongos, plantas e insectos. Según sus características bioquímicas, las enzimas de tipo PsP se agrupan en diferentes subclases, de las cuales prolil aminopeptidasas (EC 3.4.11.5, PAP), prolil carboxipeptidasas (EC 3.4.17.16, PCP) y prolil oligopeptidasas/prolil endopeptidasas (EC 3.4.21.26, POP/PEP) son de gran interés para aplicaciones en biotecnología alimentaria.

**g) A dual-functional aminopeptidase from *Streptomyces canus* T20 and its application in the preparation of small rice peptides. Int J Biol Macromol. 2021 Jan 15; 167: 214-222. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.175. Epub 2020 Nov 28. Qin Q (1), Tang C (1), Wu J (1), Chen S (2), Yan Z (3).**

En esta publicación, una aminopeptidasa derivada de *Streptomyces canus* T20 (ScAP) se expresó y caracterizó con éxito en *Escherichia coli* BL21 (DE3). El rendimiento de péptidos pequeños de arroz alcanzó el 66,5 %, el más alto con diferencia. Además, ScAP tiene un efecto de desamargado significativo en los péptidos de arroz. Por lo tanto, ScAP como aminopeptidasa de función dual hidrolítica y desamarga podría tener una aplicación potencial en la producción de péptidos pequeños de arroz de alto rendimiento y bajo amargor.

**h) A fusion protein consisting of the exopeptidases PepN and PepX-production, characterization, and application. Appl Microbiol Biotechnol. 2016 Sep;100(17):7499-515. doi: 10.1007/s00253-016-7478-8. Epub 2016 Apr 1. Stressler T (1), Pfahler N (2), Merz M (2), Hubschneider L (2), Lutz-Wahl S (2), ClaaßenW (2), Fischer L (2).**

En este trabajo se confirma lo ya publicado anteriormente, que la aminopeptidasa general N (PepN; EC 3.4.11.2) y la peptidasa específica de prolina PepX (EC 3.4.14.11) de *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046 muestran un efecto sinérgico durante la hidrólisis de proteínas que resulta en altos grados de hidrólisis y reducción del amargor. Para combinar ambas actividades, se unieron las enzimas y se creó una proteína de fusión llamada PepN-L1-PepX (FUS-PepN-PepX). Después de la producción y purificación, se caracterizó la proteína de fusión. Algunas de sus características bioquímicas fueron mejoradas en comparación con las enzimas

individuales. Como beneficio, el hidrolizado resultante mostró una fuerte capacidad antioxidante.

**i) Biochemical and conformational characterization of a leucine aminopeptidase from *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2. World J Microbiol Biotechnol. 2012 Nov;28(11):3227-37. doi: 10.1007/s11274-012-1133-z. Epub 2012 Aug 28. Wang F (1), Guo S, Liu Y, Lan D, Yang B, Wang Y.**

Con el fin de buscar enzimas valiosas y extremadamente termoestables que pudieran ser utilizadas en la industria de la hidrólisis de proteínas, se clonó y expresó en *E. coli* el gen correspondiente a una leucina aminopeptidasa de *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 (GtLAP). La enzima recombinante se purificó y se examinaron sus características. Los resultados del experimento hidrolítico mostraron que la combinación de GtLAP con enzimas endógenas podría aumentar significativamente el grado de hidrólisis de las proteínas de anchoa y las concentraciones de aminoácidos libres en los hidrolizados. En este sentido, GtLAP podría utilizarse potencialmente en la industria de la hidrólisis de proteínas.

**j) Biochemical properties of recombinant leucine aminopeptidase II from *Bacillus stearothermophilus* and potential applications in the hydrolysis of Chinese anchovy (*Engraulis japonicus*) proteins. J Agric Food Chem. 2012 Jan 11;60(1):165-72. doi: 10.1021/jf204002e. Epub2011 Dec 20. Wang F (1), Ning Z, Lan D, Liu Y, Yang B, Wang Y.**

En este trabajo se investigaron los efectos de varios factores sobre la actividad y conformación de la leucina aminopeptidasa II recombinante (rLAP II) de *Bacillus stearothermophilus* y su potencial utilización en la hidrólisis de proteínas de anchoa. Su uso potenciará la hidrólisis de proteínas en especies de animales acuáticos. rLAP II podría utilizarse potencialmente para eliminar el amargor en la industria de la hidrólisis de proteínas.

**k) Purification, characterization, and gene cloning of lysyl aminopeptidase from *Streptococcus thermophilus* YRC001. Biosci Biotechnol Biochem. 2003 Apr;67(4):772-82. doi: 10.1271/bbb.67.772. Motoshima H (1), Shiraishi T, Tsukasaki F, Kaminogawa S.**

Se purificó y caracterizó una aminopeptidasa de *Streptococcus thermophilus* YRC001 para obtener una enzima para la aplicación de la reducción del defecto amargo en la fabricación de queso. La enzima purificada redujo eficazmente el amargor de un digerido de tripsina de leche descremada reconstituida. Por lo tanto, se clona el gen para la enzima de YRC001. La secuencia de aminoácidos deducida mostró una alta homología con la lisil-aminopeptidasa bacteriana conocida (aminopeptidasa N).

**l) Aminopeptidase from *Streptomyces gedanensis* as a useful tool for protein hydrolysate preparations with improved functional properties. J Food Sci. 2012 Jul;77(7):C791-7. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02773. x. Rahulan R, Dhar KS, Nampoothiri KM, Pandey A.**

Se evalúa la eficiencia de la aminopeptidasa de *Streptomyces gedanensis* para producir hidrolizados de proteínas (PHs) con mejores propiedades antioxidantes, nutricionales y funcionales y compararlos con los PHs producidos por proteasas comerciales, con el fin de utilizarlos para aplicaciones industriales, especialmente en la producción de alimentos, como aditivos alimentarios en medicina y deporte.

**m) Improving the colloidal and sensory properties of a caseinate hydrolysate using particular exopeptidases. Food Funct. 2018 Nov 14;9(11):5989-5998. doi: 10.1039/c8fo01749b. PMID: 30379169. Ewert J (1), Schlierenkamp F, Nesensohn L, Fischer L, Stressler T.**

La hidrólisis enzimática con endopeptidasas se usa para modificar las propiedades coloidales de las proteínas alimentarias. El fundamento de este estudio es hidrolizar caseinato de sodio con Sternzym BP 25201, porque presenta una endopeptidasa muy parecida a la termolisina de *Geobacillus stearothermophilus*. Dependiendo de la especificidad de la exopeptidasa utilizada, se observaron

modificaciones en las propiedades del hidrolizado, comportamiento coloidal y sabor. No se observó cambios en el amargor, pero más tarde se observaron mejoras en la estabilidad coloidal. En definitiva, las modificaciones que se han obtenido con las exopeptidasas aplicadas ofrecen una potente herramienta para que los investigadores y la industria generen hidrolizados de proteínas no amargos con propiedades coloidales mejoradas.

Como resumen se muestra una tabla (Tabla 2) en la que se describen las características más importantes de cada uno de los artículos mencionados anteriormente.

Tabla 2. Características más relevantes de los artículos mencionados anteriormente (Elaboración propia).

<b>Artículo</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Aminopeptidasa</b>	<b>Utilización</b>
Drinkwater et al., 2017	Terapéutica	M1	Tratamiento infecciones
Rink et al., 2010	Terapéutica	Peptidasas	Estabilización de péptidos farmacéuticos
Li et al., 2003	Terapéutica	Metionina aminopeptidasa (MetAP)	Inhibición bacteriana
Chai y Ye, 2009	Terapéutica	Metionina aminopeptidasa (MetAP)	Inhibición de crecimiento bacteriano
Wang, Chai y Ye, 2015	Terapéutica	Metionina aminopeptidasa (MetAP)	Inhibición bacteriana
Wu et al., 2020	Terapéutica	Aminopeptidasa N	Inhibición del receptor viral/ aminopeptidasa N
Ding et al., 2014	Industrial	Aminopeptidasa específica de prolina	Hidrólisis de colágeno
Shen et al., 2011	Industrial	Aminopeptidasa	Hidrólisis de

		recombinante de <i>Bacillus kaustophilus</i>	proteínas
Pei et al., 2023	Industrial	Aminopectidasa <i>Pseudomonas aeroginosa</i>	Degradación de la queratina
Guevara-Franco, Alonso-Calleja y Cápita, 2010	Industrial	Aminopectidasa de las bacterias Gram- negativas	Marcador de deterioro de materia orgánica
Bohuis et al., 1998	Industrial	Prolina iminopectidasa producida por <i>Propionibacterium shermanii</i>	Desarrollo del sabor de quesos.
Mika, Zorn y Rühl, 2015	Industrial	prolil aminopectidasas, prolil carboxipectidasas y prolil oligopectidasas/prolil endopectidasas	Degradación de proteínas como gluten, colágeno y caseína
Qin et al., 2020	Industrial	Aminopectidasa derivada de <i>Streptomyces canus</i> T20	Desamargado en péptidos de arroz
Phahler et al., 2016	Industrial	Aminopectidasa N y la peptidasa específica de prolina PepX	Hidrólisis y reducción del amargor
Wang et al., 2012	Industrial	Leucina aminopectidasa de <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2 (GtLAP)	Hidrólisis de proteínas
Wang et al., 2012	Industrial	Leucina	Hidrólisis de

		aminopeptidasa II recombinante (rLAP II) de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	proteínas
Shiraishi, Tsukasaki y Kiminogawa, 2003	Industrial	Aminopeptidasa de <i>Streptococcus thermophilus</i>	Reducción del efecto amargo
Rahulan et al., 2012	Industrial	Aminopeptidasa de <i>Streptomyces gedanensis</i>	Hidrolizado de proteínas con mejores propiedades antioxidantes, nutricionales y funcionales
Schlierenkamp et al., 2018	Industrial	Endopeptidasa parecida a termolisina de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Hidrólisis del caseinato de sodio

Según los resultados obtenidos con la búsqueda que se ha realizado con las palabras clave utilizadas anteriormente se observa que la gran mayoría de las aplicaciones terapéuticas están dirigidas a la inhibición bacteriana o la inhibición de la aminopeptidasa N, y para ello emplean la metionina aminopeptidasa y la aminopeptidasa N. También se utilizan para el tratamiento de infecciones, con la aminopeptidasa M1. Por último, se aplica para la estabilización de péptidos farmacéuticos a través de varios tipos de peptidasas. Si bien Drinkwater y colaboradores presentan una revisión de un grupo amplio de aminopeptidasas (Drinkwater et al., 2028), el resto de artículos de esta sección se centran en casos particulares, mejorando los conocimientos estructurales y funcionales de la enzima que permitan inhibir más eficientemente. El caso de Wu et al. 2020, es algo más indirecto, pero no menos eficaz, ya que pone de manifiesto que los conocimientos adquiridos sobre una aminopeptidasa que sirve como receptor de un virus en las células de Paneth del intestino podrían utilizarse para inhibir la adhesión y entrada del mismo al

hospedador.

En cambio, en el caso de las aplicaciones industriales, se observa una mayor homogeneidad ya que todas las entradas encontradas están dirigidas a hidrólisis de proteínas en general (Mika et al., 2015) o específicas como el caso del colágeno y del caseinato de sodio (Ewert et al., 2018), permitiendo con ello diversas aplicaciones más variadas como es la reducción del amargor en diferentes alimentos, la degradación de proteínas como el gluten, las ya mencionadas colágeno y caseína o incluso la queratina (Pei et al., 2023), con consecuencias, entre otras, en la producción de quesos y el aumento y mejora de sus propiedades nutricionales. Cada una de estas aplicaciones industriales son usadas con distintas variedades de aminopeptidasas bacterianas y en muchos casos más específicamente con la aminopeptidasa N.

Cabe destacar que todas las aplicaciones industriales encontradas en las entradas discutidas aquí están circunscritas al ámbito de la industria alimentaria, lo que refleja la gran importancia de este tipo de enzimas en este campo frente a otros como los detergentes, por ejemplo, donde es posible que las aminopeptidasas pierdan interés o eficacia económica frente a otras enzimas más generalistas, de menor coste y más asequibles en general.

## **5. CONCLUSIONES**

En este Trabajo Fin de Grado se ha hecho un estudio previo e introductorio sobre las aminopeptidasas en general y las aminopeptidasas de origen bacteriano en particular para sentar las bases de una revisión sistemática basada en las entradas obtenidas tras la aplicación de palabras clave concretas. En relación a los objetivos propuestos anteriormente y tras haber hecho un análisis de lo expuesto, las conclusiones son:

- Las aplicaciones terapéuticas de las aminopeptidasas están dirigidas sobre todo a tratamiento de infecciones mediante la estabilización de péptidos farmacéuticos y la inhibición bacteriana.
- La inhibición de las aminopeptidasas en infecciones se ha aplicado con la metionina aminopeptidasa y en los receptores de las células de Paneth.

- Las aplicaciones industriales de las aminopeptidasas están dirigidas principalmente a producir hidrolizados de macromoléculas, que serán de gran importancia en la industria alimentaria.
- Los hidrolizados de proteínas no amargos con propiedades mejoradas en la industria alimentaria se han observado en el arroz, el queso y las anchoas.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

-Adams, M. (1993). Enzimas y proteínas de órganos que crecen cerca y por encima de 100°C. *Microbiol*, (47), p.627-p.658.

-Akioka, M., Nakano, H., Horikiri, A., Tsujimoto, Y., Matsui, H., Shimizu, T., Nakatsu, T., Kato, H., and Watanabe, K. (2006). Overexpression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of a proline-specific aminopeptidase from *Aneurinibacillus* sp. strain AM-1. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*, 62(Pt 12), 1266–1268.

<https://doi.org/10.1107/S1744309106047543>

-Arima, J., Iwabuchi, M., and Hatanaka, T. (2004). Gene cloning and overproduction of an aminopeptidase from *Streptomyces septatus* TH-2, and comparison with a calcium-activated enzyme from *Streptomyces griseus*. *Biochemical and biophysical research communications*, 317(2), 531–538. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.082>

- Arima, J., Uesugi, Y., Iwabuchi, M., and Hatanaka, T. (2006). Study on peptide hydrolysis by aminopeptidasas from *Streptomyces griseus*, *Streptomyces septatus* and *Aeromonas proteolytica*. *Applied microbiology and biotechnology*, 70(5), 541–547. \_

<https://doi.org/10.1007/s00253-005-0105-8>

- Arima, J., Uesugi, Y., Uraji, M., Yatsushiro, S., Tsuboi, S., Iwabuchi, M., and Hatanaka, T. (2006). Modulation of *Streptomyces leucine* aminopeptidase by calcium: identification and functional analysis of key residues in activation and stabilization by calcium. *The Journal of biological chemistry*, 281(9), 5885–5894. \_

<https://doi.org/10.1074/jbc.M509025200>

- Bauvois, B., and Dauzonne, D. (2006). Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. *Medicinal research reviews*, 26(1), 88–130. <https://doi.org/10.1002/med.20044>
  
- Bauwens, L., Vercammen, F., and Hertsens, A. (2003). Detection of pathogenic *Listeria* spp. in zoo animal faeces: use of immunomagnetic separation and a chromogenic isolation medium. *Veterinary microbiology*, 91(2-3), 115–123. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00265-1](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00265-1)
  
- Ben-Bassat, A., Bauer, K.A., Chang, S., and Chang, S.Y. (1991). Bacterial methionine N-terminal peptidases. US Patent 5,013,662.
  
- Bertin, P. B., Lozzi, S. P., Howell, J. K., Restrepo-Cadavid, G., Neves, D., Teixeira, A. R., de Sousa, M. V., Norris, S. J., and Santana, J. M. (2005). The thermophilic, homohexameric aminopeptidase of *Borrelia burgdorferi* is a member of the M29 family of metallopeptidases. *Infection and immunity*, 73(4), 2253–2261. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.2253-2261.2005>
  
- Bienvenue, D. L., Mathew, R. S., Ringe, D., and Holz, R. C. (2002). The aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica* can function as an esterase. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 7(1-2), 129–135. <https://doi.org/10.1007/s007750100280>
  
- Butler, M. J., Bergeron, A., Soostmeyer, G., Zimny, T., and Malek, L. T. (1993). Cloning and characterisation of an aminopeptidase P-encoding gene from *Streptomyces lividans*. *Gene*, 123(1), 115–119. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90549-i](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90549-i)
  
- Chai, S. C., and Ye, Q. Z. (2009). Metal-mediated inhibition is a viable approach for inhibiting cellular methionine aminopeptidase. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, 19(24), 6862–6864. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.10.082>
  
- Chevalet, L., Soupe, J., De Leseleuc, J., Burnet, J., y Warmerdam, M.J. (2001). Composiciones de aminopeptidasa de *Aspergillus niger* para hacer masas de

pan y queso. US Patent 6,271,013.

- Ding, G. W., Zhou, N. D., and Tian, Y. P. (2014). Over-expression of a proline specific aminopeptidase from *Aspergillus oryzae* JN-412 and its application in collagen degradation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 173(7), 1765–1777. \_

<https://doi.org/10.1007/s12010-014-0963-6>

- Drinkwater, N., Lee, J., Yang, W., Malcolm, T. R., and McGowan, S. (2017). M1 aminopeptidases as drug targets: broad applications or therapeutic niche?. *The FEBS journal*, 284(10), 1473–1488. <https://doi.org/10.1111/febs.14009>

-Ewert, J., Schlierenkamp, F., Nesensohn, L., Fischer, L., and Stressler, T. (2018). Improving the colloidal and sensory properties of a caseinate hydrolysate using particular exopeptidases. *Food Funct*: <https://doi.org/10.1039/c8fo01749b> [rsc.li/food-function](https://doi.org/10.1039/c8fo01749b).

- FitzGerald, R. J., and O'Cuinn, G. (2006). Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. *Biotechnology advances*, 24(2), 234–237. \_

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.11.002>

- Gatti, M., De Dea Lindner, J., Gardini, F., Mucchetti, G., Bevacqua, D., Fornasari, M. E., and Neviani, E. (2008). A model to assess lactic acid bacteria aminopeptidase activities in Parmigiano Reggiano cheese during ripening. *Journal of dairy science*, 91(11), 4129–4137. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1069>

-Gatti, M., Fornasari, M.E., Mucchetti, G., Addeo, F., y Neviani, E. (1999). Presencia de actividades peptidasas en diferentes variedades de queso. *Lett Appl Microbiol*.

28(5):368–372. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00541.x>

- Guevara-Franco, J. A., Alonso-Calleja, C., and Capita, R. (2010). Aminopeptidase activity by spoilage bacteria and its relationship to microbial load and sensory attributes of poultry legs during aerobic cold storage. *Journal of food protection*, 73(2), 322–326. \_

<https://doi.org/10.4315/0362-028x-73.2.322>

- Giesler, L., Linke, D., Rabe, S., Appel, D., and Berger, R. G. (2013). Hydrolysis of wheat gluten by combining peptidases of *Flammulina velutipes* and electro dialysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(36), 8641–8649. <https://doi.org/10.1021/jf401716m>
- Godsell, D.S., y Olson, A.J. (1993). Soluble Proteínas: tamaño. forma y función. *Tendencias Bioquímica. Ciencia* 18. 65-68.
- Hwang, I.K., Kaminogawa, S., y Yamauchi, K. (1981). Purificación y propiedades de una dipeptidasa de *Streptococcus cremoris*. *Agric. Biol. Chem.* 45, 159-165.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., and Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, 169(12), 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Kieliszek, M., Pobiega, K., Piwowarek, K., and Kot, A. M. (2021). Characteristics of the Proteolytic Enzymes Produced by Lactic Acid Bacteria. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(7), 1858. <https://doi.org/10.3390/molecules26071858>.
- Kitazono, A., Yoshimoto, T., and Tsuru, D. (1992). Cloning, sequencing, and high expression of the proline iminopeptidase gene from *Bacillus coagulans*. *Journal of bacteriology*, 174(24), 7919–7925. <https://doi.org/10.1128/jb.174.24.7919-7925.1992>
- Leenhouts, K., Bolhuis, A., Boot, J., Deutz, I., Toonen, M., Venema, G., Kok, J., and Ledebøer, A. (1998). Cloning, expression, and chromosomal stabilization of the *Propionibacterium shermanii* proline iminopeptidase gene (pip) for food-grade application in *Lactococcus lactis*. *Applied and environmental microbiology*, 64(12), 4736–4742. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.12.4736-4742.1998>
- Little A.J., Sutherland, J.D., Wilson, E.J., and Wood-Collins. D.A.J. (1994). Directed evolution of novel biosynthetic pathways: overexpression of leucine aminopeptidase allows an *Escherichia coli* proline auxotroph to grow faster on prolinamide. *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.*, 4, 2555–2558. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)80282-1](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)80282-1)

- Lowther, W.T., y Matthews, B.W. (2002). Metalloaminopeptidases: Common Functional Themes in Disparate Structural Surroundings. *Chem Rev* 102 (12):4581–4608. <https://doi.org/10.1021/cr0101757>
- MacCaman, M.T., and Villarejo, M.R., (1982). Structural and catalytic properties of peptidase N from *Escherichia coli*: fi K-12. *Arq. Bioquímica. Biophys.* 213, 384-394. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(82\)90564-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(82)90564-1)
- Meyer-Barton, E., Klein, J.R., Henrich, B., and Plapp, R. (1993). X-prolyl- dipeptidyl peptidase from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, nucleic acids coding for the same and its use in fermented food stuff process of preparation. Patent WO94/16082.
- Mika, N., Zorn, H., and Rühl, M. (2015). Prolyl-specific peptidases for applications in food protein hydrolysis. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(19), 7837–7846. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6838-0>
- Motoshima, H., Shiraishi, T., Tsukasaki, F., and Kaminogawa, S. (2003). Purification, characterization, and gene cloning of lysyl aminopeptidase from *Streptococcus thermophilus* YRC001. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 67(4), 772–782. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.772>
- Nandan, A. S., and Nampoothiri, K. M. (2014). Unveiling aminopeptidase P from *Streptomyces lavendulae*: molecular cloning, expression and biochemical characterization. *Enzyme and microbial technology*, 55, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.11.003>
- Nandan, A.S., and Nampoothiri, K.M. (2017). Molecular advances in microbial aminopeptidases. *Bioresour Technol* 245 (Parte B):1757–1765. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.103>
- Nandan, A., and Nampoothiri, K. M. (2020). Therapeutic and biotechnological applications of substrate specific microbial aminopeptidases. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(12), 5243–5257. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10641-9>

- Oliveira, H. S., Mamede, M. E., Góes-Neto, A., and Koblitiz, M. G. (2011). Improving chocolate flavor in poor-quality cocoa almonds by enzymatic treatment. *Journal of food science*, 76(5), C755–C759. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02168.x>
  
- Pei, X. D., Li, F., Yue, S. Y., Huang, X. N., Gao, T. T., Jiao, D. Q., and Wang, C. H. (2023). Production and characterization of novel thermo- and organic solvent-stable keratinase and aminopeptidase from *Pseudomonas aeruginosa* 4-3 for effective poultry feather degradation. *Environmental science and pollution research international*, 30(2), 2480–2493. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22367-4>
  
- Petrovic, N., Schacke, W., Gahagan, J. R., O'Connor, C. A., Winnicka, B., Conway, R. E., Mina-Osorio, P., and Shapiro, L. H. (2007). CD13/APN regulates endothelial invasion and filopodia formation. *Blood*, 110(1), 142–150. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-002931>
  
- Qin, Q., Tang, C., Wu, J., Chen, S., and Yan, Z. (2021). A dual-functional aminopeptidase from *Streptomyces canus* T20 and its application in the preparation of small rice peptides. *International journal of biological macromolecules*, 167, 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.175>
  
- Rahulan, R., Dhar, K. S., Nampoothiri, K. M., and Pandey, A. (2012). Aminopeptidase from *Streptomyces gedanensis* as a useful tool for protein hydrolysate preparations with improved functional properties. *Journal of food science*, 77(7), C791–C797. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02773.x>
  
- Rink, R., Arkema-Meter, A., Baudoin, I., Post, E., Kuipers, A., Nelemans, S. A., Akanbi, M. H., and Moll, G. N. (2010). To protect peptide pharmaceuticals against peptidases. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 61(2), 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.02.010>
  
- Scharf, U., Stolz, P., Huscroft, S.C., and Schmidt-Hahn, K. (2006). Use of aminopeptidase in dough, doughs and bread improvers comprising aminopeptidase. Patent Request. WO2006/009447

- Shen, Y., Wang, F., Lan, D., Liu, Y., Yang, B., and Wang, Y. (2011). Biochemical properties and potential applications of recombinant leucine aminopeptidase from *Bacillus kaustophilus* CCRC 11223. *International journal of molecular sciences*, 12(11), 7609–7625. <https://doi.org/10.3390/ijms12117609>
- Singh, S., Kumar, V., Kanwar, R., Wani, A. B., Gill, J. P. K., Garg, V. K., Singh, J., and Ramamurthy, P. C. (2021). Toxicity and detoxification of monocrotophos from ecosystem using different approaches: A review. *Chemosphere*, 275, 130051. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130051>
- Stressler, T., Pfahler, N., Merz, M., Hubschneider, L., Lutz-Wahl, S., Claaßen, W., and Fischer, L. (2016). A fusion protein consisting of the exopeptidases PepN and PepX-production, characterization, and application. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(17), 7499–7515. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7478-8>
- Strøman P. (1992). Sequence of a gene (lap) encoding a 95.3-kDa aminopeptidase from *Lactococcus lactis* ssp. cremoris Wg2. *Gene*, 113(1), 107–112. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90676-g](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90676-g)
- Sweeney, P.J., and Walker, J.M. (1993). Aminopeptidasas. En: Métodos en Biología Molecular; Enzimas de Biología Molecular (Burrell, M.M. y Totowa. N.J., Eds.), vol. 1Fi, págs. 319—329. Humana Press Inc.
- Taylor, A. (1993). Aminopeptidasas: estructura y función. *FASEB J* 7(2):290–298. <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.2.8440407>
- Taylor, A. (1993). Aminopeptidasa hacia un mecanismo de acción. *Trends Biochem Sci* 18(5):167–171
- Umezawa, Y., Yokoyama, K., Kikuchi, Y., Date, M., Ito, K., Yoshimoto, T., and Matsui, H. (2004). Novel prolyl tri/tetra-peptidyl aminopeptidase from *Streptomyces mobaraensis*: substrate specificity and enzyme gene cloning. *Journal of biochemistry*, 136(3), 293–300. <https://doi.org/10.1093/jb/mvh129>

- Virgili, R., Schivazappa, C., Parolari, G., Bordini, CS., and Degni, M. (2007). Proteases in fresh pork muscle and their influence on bitter taste formation in dry-cured ham. *Food Biochem* 22(1):53–63. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1998.tb00230.x>
- Vitale, L., Renko, M., Lenarcic, B., Turk, V., and Pokorny, M. (1986). *Streptomyces rimosus* extracellular proteases 3. Isolation and characterization of leucine aminopeptidase. *Appl Microbiol Biotechnol* 23, 449–455 (1986). <https://doi.org/10.1007/BF02346059>
- Voigt, J., Biehl, B., Heinrichs, H., Kamaruddin, S., Marsoner, G.C., and Hugi, A. (1994). In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma related peptides generated from cocoa seed protein by cooperation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. *Food Chem* 49(2):173–180. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90155-4](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90155-4)
- Voigt, J., Heinrichs, H., Voigt, G., and Biehl B (1994). Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa sedes. *Food Chem* 50(2):177–184. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90117-1](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90117-1)
- Vo-Van, T., Kusakabe, I., and Murakami, K. (1984). The Aminopeptidase Activity in Fish Sauce, *Agricultural and Biological Chemistry*, 48:(2), 525-527. <https://doi.org/10.1080/00021369.1984.10866173>
- Wallace, R. J., and McKain, N. (1997). Peptidase activity of human colonic bacteria. *Anaerobe*, 3(4), 251–257. <https://doi.org/10.1006/anae.1997.0080>
- Wang, W. L., Chai, S. C., and Ye, Q. Z. (2009). Synthesis and structure-function analysis of Fe (II)-form-selective antibacterial inhibitors of *Escherichia coli* methionine aminopeptidase. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, 19(4), 1080–1083. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.01.011>

- Wang, F., Guo, S., Liu, Y., Lan, D., Yang, B., and Wang, Y. (2012). Biochemical and conformational characterization of a leucine aminopeptidase from *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2. *World journal of microbiology & biotechnology*, 28(11), 3227–3237. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1133-z>
- Wang, F., Ning, Z., Lan, D., Liu, Y., Yang, B., and Wang, Y. (2012). Biochemical properties of recombinant leucine aminopeptidase II from *Bacillus stearothermophilus* and potential applications in the hydrolysis of Chinese anchovy (*Engraulis japonicus*) proteins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(1), 165–172. <https://doi.org/10.1021/jf204002e>
- Westley, J. W., Anderson, P. J., Close, V. A., Halpern, B., and Lederberg, E. M. (1967). Aminopeptidase profiles of various bacteria. *Applied microbiology*, 15(4), 822–825. <https://doi.org/10.1128/am.15.4.822-825.1967>
- Wu, A., Yu, B., Zhang, K., Xu, Z., Wu, D., He, J., Luo, J., Luo, Y., Yu, J., Zheng, P., Che, L., Mao, X., Huang, Z., Wang, L., Zhao, J., and Chen, D. (2020). Transmissible gastroenteritis virus targets Paneth cells to inhibit the self-renewal and differentiation of Lgr5 intestinal stem cells via Notch signaling. *Cell death & disease*, 11(1), 40. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2233-6>
- Yoshida, T., and Nagasawa, T. (2003). Epsilon-Poly-L-lysine: microbial production, biodegradation and application potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 62(1), 21–26. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1312-9>
- Zhang, L., Li, J., and Zhou, K. (2010). Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. *Bioresource technology*, 101(7), 2084–2089. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.078>