



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ENZIMAS COMO POTENCIALES SUPLEMENTOS:
EVALUACIÓN DEL SINERGISMO DE PROTEINASAS
ADICIONADAS A EXTRACTOS ENZIMÁTICOS DEL
SISTEMA DIGESTIVO DE DECÁPODOS.

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biotecnología)

Presenta

MARGARITA GONZÁLEZ ZAMORANO

La Paz, Baja California Sur, Julio de 2014

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 01 del mes de julio del 2014, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Enzimas como potenciales suplementos alimenticios: Evaluación del sinergismo de proteinasas adicionadas a extractos enzimáticos del sistema digestivo de decápodos"

Presentada por el alumno:

Margarita González Zamorano

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biotecnología.**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA DE TESIS

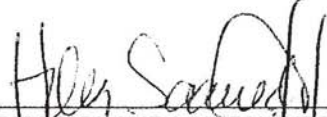

DRA. NORMA YOLANDA HERNÁNDEZ SAAVEDRA


DRA. ADRIANA MUHLIA ALMAZÁN


DRA. J. MARINA EZQUERRA BRAUER


DR. JULIO CORDOVA MIRUETA


DRA. L. ELIZABETH CRUZ SUÁREZ


DRA. NORMA YOLANDA HERNÁNDEZ SAAVEDRA,
ENCARGADA DEL DESPACHO DE LA DIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO Y
FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS

COMITÉ TUTORIAL

DR. FERNANDO GARCÍA CARREÑO
Director de Tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

DRA. ADRIANA MUHLIA ALMAZÁN
Co-tutor
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

DR. REINHARD SABOROWSKI
Co-tutor
Alfred Wegener Institute.

DR. JULIO CÓRDOVA MURUETA
Co-tutor
Centro de Investigación Biológicas del Noroeste, S. C.

DR. FRANCISCO VARGAS ALBORES
Co-tutor
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

COMITÉ REVISOR DE TESIS

DRA. ADRIANA MUHLIA ALMAZÁN
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

DR. JULIO CÓRDOVA MURUETA
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

DRA. LUCIA ELIZABETH CRUZ SUAREZ
Universidad Autónoma de Nuevo León.

DRA. MARINA JOSFAT ESQUERRA BRAUER
Universidad de Sonora.

DRA. NORMA YOLANDA HERNANDEZ SAAVEDRA
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

MIEMBROS DEL JURADO DE LA DEFENSA DE TESIS

DRA. ADRIANA MUHLIA ALMAZÁN

DR. JULIO CÓRDOVA MURUETA

DRA. LUCIA ELIZABETH CRUZ SUAREZ

DRA. MARINA JOSFAT ESQUERRA BRAUER

DRA. NORMA YOLANDA HERNANDEZ SAAVEDRA

DR. HÉCTOR NOLASCO SORIA - Suplente -

DR. DARIEL TOVAR RAMÍREZ- Suplente -

ENZIMAS COMO POTENCIALES SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS: EVALUACIÓN DEL SINERGISMO DE PROTEINASAS ADICIONADAS A EXTRACTOS ENZIMÁTICOS DEL SISTEMA DIGESTIVO DE DECÁPODOS.

RESUMEN

En tecnología de alimentos, los suplementos enzimáticos son utilizados para incrementar la actividad enzimática en el sistema digestivo y mejorar la digestión de tal modo que la hidrólisis de los componentes poliméricos provenientes del alimento se incremente y por ende la absorción y asimilación de los monómeros. El efecto de las enzimas administradas en el alimento sobre la digestión y desarrollo de los animales que las consumen ha sido investigado *in vitro* e *in vivo*. En los estudios sobre suplementación de alimentos para camaronicultura se han utilizado enzimas provenientes de plantas, microorganismos, mamíferos o decápodos; sin embargo los resultados no siempre son significativamente positivos. El efecto de los suplementos enzimáticos sobre el animal que los consume es variable y las causas aún permanecen sin esclarecer, ya que los estudios sobre el destino de las enzimas exógenas y su modo de acción son realmente escasos. En este trabajo recurrió a una aproximación *in vitro*, utilizando al camarón patiblanco *Litopenaeus vannamei* como modelo para comprender cuál es el destino de las enzimas exógenas utilizadas como suplemento cuando se encuentran con las secreciones de la glándula digestiva. Diferentes proteinasas fueron evaluadas como potenciales suplementos para evaluar su capacidad de mantener su actividad en presencia de las secreciones de la glándula digestiva de *L. vannamei* y si su presencia contribuye a la hidrólisis de un sustrato proteico. En los ensayos *in vitro* se utilizaron proteinasas comerciales del tipo serino (tripsina y quimotripsina bovina, tripsina porcina) o del tipo cisteíno (bromelaina) y proteinasas digestivas provenientes del fluido gástrico de otros decápodos que contienen principalmente proteinasas del tipo serino (el cangrejo nadador de Cortez, *Callinectes bellicosus*; la langosta roja de California, *Panulirus interruptus* y el cangrejo café *Cancer pagurus*) o del tipo aspártico (la langosta Europea, *Homarus gammarus* y la langosta Americana, *Homarus americanus*). El extracto enzimático obtenido de la glándula digestiva de *L. vannamei* se mezcló con las proteinasas experimentales de forma independiente. La actividad proteolítica total en las mezclas se evaluó por zimograma, los resultados demostraron que las proteinasas provenientes del fluido gástrico de decápodos permanecieron activas en presencia del extracto enzimático de la glándula digestiva de *L. vannamei* y contribuyeron a la proteólisis, mientras que las proteinasas comerciales perdieron actividad rápidamente. Esta pérdida de actividad se atribuyó a la hidrólisis producida por las isotripsinas e isoquimotripsinas de *L. vannamei* sobre las proteinasas comerciales. El presente trabajo estudió particularmente la hidrólisis de las tripsinas de mamífero producida por las tripsinas del camarón. El estudio comparativo de la estructura primaria, *in silico*, de las tripsinas de decápodos y mamíferos demostró que las últimas tienen más sitios de hidrólisis en comparación con las tripsinas de algunos decápodos

del infraorden: Penaeidae, Palinura y Brachyura, incluyendo las tres isotripsinas de *L. vannamei*. Aunque futuras investigaciones son necesarias, los datos sugieren que las serino y aspártico proteinasas de decápodos que tienen un efecto sinérgico *in vitro* con las proteinasas del camarón para hidrolizar un sustrato proteico, pueden mantener este efecto *in vivo*. Este trabajo permitió sentar bases para el estudio de enzimas proteolíticas con potencial uso como suplemento de alimento para organismos en cultivo como el camarón y otras especies de decápodos. Además se estableció una estrategia para estudiar, *in vitro*, la estabilidad de suplementos proteolíticos a las secreciones digestivas de diversas especies y su contribución a la proteólisis. PALABRAS CLAVE: Suplementos alimenticios, proteinasas, *Litopenaeus vannamei*.

ENZYMES AS POTENTIAL FOOD SUPPLEMENTS: ASSESING SYNERGY OF EXOGENOUS PROTEINASES ADDED TO ENZYME EXTRACTS FROM DECAPODS' DIGESTIVE SYSTEM

In food technology, enzyme supplements are used to increase enzymatic activity in the digestive system and improve digestion by increasing hydrolysis of polymeric food components and hence monomer absorption and assimilation. The effect of enzymes as food supplements on animals' growth has been investigated *in vitro* and *in vivo*. In food supplement studies for shrimp culture, enzymes from plants, microorganisms, mammals or decapods have been used; however the results have not always been significantly positive since their effect on the organism depends on their constant activity in the digestive system to act on food components. Nevertheless, studies on the objective and mode of action of exogenous enzymes are scarce. In this study an approximation *in vitro* was designed with white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* to understand the objective of these enzymes used as supplement when they enter the digestive system and confront the secretions of the shrimp's digestive gland. *In vitro* assays were performed with commercial serine (bovine chymotrypsin and trypsin, porcine trypsin), cysteine proteinases (bromelain), and digestive proteinases from the gastric fluid of other decapods that contain mainly serine (Cortez swimming crab *Callinectes bellicosus*, the California spiny lobster *Panulirus interruptus*, and brown crab *Cancer pagurus*) or aspartic proteinases (European lobster *Homarus gammarus* and American lobster *Homarus americanus*). The enzyme extract obtained from *L. vannamei*'s digestive gland was mixed *in vitro* with experimental proteinases independently. Total proteolytic activity in the mixtures was evaluated by zymogram. The results showed that the digestive proteinases from decapods remained active in the presence of the enzyme extract from *L. vannamei*'s digestive gland, which contributed to proteolysis of the protein substrates tested whereas the activity of commercial proteinases was lost rapidly; this loss of activity was attributed to the hydrolysis produced by *L. vannamei*'s isotrypsins and isochymotrypsins on commercial enzymes. This work studied mammalian trypsin hydrolysis produced by shrimp trypsins. The comparative study of the primary structure *in silico*, of mammalian and decapod trypsins showed that porcine and bovine trypsins have more hydrolysis sites compared to those of some decapods from the Infraorder: Penaeidae, Palinura, and Brachyura. Although further research is needed, data suggest that decapod's serine and aspartic proteinases have a synergistic effect *in vitro* with those in shrimp to hydrolyze a protein substrate, which could be maintained *in vivo*. This work laid the foundation to study proteolytic enzymes with potential use as food supplement for farmed organisms such as shrimp and other decapod species. Furthermore, a strategy was established to study *in vitro* the stability of protein supplements when they confront digestive secretions of different species and their contribution to protein substrate hydrolysis. KEY WORDS: Feed supplements, proteinases, *Litopenaeus vannamei*.

A mi pequeño Emiliano y de corazón a corazón al amor de mi vida.

A los ángeles que no sueltan mi mano (Mamá, Papá, Adís, May, Paty, Sil y Ann).

Adís no hay palabras para reconocer y agradecer a un corazón único y a un amor incondicional, permíteme con esto devolverte lo mucho que de tí que me das.

Agradecimientos

Agradezco a CONACyT por el apoyo recibido a través de la beca doctoral número 214851 así como al apoyo otorgado al proyecto “EFECTO DE PROTEINASAS E INHIBIDORES DE PROTEINASAS EXÓGENOS EN LA DIGESTIÓN DE CRUSTÁCEOS” con clave CB-2010-01 000000000155119.

Agradezco al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., particularmente al Laboratorio de Bioquímica por el espacio brindado y al técnico del laboratorio Ma. de los Ángeles Navarrete del Toro.

Agradezco a los miembros del comité tutorial y al comité revisor su valioso tiempo y apoyo.

Reconozco infinitamente a la M.C Diana Leticia Dorantes Salas por su apoyo en la edición del resumen en inglés. Gracias por su colaboración y amistad.

A todos los miembros de la dirección de posgrado por su apoyo a los estudiantes, en especial mil gracias a Claudia, Tania, Lic. Osvelia y Lic. Leticia.

Gracias por su amistad y apoyo, Claudia Maytorena y Betsaida Bibó invaluable los momentos compartidos. Y gracias a todos los amigos que se sumaron en mi camino agradezco su mano y la hermosa amistad, gracias por que cada día la lista es más larga.

Solo quienes me conocen saben lo que esta meta significa para mí.

CONTENIDO

Resumen en español.....	i
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
CONTENIDO.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABLAS.....	ix
ABREVIACIONES.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.2 El camarón como modelo de estudio.....	7
2.2.1 El sistema digestivo de los decápodos.....	8
2.2.2 Las proteinasas digestivas de los decápodos.....	10
3. JUSTIFICACIÓN.....	13
4. HIPÓTESIS.....	14
5. OBJETIVOS.....	14
5.1 Objetivo general.....	14
5.2 Objetivos específicos.....	14
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
6.1 Animales experimentales.....	15
6.2 Proteinasas a evaluar como potenciales suplementos.....	16
6.2.1 Preparación de las soluciones con proteinasas comerciales.....	16
6.2.2 Preparación de las proteinasas digestivas de decápodos.....	18
6.3 Selección del sustrato proteico para evidenciar la sinergia entre las proteinasas exógenas y las proteinasas digestivas de <i>L. vannamei</i>	18
6.4 Hidrólisis de BSA producida por la mezcla de proteinasas.....	19
6.5 Evaluación de la actividad e integridad de las proteinasas exógenas, en presencia del extracto enzimático de la glándula digestiva de <i>L. vannamei</i>	21
6.6 Efecto de la concentración de las proteinasas digestivas de <i>L. vannamei</i> sobre la actividad de las proteinasas exógenas.....	21
6.7 Aislamiento e identificación de la(s) proteina(s) digestiva(s) de <i>L. vannamei</i> responsable(s) de la hidrólisis de las proteinasas exógenas.....	22
6.8 Estudio estructural comparativo de tripsinas de decápodos y tripsinas de mamífero, <i>in silico</i>	23
7. RESULTADOS.....	25
7.1 Análisis de la actividad proteolítica total y proteína soluble en las preparaciones enzimáticas comerciales y de decápodos.....	25
7.2 Selección del sustrato proteico para determinar la sinergia de las proteinasas evaluadas y sus mezclas.....	26
7.3 Hidrólisis de BSA originada por las proteinasas digestivas de <i>L. vannamei</i> en presencia de proteinasas exógenas a pH básico.....	29
7.4 Hidrólisis de BSA originada por las proteinasas digestivas de <i>L. vannamei</i> en presencia de proteinasas exógenas ácidas.....	30
7.5 Actividad e integridad de las serino proteinasas exógenas en presencia del extracto	

enzimático de <i>L. vannamei</i>	31
7.6 Actividad e integridad de las cisteíno y aspártico proteinasas exógenas en presencia del extracto enzimático de <i>L. vannamei</i>	33
7.7 Efecto de la concentración de las proteinasas digestivas de <i>L. vannamei</i> sobre la actividad de las proteinasas exógenas comerciales.....	34
7.8 Serino proteinasas digestivas de <i>L. vannamei</i> responsables de la hidrólisis de tripsina bovina y porcina.....	36
7.9 Estudio estructural in silico de las proteinasas digestivas de <i>L. vannamei</i> , responsables de la hidrólisis de la tripsina bovina y porcina.....	37
7.10 Análisis comparativo del modelo tridimensional de tripsina A de <i>L. vannamei</i> y tripsina bovina.....	43
8. DISCUSIÓN.....	47
9. CONCLUSIONES.....	52
9.1 Recomendaciones generales.....	53
10. REFERENCIAS.....	54
11. ANEXOS.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del sistema digestivo de decápodos.....	9
Figura 2. Diagrama esquemático del proceso digestivo en decápodos.....	9
Figura 3. Hidrólisis de BSA evaluada por SDS-PAGE.....	28
Figura 4. Hidrólisis de BSA originada por las proteinasas de <i>L. vannamei</i> en presencia de serino proteinasas exógenas.....	30
Figura 5. Hidrólisis de BSA producida por las proteinasas digestivas de <i>L. vannamei</i> en presencia de proteinasas exógenas ácidas.....	31
Figura 6. Actividad proteolítica de proteinasas exógenas básicas en presencia de proteinasas digestivas de <i>L. vannamei</i>	32
Figura 7. Actividad de proteinasas exógenas ácidas en presencia de proteinasas digestivas de <i>L. vannamei</i>	33
Figura 8. Hidrólisis de tripsina porcina y bovina en presencia de proteinasas digestivas de <i>L. vannamei</i>	35
Figura 9. Pérdida de la actividad tripsina bovina en presencia de las serino proteinasas de <i>L. vannamei</i>	36
Figura 10. Pérdida de la actividad de tripsina porcina producida por las tripsinas de <i>L. vannamei</i>	37
Figura 11. Comparación de la estructura primaria de tripsina bovina y porcina con tripsinas de decápodos.....	38,39,40
Figura 12. Glicosilación en las isotripsinas de <i>L. vannamei</i>	41
Figura 13. Modificación de Lys con grupos metilo (ϵ -N, N-dimetil-lisina).....	42
Figura 14. Interacción de la triada catalítica de tripsina y los sitios P1-P4 del sustrato.....	42
Figura 15. Hidrólisis de tripsina porcina y tripsina porcina metilada producida por isotripsinas de <i>L. vannamei</i>	43
Figura 16. Comparación del modelo estructural de la isotripsina A y tripsina bovina.....	44
Figura 17. Comparación de la superficie molecular de tripsina bovina e isotripsina A de <i>L. vannamei</i>	45
Figura 18. Proximidad de sitios de glicosilación a los sitios potenciales de hidrólisis en la isotripsina A de <i>L. vannamei</i>	46

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Mezclas de reacción para evaluar la hidrólisis de BSA por enzimas digestivas de <i>L. vannamei</i> con o sin proteinasas exógenas.....	20
Tabla II. Actividad proteolítica y proteína soluble en las preparaciones para proteinasas básicas.....	25
Tabla III. Actividad proteolítica y proteína soluble en las preparaciones para proteinasas ácidas.....	26
Tabla IV. Hidrólisis de los sustratos proteicos producida por el extracto enzimático de <i>L. vannamei</i> y las proteinasas exógenas (comerciales o fluidos gástricos de decápodos.....	27
Tabla V. Comparación del número de Lys, Arg y sitios predichos de glicosilación entre la estructura primaria de tripsina bovina, porcina y decápodos.....	40
Tabla VI. Sitios potenciales de glicosilación en quimotripsinas de <i>L. vannamei</i>	40

ABREVIACIONES

A: Isotripsina A de *Litopenaeus vannamei*
Arg: Arginina, K
Asn: Asparagina, N
B: Isotripsina B de *Litopenaeus vannamei*
BCHY: Quimotripsina bovina (Bovine Chymotrypsin)
BR: Bromelaina
BSA: Albúmina sérica bovina (Bovine Serum Albumin).
BTRY: Tripsina bovina (Bovine Trypsin)
C: Isotripsina C de *Litopenaeus vannamei*
CAS: Caseína bovina
CB: Fluido gástrico de *Callinectes bellicosus*
ChyH: Quimotripsina de alto peso molecular de *Litopenaeus vannamei*
ChyL: Quimotripsina de bajo peso molecular de *Litopenaeus vannamei*
CP: Fluido gástrico de *Cancer pagurus*
Cys: Cisteína, C
FG: Fluido Gástrico (abreviación general para referirse al fluido gástrico de *Callinectes bellicosus*, *Panulirus interruptus*, *Cancer pagurus*, *Homarus gammarus* y *Homarus americanus*)
HA: Fluido gástrico de *Homarus americanus*
Hb: Hemoglobina bovina
HG: Fluido gástrico de *Homarus gammarus*
His: Histidina, H
Leu: Leucina, L
Lys: Lisina, K
PC: Proteinasas Comerciales (abreviación general para referirse a la tripsina bovina, tripsina porcina, quimotripsina bovina y bromelaina)
Phe: Fenilalanina, F
PI: Fluido gástrico de *Panulirus interruptus*
PTRY: Tripsina porcina (Porcine Trypsin)
PTRY-CH₃: Tripsina porcina metilada
LV: Extracto enzimático de la glándula digestiva de *Litopenaeus vannamei*
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (Sodium-Dodecil-Sulfate Polyacrylamide Gel Electroforesis).
Ser: Serina, S
SP: Serino proteinasas (fracción cromatográfica que contiene serino proteinasas de *Litopenaeus vannamei*)
TCA: Ácido tricloroacético
Thr: Treonina, T
Tyr: Tirosina, Y
Trp: Triptófano, W
TRIS-HCl: Hidrocloruro de Tris-hidroximetilaminometano

1. INTRODUCCIÓN

La digestión es un proceso vital para los seres vivos, este requiere de la hidrólisis de compuestos poliméricos como los carbohidratos, lípidos y proteínas para obtener los nutrientes y la energía necesaria para su desarrollo, crecimiento, mantenimiento y reproducción. Este proceso ocurre gracias a la acción mecánica, química y enzimática dentro del tracto digestivo, con el objetivo de generar moléculas más pequeñas y sus monómeros, de tal forma que puedan ser absorbidos en el intestino y dirigidos al torrente sanguíneo para ser metabolizadas dentro de las células, con la finalidad de obtener energía y precursores para el anabolismo celular. En el proceso de la digestión, la acción enzimática se caracteriza por su especificidad y eficiencia, e involucra principalmente la actividad de proteinasas, lipasas y carbohidrasas de diferentes clases para hidrolizar los enlaces que mantienen unidos a los monómeros de los macronutrientes orgánicos (Webb, 1990). La proteína es uno de los macronutrientes más importantes en la formulación de alimentos para animales cultivables y la acuicultura no es la excepción. La importancia de las proteínas radica en dos aspectos, el primero es que representan la fuente de aminoácidos para la síntesis de novo de proteína celular y tisular, y el segundo es que son el insumo de mayor valor en la fabricación de alimentos (Amaya *et al.*, 2007). Hasta la fecha se ha demostrado que en ningún organismo el proceso de la digestión de la proteína es eficiente al 100% y esto puede variar según la fuente de proteína utilizada en el alimento (Smith *et al.*, 1985; Xiang-He *et al.*, 2013). De ahí surge la iniciativa de buscar e implementar diferentes estrategias para incrementar la eficiencia de la digestión y hacer un uso más eficiente del ingrediente, lo que disminuirá el desecho de materia en heces y con ello reducir el impacto en los sitios de cultivo, como un beneficio adicional. Dada la importancia de las enzimas en el proceso digestivo, se ha propuesto la hipótesis de que la adición de enzimas al alimento puede aumentar la eficiencia de la digestión (Campbell y Bedford, 1992).

Se estima que en el mercado mundial el uso de enzimas como suplemento para la alimentación animal tiene un valor aproximado de 3 a 5 mil millones de dólares al año, debido al rápido crecimiento de este mercado en los últimos años (Adeola y Cowieson, 2011). El mercado de los suplementos enzimáticos para animales básicamente se divide en 60% fitasa y 40% para el resto de las enzimas, entre las cuales predominan las glucosidasas como xilanasas (EC 3.2.1.8), glucanasas (EC 3.2.1.6) y en menor medida la α -amilasa, β -mananasa, α -galactosidasa, pectinasa y proteinasas pancreáticas (Campbell y Bedford, 1992; Sirvas-Cornejo *et al.*, 2007; Cowieson y Ravindran, 2008; Adeola y Cowieson, 2011) todas ellas de origen microbiano, vegetal y del sistema digestivo de mamíferos. Sin embargo, recientemente algunos investigadores han explorado fuentes alternativas de proteinasas con potencial uso como suplementos. En 1990 Forrellat *et al.* demostraron que el extracto enzimático de la glándula digestiva del camarón *Penaeus schmitti* adicionado al alimento para postlarvas de *P. schmitti*, producen un efecto positivo sobre el crecimiento de estas, generando un incremento del 23% en peso de los especímenes (Forrellat *et al.*, 1990). Por su parte, García-Carreño *et al.* (datos no publicados) adicionaron extractos enzimáticos de la glándula digestiva de camarón adulto patiblanco *L. vannamei* y del camarón azul *P. californiensis* para suplementar alimento destinado a postlarvas de *P. californiensis* y estudiar el efecto sobre su desarrollo. En este estudio los autores registraron un incremento del 64% en el peso de las postlarvas alimentadas con extracto enzimático de glándula digestiva de *P. californiensis* y del 47% si las postlarvas fueron alimentadas con extracto de glándula digestiva de *L. vannamei* en relación al grupo control; estos resultados demostraron que las enzimas digestivas del camarón pueden ser una fuente alternativa útil como suplemento enzimático para otros decápodos. Sin embargo, estas investigaciones no contribuyeron a determinar cuál podría ser el mecanismo por el cual las enzimas exógenas podrían ejercer su efecto.

El objetivo del presente estudio fue monitorear la actividad de proteinasas de diferentes orígenes frente a las secreciones digestivas, utilizando como modelo al camarón patiblanco *L. vannamei*, de tal forma que permita sentar bases en las que futuras investigaciones se apoyen para modificar los mecanismos y progresar en el dominio del uso de enzimas como suplemento.

2. ANTECEDENTES

2.1 Los suplementos enzimáticos en la alimentación.

La utilización de los nutrientes le permiten al organismo mantener un equilibrio homeostático, por lo que las necesidades nutricionales de un individuo corresponden a la suma de sus necesidades básicas y de otras variables dependiendo de su estado fisiológico, de su actividad y del medio en el que se desarrolla (Salas-Salvadó *et al.*, 2000). Para mantener este equilibrio el organismo depende de un conjunto de procesos (digestión, absorción, metabolismo y eliminación) que le permiten la utilización de los macronutrientes y micronutrientes. Los macronutrientes son los nutrientes requeridos diariamente en mayor cantidad que los micronutrientes. Las proteínas, lípidos y carbohidratos son considerados macronutrientes orgánicos que al ser hidrolizados y metabolizados proveen al organismo de energía y precursores para la síntesis de nuevas biomoléculas. Por su parte, los micronutrientes están representados por vitaminas y oligoelementos que se ingieren en pequeñas cantidades pero que son esenciales en el mantenimiento del organismo ya que participan en un gran número de reacciones metabólicas (Teijón Rivera *et al.*, 2006). Para que el organismo pueda absorber, metabolizar y asimilar los macronutrientes orgánicos estos deben ser hidrolizados en moléculas más pequeñas o monómeros; para tal fin las enzimas son requeridas por su capacidad de escindir los enlaces de estos polímeros y dado que el aprovechamiento de estos macronutrientes no es 100% eficiente, se ha propuesto que el uso de enzimas adicionadas al alimento puede optimizar el proceso de la digestión e incrementar el uso de los macronutrientes.

Un suplemento por definición es algo que se añade o completa una entidad para hacerla íntegra o perfecta (Española, 2001). Los suplementos alimenticios contienen uno o más ingredientes para complementar la alimentación y en particular cuando el ingrediente o ingredientes que se añaden son enzimas se denominan suplementos enzimáticos. Estos productos pueden contener uno o varios tipos de enzimas en concentraciones y mezclas diversas provenientes principalmente de plantas, microorganismos o del sistema digestivo de mamíferos (<http://productos.mercola.com/enzimas-digestivas/>). Los suplementos enzimáticos son utilizados para incrementar la eficiencia de la digestión al optimizar la

utilización de los nutrientes (Baidoo *et al.*, 1998). El uso de las enzimas como suplemento ha permitido el desarrollo de un mercado mundial de productos destinados a animales y humanos. Los productos disponibles van desde enzimas aisladas hasta complejas mezclas enzimáticas. Algunos ejemplos son: Roxazyme® G2, un producto comercial que contiene una mezcla de enzimas derivadas del hongo *Trichoderma longibrachiatum* como celulasa (endo-1,4- β -D-glucanasa; EC 3.2.1.4), glucanasa (endo-1,3- β -D-glucanasa; EC 3.2.1.6) y xilanasa (endo-1,4- β -D-xilanasa; EC 3.2.1.8). Roxazyme® G2 es administrado como suplemento alimenticio en aves de corral para conferir la capacidad de hidrolizar polisacáridos no provenientes del almidón. Otro producto que se comercializa es Bromelain 2000 GDU Protein Digesting NOW® que contiene bromelaina (EC 3.4.22.32), una cisteína endopeptidasa que proviene del tallo de la piña (*Ananas comosus*). Estos son solo algunos ejemplos de los cientos de productos que actualmente existen y se comercializan para uso animal y humano.

Como anteriormente se mencionó, actualmente, la fitasa y carbohidrasas son enzimas ampliamente comercializadas, mientras que las proteinasas y lipasas son usadas en menor medida (Campbell y Bedford, 1992; Sirvas-Cornejo *et al.*, 2007; Cowieson y Ravindran, 2008; Adeola y Cowieson, 2011). Es por ello que en la actualidad hay un gran número de investigaciones enfocadas en el estudio del uso de carbohidrasas para aves de corral (Herstad y McNab, 1975; Pettersson y Aman, 1989; Campbell y Bedford, 1992; Viveros *et al.*, 1994; Odetallah *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006), ganado vacuno (Yang *et al.*, 1999; Rode *et al.*, 1999; Morgavi *et al.*, 2001; Beauchemin *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2007) y porcino (Chesson, 1993; Baidoo *et al.*, 1998; Omogbenigun *et al.*, 2004; Zijlstra *et al.*, 2004; Diebold *et al.*, 2004; Olukosi *et al.*, 2007; Emiola *et al.*, 2009), en un esfuerzo por disminuir los tiempos de engorda, costos de manutención, así como para incorporar fuentes alternativas de nutrientes y energía. Por el contrario poco se ha estudiado sobre el efecto de los suplementos enzimáticos en organismos acuáticos como peces, donde principalmente se han utilizado proteinasas y/o carbohidrasas debido a que la fuente del alimento para estos animales contiene un gran porcentaje de proteína y carbohidratos (Dabrowski y Glogowski, 1977; Munilla-Moran *et al.*, 1990; Kolkovski *et al.*, 1993; Kolkovski, 2001; Yilmaz y Ikiz, 2006; Ogunkoya *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2006). En

crustáceos las investigaciones enfocadas en el uso de suplementos enzimáticos son escasas, en algunos casos se han obtenido efectos positivos sobre el desarrollo de algunas especies de camarón (Forrellat *et al.*, 1990; Sirvas-Cornejo *et al.*, 2007), aunque en algunos otros casos los resultados suelen ser variables (Maugle *et al.*, 1983; Divakaran y Velasco, 1999). También se han incluido algunas otras especies con interés ecológico, como el anfípodo *Gammarus fossarum* (Bärlocher, 1982).

La variabilidad en los resultados no se limita a los organismos acuáticos; desde los primeros estudios realizados con dietas para aves suplementadas con α -amilasa (Herstad y McNab, 1975) se demostró que el efecto no necesariamente era significativamente positivo (Officer, 1995; Divakaran y Velasco, 1999; Beauchemin *et al.*, 2003; García-Ruiz *et al.*, 2006; Cowieson *et al.*, 2006). La variación en los resultados se debe al desconocimiento del destino y el modo de acción de las enzimas en el tracto digestivo y al uso aleatorio de estas como suplemento. Algunos autores han atribuido la falta de un efecto positivo al tipo de enzima que se usa como suplemento (Beauchemin *et al.*, 2003), a la concentración de enzima utilizada (Yilmaz y Ikiz, 2006) y a las diferencias anatómicas y fisiológicas de los sistemas digestivos de los animales (Beauchemin *et al.*, 2003). La variabilidad en los resultados solo ha logrado desalentar o retrasar el uso de la tecnología de enzimas para mejorar la digestión, así surge la necesidad de realizar investigaciones que permitan generar conocimiento sobre el mecanismo de acción de las enzimas exógenas para conocer sus capacidades y seleccionar aquellas con potencial para ser utilizadas como suplementos (Beauchemin *et al.*, 2003). A la fecha no existe información suficiente que describa el mecanismo de acción de las enzimas utilizadas como suplemento; debido a que hasta ahora la mayoría de las investigaciones son de “caja negra” pues solo se enfocan en conseguir acelerar el crecimiento de los animales y no sobre la actividad y destino de las enzimas dentro del tracto digestivo. Pocos trabajos se han inclinado por una investigación básica generando algunos métodos para evaluar el fenómeno y estudiar la compatibilidad de las enzimas exógenas con el sistema digestivo del organismo blanco, esto es, el estudio bioquímico de las enzimas cuando se encuentran en contacto *in vitro*, con secreciones del sistema digestivo del animal de interés (Yu y Tsen, 1993; Morgavi *et al.*, 2001). En el

tracto digestivo las enzimas deben enfrentar obstáculos físicos, fisicoquímicos y biológicos tales como la temperatura, pH, presencia de inhibidores y las proteinasas digestivas propias del organismo (Yu y Tsen, 1993; Morgavi *et al.*, 2001), por lo que las enzimas que se ingieren deben enfrentar con éxito estos obstáculos para poder ejercer un efecto sobre la digestión.

Particularmente en la acuicultura, la proteína es el componente más abundante tanto en los alimentos naturales como en las formulaciones (Kureshy y Davis, 2002), esto impacta de manera directa los costos de la alimentación y contribuye aproximadamente al 60% de los costos de producción. Algunas investigaciones se han enfocado en identificar ingredientes o estrategias que disminuyan los costos del alimento, manteniendo la calidad nutricional igual o mejor que los ingredientes que actualmente se utilizan (Forster *et al.*, 2003). El uso de las enzimas como suplemento es una estrategia que se ha extendido en un intento por incrementar la eficiencia de la digestión; sin embargo la eficiencia de la digestión de la proteína en el alimento depende del organismo que la consume; por ejemplo en el camarón japonés *Penaeus japonicus* se reportó una eficiencia del 73-77% (Koshio *et al.*, 1993) mientras que en *Penaeus setiferus* es del 52-82% (Brunson *et al.*, 1997). Pero también la eficiencia depende de la naturaleza de la proteína utilizada. Recientemente un estudio reportó un rango del coeficiente de digestibilidad aparente para proteína del 15.6 al 92.5%, utilizando diferentes fuentes de proteína en el alimento para *L. vannamei* (Xiang-He *et al.*, 2013). Debido a lo anterior, los programas eficientes de alimentación para el aprovechamiento máximo de los ingredientes del alimento son motivo de interés para la industria de los alimentos y es en este contexto que la adición de enzimas al alimento es una de las estrategias que se ha implementado con grandes expectativas (Divakaran y Velasco, 1999).

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente estudio utilizó el extracto enzimático de la glándula digestiva de *L. vannamei* como una aproximación *in vitro* del contenido enzimático en el tracto digestivo del camarón para estudiar y definir el destino de las enzimas exógenas que se pretenden utilizar como suplementos alimenticios. El extracto enzimático de la glándula digestiva de *L. vannamei* se mezcló independientemente, con proteinasas comerciales del tipo serino o cisteíno y proteinasas digestivas de decápodos del

tipo serino o aspártico para incrementar la actividad enzimática. La actividad proteolítica total en las mezclas fue evaluada en zimograma para rastrear la actividad de las proteinasas evaluadas como potenciales suplementos. Por otro lado se seleccionó un sustrato proteico adecuado para evidenciar la contribución a la hidrólisis de las proteinasas utilizadas como potenciales suplementos. Para evaluar la hidrólisis del sustrato proteico, las mezclas de proteinasas y el sustrato fueron incubados a diferentes tiempos y los productos de su hidrólisis analizados por SDS-PAGE. El estudio comparativo de la estructura primaria *in silico*, de las proteinasas involucradas, permitió discutir acerca de los resultados.

2.2 El camarón como modelo de estudio.

Un organismo modelo es una especie no humana que se estudia exhaustivamente para comprender algún fenómeno biológico particular, con la expectativa de que los descubrimientos realizados en el organismo modelo proporcionarán información sobre el funcionamiento de los procesos estudiados en otros organismos. Los organismos modelos cuentan con suficientes datos biológicos que los hacen candidatos como ejemplos para otras especies en las cuales el estudio del fenómeno se torna difícil. Esta estrategia es posible gracias a la relación filogenética entre los organismos vivos, y a la conservación de las vías metabólicas y el genoma en el transcurso de la evolución (Twyman, 2002).

Los modelos pueden clasificarse en: i) Modelos genéticos: Especies susceptibles de análisis genético (crecimiento exponencial, tiempos de generación corto, mapas genéticos completos y detallados con mutantes disponibles); ii) Modelos experimentales: Especies que pueden tener intervalos generacionales largos y mapas genéticos poco descritos, pero que cuentan con ventajas experimentales como su fácil manipulación u obtención de muestras y iii) Modelos para genómica: Aquellos en que independientemente de sus ventajas y desventajas genéticas o experimentales se eligen como organismos modelo ya que ocupan una posición central en el árbol evolutivo o porque el conocimiento de su genoma les hace ideales para ser estudiados.

Actualmente la información que existe sobre el sistema digestivo de *L. vannamei*, su proceso de digestión y las enzimas que participan en la hidrólisis de la proteína del alimento ha generado conocimiento básico de alto nivel (Hernández-Cortés *et al.*, 1997;

Muhlia-Almazán y García-Carreño, 2002; Sainz *et al.*, 2004; McGaw y Curtis, 2013). El manejo experimental de estos organismos y la facilidad en la obtención de las muestras (granjas camaronícolas) hacen del camarón patiblanco un candidato como modelo apropiado para proporcionar información sobre el destino de los suplementos enzimáticos y su contribución en la digestión de los crustáceos decápodos.

2.2.1 El sistema digestivo de los decápodos.

El sistema digestivo de los decápodos ha sido objeto de estudios por cerca de 50 años (Dall, 1967; Al-Mohanna y Nott, 1986; Felgenhauer, 1992; McGaw y Curtis, 2013). Las primeras investigaciones abordaron estudios comparativos anatómicos y morfológicos del intestino. Básicamente este órgano es un conducto interno dividido en tres secciones con la apertura en el esófago y paredes cubiertas de glándulas tegumentarias que secretan mucus, el mucus lubrica el alimento para propulsarlo hacia el orificio posterior llamado ano. La primera sección denominada intestino anterior se subdivide en una cámara cardíaca anterior y una cámara pilórica posterior más pequeña (Brunet *et al.*, 1994; Ceccaldi, 1998); es en este sitio donde el alimento es procesado gracias a un grupo de finas estructuras calcificadas parecidas a dientecillos conocido como molino gástrico. El alimento procesado en el molino gástrico es filtrado hacia la cámara pilórica, la filtración es modulada por la válvula cardio-pilórica que regula el paso del alimento separando las partículas de tal forma que solo la fase soluble de la digestión y partículas de menos de 100 nm de diámetro alcancen la cámara pilórica. El material que es retenido en el filtro es empujado de regreso al molino gástrico para ser procesado nuevamente; es por ello que la cámara pilórica posterior es reconocida como la región en la que se colecta el alimento filtrado para ser transportado a la región del intestino medio (Barker y Gibson, 1977). El intestino medio se inicia en la unión con la cámara pilórica y termina en un tubo en espiral (ciego). En esta sección se encuentra la glándula digestiva o hepatopáncreas, órgano que se compone de túbulos y microtúbulos compuestos de células altamente especializadas (B, R, E y F) responsables de la producción y reciclado de las enzimas así como de la absorción de nutrientes y agua (Al-Mohanna *et al.*, 1985; Al-Mohanna y Nott, 1986; 1987). Por último el intestino posterior surge detrás del ciego y sigue a lo largo del abdomen hasta el ano. En

general está cubierto por una cutícula simple rodeado de capas exteriores de músculo estriado longitudinal y circular que se contraen a lo largo de su longitud para favorecer la expulsión de la membrana mucoperitrófica y su contenido. En algunas ocasiones el contenido puede permanecer en el intestino grueso hasta que llega un nuevo contenido.

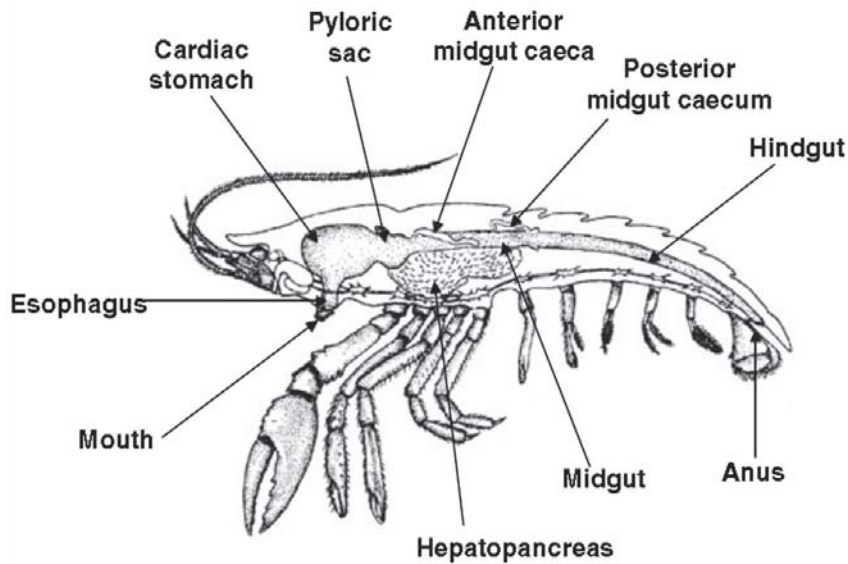


Fig. 1 Anatomía del sistema digestivo de decápodos. Se muestran las regiones del intestino anterior (modificado de Wallace y Taylor, 1992).

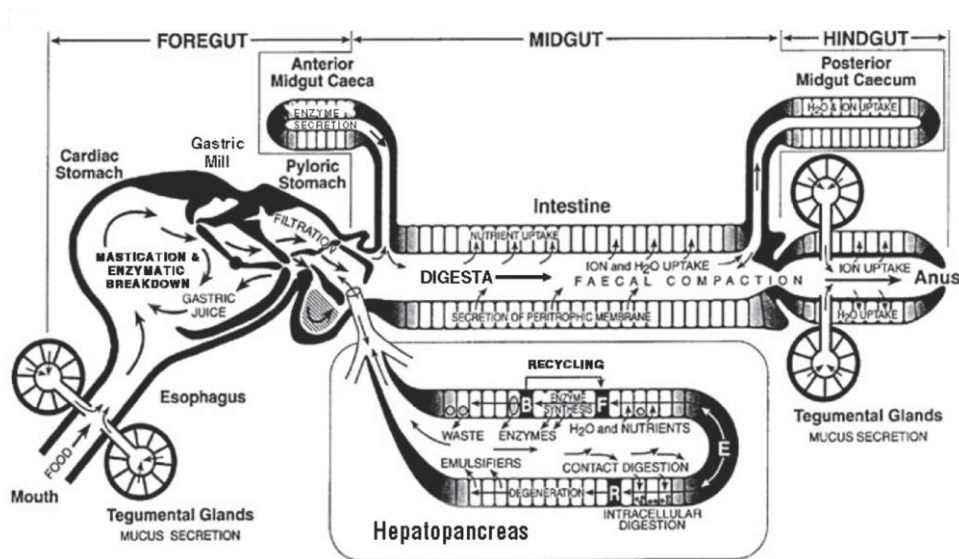


Fig. 2 Diagrama esquemático del proceso digestivo en decápodos (*Langosta Americana, Homarus americanus*) (modificado de Conklin, 1995).

La síntesis de las enzimas digestivas ocurre en las células B y su secreción se produce hacia el lumen de los túbulos de la glándula digestiva. Sin embargo se ha reportado actividad enzimática en el intestino y fluido gástrico (Celis-Guerrero *et al.*, 2004). Se ha descrito que las enzimas secretadas por la glándula digestiva alcanzan el resto del tracto digestivo, de tal modo que se ha reportado su presencia en las heces (Córdova-Murueta *et al.*, 2003).

En general se acepta que los decápodos como *L. vannamei* (Hernández-Cortés *et al.*, 1997; Klein *et al.*, 1998; Sainz *et al.*, 2004), *Panulirus interruptus* (Celis-Guerrero *et al.*, 2004), *Callinectes bellicosus* (Díaz-Tenorio *et al.*, 2006) y *Cancer pagurus* (Saborowski *et al.*, 2004) sintetizan principalmente proteinasas digestivas de la clase serino (tripsinas y quimotripsinas), sin embargo recientemente se han reportado proteinasas tipo aspártico en el fluido gástrico de algunos decápodos como la langosta Americana y Europea (Rojo *et al.*, 2010) y de la clase cisteíno en *Crangon crangon* (Teschke y Saborowski, 2005).

2.2.2 Las proteinasas digestivas de los decápodos.

De acuerdo con la Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica las enzimas se clasifican en seis grandes grupos de acuerdo al mecanismo de acción que utilizan para llevar a cabo la reacción química. Particularmente las proteinasas (EC 3.4.X.X) objeto del presente estudio, pertenecen al grupo de las hidrolasas debido a que escinden enlaces peptídicos utilizando agua, por lo que se les clasifica en la subclase de las peptidasas. Dentro de esta subclase existen tres sub-subclases 1) peptidasas (EC 3.4.11-19.X), que hidrolizan enlaces peptídicos entre aminoácidos de los extremos amino y carboxilo de la proteína; 2) proteinasas (EC 3.4.21-25.X), que hidrolizan enlaces peptídicos internos de la proteína; y 3) peptidasas con mecanismo de acción desconocido (EC 3.4.99.X).

Durante más de cinco décadas las enzimas digestivas de los decápodos han sido objeto de estudio (DeVillez y Buschlen, 1967; Gates y Travis, 1969; Zwilling *et al.*, 1969), actualmente se reconoce que las enzimas digestivas se sintetizan en el intestino medio (glándula digestiva) en donde se han identificado isotripsinas (DeVillez y Buschlen, 1967) e isoquimotripsinas (Tsai *et al.*, 1986a) como las proteinasas digestivas más abundantes y

activas en el tracto digestivo de la mayoría de los decápodos. La tripsina y quimotripsina son proteinasas que pertenecen a la clase de las serino proteinasas (EC 3.4.21.X); específicamente la tripsina y quimotripsina pertenecen a la Familia S1 (terminología utilizada para referirse a la familia de las serino proteinasas, S por serina y el número de la subfamilia a la que pertenece) en donde el sub-sitio catalítico S1 es el aminoácido de la enzima que interactúa con el aminoácido en la posición P1 del sustrato, el cual forma parte del enlace peptídico a hidrolizar en el extremo amino. Los sitios S1' y P1' se encuentran hacia el extremo carboxilo del sustrato proteico, todas las proteinasas de esta familia son endopeptidasas y presentan una triada catalítica conformada por ácido aspártico (Asp¹⁰²), histidina (His⁵⁷) y serina (Ser¹⁹⁵). La triada catalítica se encuentra entre dos barriles β y la especificidad por el sustrato está dominada por la especificidad del sub-sitio S1 por el aminoácido que contribuye con el carbonilo para escindir el enlace peptídico.

La tripsina (EC 3.4.21.4), es una enzima que tiene afinidad por Arg o Lys en P1, sin embargo la afinidad por Arg sobre Lys es de 2 a 10 veces mayor. Por su parte la quimotripsina (EC 3.4.21.1) tiene preferencia por los enlaces peptídicos formados por el grupo carboxilo de Tyr, Phe, Trp y Leu. La comparación de las estructuras de la tripsina y quimotripsina reveló solo una diferencia significativa en la posición 189 (Rawlings y Barret, 2013), sugiriendo un simple mecanismo de discriminación por el sustrato, sin embargo a la fecha no se ha determinado con certeza que mecanismos están involucrados en la especificidad diferenciada de estas proteinasas.

En el sistema digestivo de la langosta roja *P. interruptus* (Celis-Guerrero *et al.*, 2004), *Panulirus argus* (Perera *et al.*, 2008) *C. bellicosus*, *Callinectes arcuatus* (Díaz-Tenorio *et al.*, 2006), el cangrejo rojo *Pleuroncodes planipes*, *Pacifastacus astacus* (García-Carreño y Haard, 1993), así como en el camarón patiblanco *L. vannamei* (Hernández-Cortés *et al.*, 1997; Sainz *et al.*, 2004) y otras especies de Peneidos como *P. monodon*, *P. japonicus* y *P. penicillatus* (Tsai *et al.*, 1986b; Tsai *et al.*, 1986a; Tsai *et al.*, 1991) se han encontrado principalmente tripsinas y quimotripsinas como las principales proteinasas que participan en la digestión de la proteína en el alimento. La mayoría de las tripsinas y quimotripsinas provenientes del sistema digestivo de estos decápodos son termoestables y poseen características que las diferencian de sus contrapartes en

vertebrados como su particular e inusual actividad colagenolítica (Rudenskaya, 2003; Perera *et al.*, 2010). A algunas quimotripsinas de estos decápodos se le conoce con el nombre de braquiurinas (EC 3.4.21.32), la palabra braquiurina tiene su raíz en la palabra Braquiura que se refiere al infraorden del cangrejo violinista *Uca pugilator*, organismo en el que se identificó por primera vez la actividad colagenolítica (Tsu *et al.*, 1994; Tsu y Craik, 1996). Este tipo de enzimas se han identificado en otros decápodos como cangrejos, camarones y langostas (Zwilling *et al.*, 1969; Gates y Travis, 1969; Rudenskaya, 2003; Perera *et al.*, 2010). En base a la especificidad por el sustrato las braquiurinas se clasifican en tres grupos, el tipo Ia posee una amplia especificidad similar a la que se obtendría al combinar tripsina, quimotripsina y elastasa, la braquiurina de *U. pugilator* pertenece a este grupo (Page y Craik, 2013); las braquiurinas tipo Ib tienen actividad limitada hacia Arg pero mantienen las otras características de las braquiurinas tipo Ia. Las braquiurinas tipo II poseen estrictamente especificidad de tripsina, sin embargo comparten características como el amplio rango de temperatura en el que mantienen su actividad (37-55°C) y de pH (4.5-8.5). La función biológica de las braquiurinas es digestiva y su actividad es reflejo del contenido de colágeno en el tipo de alimento que es consumido por los crustáceos a base de detritus, incluidos debrís de plantas o desechos de animales como peces, moluscos, nematodos y pequeños crustáceos (Page y Craik, 2013). La estructura de tripsinas de decápodos ha sido poco estudiada, una de las pocas estructuras que han sido dilucidadas es la tripsina (TryIII) de *C. pagurus*, esta proteinasa carece de los sitios de autólisis (Lys⁶¹ y Arg¹¹⁷) presentes en las tripsinas de mamíferos. La hidrólisis del enlace peptídico en el extremo carboxilo de la Lys⁶¹ y Arg¹¹⁷ produce la exposición de otros sitios susceptibles a la hidrólisis produciendo la hidrólisis completa del dominio N-terminal de la tripsina de mamíferos (Várallyay *et al.*, 1998). La carencia de la Lys⁶¹ y Arg¹¹⁷ en la TryIII de *C. pagurus* le confiere resistencia a la autólisis (Hehemann *et al.*, 2008), además la TryIII incrementa su actividad en solventes orgánicos y bajas temperaturas (Saborowski *et al.*, 2004). Estas características sugieren que las proteinasas de decápodos podrían ser explotadas en algunos procesos biotecnológicos.

Por su parte las enzimas del grupo de las aspártico (EC 3.4.23.X) y cisteíno proteinasas (EC 3.4.22.X) han sido aisladas de diferentes fuentes biológicas (frutos, bacterias, plantas y tejidos animales) sin embargo en el tracto digestivo de los decápodos estas enzimas no son las más abundantes o representativas, excepto en algunos casos particulares. La catepsina D es una aspártico proteinasa que ha sido reportada como una de las enzimas proteolíticas más abundantes en el fluido gástrico de la langosta Americana y Europea (Rojo *et al.*, 2010) junto con las cisteíno proteinasas. La catepsina D tiene un pH óptimo ácido cercano a 4.0 e hidroliza preferentemente aminoácidos hidrofóbicos en la posición P1' sobre polipéptidos desnaturalizados. A diferencia de las serino proteinasas, las aspártico proteinasas utilizan una molécula de agua como nucleófilo para actuar sobre el enlace peptídico a hidrolizar y todas son endopeptidasas. Contienen en su sitio catalítico una diada de ácido aspártico (Asp³² y Asp²¹⁵) que actúa para unir y activar la molécula de agua en el sitio catalítico. En estas mismas especies de langostas también se ha reportado la presencia de cisteíno proteinasas. En el grupo de las cisteíno proteinasas (EC 3.4.22.X) el nucleófilo que participa sobre el enlace peptídico a hidrolizar es un grupo sulfhidrilo de una cisteína. El mecanismo catalítico es similar a las serino proteinasas, un nucleófilo y un donador de protones son requeridos, en este caso el donador de protones es una His. En algunas familias solo es requerida la diada His y Cys, mientras que en otras existe evidencia del requerimiento de Asp para formar una triada necesaria para orientar el anillo de imidazol de la His. El camarón gamba o quisquilla gris (*C. crangon*) es otro decápodo en el que la actividad tipo cisteína predomina en los extractos enzimáticos de su glándula digestiva (Teschke y Saborowski, 2005).

3. JUSTIFICACIÓN.

En los últimos años el interés en el uso de suplementos enzimáticos para animales de granja y acuicultura se ha extendido en un intento por incrementar la eficiencia de la digestión teniendo como expectativa el crecimiento acelerado del animal o un incremento en la sobrevivencia en fases críticas de su desarrollo; sin embargo el uso indiscriminado y aleatorio de enzimas ha retrasado el desarrollo de conocimiento científico. Si bien es cierto que a la fecha la tecnología para la formulación de suplementos enzimáticos (Beauchemin

et al., 2003) ha progresado, se requiere ampliar la investigación que permita generar conocimiento sobre el mecanismo de acción de las enzimas exógenas con la expectativa de reducir la variabilidad de la respuesta de los organismos a los suplementos utilizados. El presente trabajo analizó y comparó, *in vitro*, el efecto de proteinasas comerciales y proteinasas digestivas de decápodos utilizando a *L. vannamei* como modelo de estudio.

4. HIPÓTESIS

Si las proteinasas utilizadas como suplementos permanecen activas cuando se encuentran en contacto con las secreciones digestivas de *L. vannamei*, entonces podrán tener un efecto sinérgico con las proteinasas digestivas del camarón para incrementar la hidrólisis de un sustrato proteico.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general.

Estudiar qué ocurre con las proteinasas comerciales y proteinasas digestivas de otros decápodos cuando estas se enfrentan, *in vitro*, con el extracto enzimático de la glándula digestiva de *L. vannamei*.

5.2. Objetivos específicos.

- I. Establecer un sistema *in vitro* para evaluar la estabilidad de las proteinasas utilizadas como enzimas exógenas y evidenciar su contribución a la proteólisis.
- II. Estimar y comparar *in vitro*, la contribución de las proteinasas comerciales y proteinasas digestivas de decápodos a la proteólisis.
- III. Evaluar *in vitro*, la compatibilidad e integridad de las proteinasas comerciales y proteinasas digestivas de decápodos en presencia de las proteinasas digestivas del camarón.
- IV. Explicar la compatibilidad o incompatibilidad de las enzimas y su comportamiento observado sobre su contribución a la proteólisis.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Animales experimentales.

Camarones juveniles de la especie *L. vannamei* (15±1.0 g) se obtuvieron en las instalaciones del CIBNOR. Los especímenes se mantuvieron bajo condiciones controladas para su aclimatación (28 °C bajo flujo continuo de agua de mar filtrada y aireación). La glándula digestiva de 200 especímenes fue disectada y pesada, se homogenizaron dos veces a 4 °C con agua destilada fría (1:3 p/v) durante 20 seg utilizando un homogenizador de cocina a baja velocidad. El homogenado se centrifugó a 10,000 g durante 30 min a 4 °C para eliminar los lípidos y restos de tejidos. El sobrenadante acuoso que contiene el extracto enzimático de la glándula digestiva fue liofilizado y almacenado a -20 °C para su posterior análisis.

Langostas adultas de la especie *P. interruptus* y cangrejos de la especie *C. bellicosus* fueron adquiridos con distribuidores locales en La Paz, BCS México. El peso de las langostas osciló de 250 a 500 g, mientras que los cangrejos pesaron de 200 a 250 g. Los animales se mantuvieron en el laboratorio en acuarios con un flujo continuo de agua de mar filtrada. La temperatura del agua para los cangrejos se mantuvo en 28 ± 0.5 °C y las langostas a 20 ± 0.5 °C. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con músculo de pescado y calamar, antes del muestreo los animales se mantuvieron en ayuno durante 24 h. El fluido gástrico se extrajo de la langosta y el cangrejo por medio de una jeringa desechable de 10 mL a la que se le sustituyó la aguja por una sonda de plástico flexible. La sonda se insertó a través de la cavidad oral hasta llegar, vía el esófago, a la cámara gástrica en donde se obtuvo aproximadamente 1 mL de fluido gástrico por individuo. El fluido gástrico fue centrifugado durante 10 min a 4 °C y 10,000 g para eliminar los restos de tejido y alimento, el sobrenadante fue colectado y almacenado a -20 °C hasta su uso. Las muestras se denominaron PI y CB para el fluido gástrico obtenido de *P. interruptus* y *C. bellicosus*, respectivamente.

Cangrejos adultos de la especie *C. pagurus* fueron capturados en el Mar del Norte alrededor de la isla de Helgoland, Alemania. Adultos de las langostas Europeas (*Homarus*

gammarus) y Americanas (*Homarus americanus*) fueron adquiridas en el mercado local en Bremerhaven, Alemania. Los especímenes se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (13 ± 0.5 °C) y salinidad del 35% y fueron alimentados con crustáceos pequeños (*C. crangon*) en los laboratorios del Instituto Alfred Wegener Institute (AWI). El fluido gástrico fue extraído utilizando una jeringa desechable con una sonda de plástico flexible, las muestras fueron procesadas y almacenadas como se describió anteriormente. Las muestras de fluido gástrico se denominaron CP, HG y HA para el fluido gástrico obtenido de *C. pagurus*, *H. gammarus* y *H. americanus*, respectivamente.

6.2 Proteinasa a evaluar como potenciales suplementos.

El presente trabajo estudió y comparó proteinasas (ácidas y básicas) comerciales y digestivas de decápodos. Dentro de las proteinasas básicas se incluyeron, tripsina del páncreas bovino (10 mg; EC 3.4.21.4, # T4665, Sigma-Aldrich), quimotripsina bovina (10 mg; EC 3.4.21.1, #C4129, Sigma-Aldrich), tripsina porcina (10 mg; EC 3.4.21.4, # T0134, Sigma-Aldrich), tripsina metilada de páncreas porcino (20 µg; EC 3.4.21.4, # T6567, Sigma-Aldrich) y proteinasas digestivas de decápodos que incluyen el fluido gástrico de *P. interruptus*, *C. bellicosus* y *C. pagurus*, cada muestra está representada por la mezcla del fluido gástrico de 5 individuos.

Por su parte dentro de las proteinasas ácidas que se utilizaron esta la bromelaina (10 mg; EC 3.4.22.32, # B4882, Sigma-Aldrich), una cisteína proteinasa comercial de origen vegetal y proteinasas digestivas del fluido gástrico *H. gammarus* y *H. americanus*, cada muestra está representada por la mezcla del fluido gástrico de 5 individuos. En el fluido gástrico de estas langostas predomina la actividad de catepsina D, una aspártico proteinasa.

6.2.1 Preparación de las soluciones con proteinasas comerciales.

Diez miligramos de cada enzima comercial se disolvieron de forma independiente en 1 mL de agua destilada, las soluciones resultantes se denotan como tripsina bovina (BTRY), quimotripsina bovina (BCHY), tripsina porcina (PTRY) y bromelaina (BR),

respectivamente. Por su parte, la tripsina metilada porcina se diluyó en 15 μL de agua destilada, la solución se denota como tripsina porcina metilada (PTRY- CH_3). La actividad de las preparaciones de las proteinasas comerciales fue evaluada al pH óptimo correspondiente para cada una de ellas, según sea ácida o básica. Para las serino proteinasas se utilizó pH 8.0 y pH 6.0 para la cisteíno proteinasa.

La actividad proteolítica total a pH 6.0 se determinó utilizando como sustrato hemoglobina bovina (Birschbach *et al.*, 2014) (#H2625 Sigma-Aldrich) 0.5% p/v, disuelta en amortiguador McIlvaine (Díaz-López *et al.*, 1998). Un mL de Hb se mezcló con 20 μL de la preparación enzimática (provenientes de la solución 10 mg/mL descrita anteriormente), la mezcla se incubó por 10 min a 25 $^{\circ}\text{C}$, la reacción se detuvo añadiendo 500 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 20%. Por último la mezcla de reacción se centrifugó a 10,000 g durante 10 min. Los péptidos generados por la hidrólisis enzimática fueron detectados espectrofotométricamente registrando la absorbancia a 280 nm. Simultáneamente tubos preparados de la forma antes descrita pero sin enzima, fueron utilizados como control.

La actividad se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$U/\text{mL} = [\text{Abs}_{280\text{nm}} \cdot \text{Vol}_{\text{total, mL}}] / [0.051 \cdot 10_{\text{min}} \cdot \text{Vol}_{\text{enzima, mL}}] \quad (1)$$

Donde 0.051 es el coeficiente de extinción molar de la tirosina.

La actividad proteolítica total alcalina a pH 8.0 se determinó utilizando azocaseína 0.5% (p/v) (#A2765, Sigma-Aldrich) disuelta en amortiguador TRIS-HCl 50 mM de acuerdo al método reportado por García-Carreño y Haard (1993). Veinte microlitros de enzima (provenientes de la solución 10 mg/mL descrita anteriormente), se mezclaron en 100 μL de azocaseína y 100 μL de amortiguador TRIS-HCl. La mezcla se incubó durante 10 min, una vez concluido el tiempo de reacción se adicionaron 100 μL de TCA al 20% (p/v) para detener la hidrólisis. La mezcla de reacción se centrifugó (10,000 g durante 10 min) y el sobrenadante fue recuperado para registrar la absorbancia a 366 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y las unidades de actividad se expresan como el cambio en la absorbancia por minuto por mL de extracto enzimático.

$$U = \text{Abs}_{366\text{ nm}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \quad (2)$$

6.2.2 Preparación de las proteinasas digestivas de decápodos.

La actividad proteolítica en el fluido gástrico obtenido de *P. interruptus* (PI), *C. bellicosus* (CB) y *C. pagurus* CP) se determinó a pH 8.0 utilizando azocaseína 0.5% (p/v) (#A2765, Sigma-Aldrich) disuelta en amortiguador TRIS-HCl 50 mM tal como se describió anteriormente. El fluido gástrico fue diluido hasta veinte veces y 10-20 µL fueron utilizados. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y las unidades de actividad se expresan como el cambio en la absorbancia por minuto por mL de extracto enzimático aplicando la fórmula 2.

Por su parte, el fluido gástrico obtenido de *H. gammarus* (HG) y *H. americanus* (HA) se diluyó veinte veces para determinar la actividad proteolítica a pH 6.0 de igual forma que se describió para las proteinasas comerciales. Veinte microlitros de cada muestra se mezcló con 1 mL de Hb 0.5% p/v, disuelta en amortiguador McIlvaine. La mezcla se incubó por 10 min, al concluir el tiempo la reacción se detuvo añadiendo 500 µL de TCA, la mezcla se centrifugó y el sobrenadante fue recuperado. Los péptidos generados por la hidrólisis enzimática fueron detectados espectrofotométricamente registrando la absorbancia a 280 nm. Como control se utilizaron tubos con el sustrato sin enzima.

Finalmente la actividad proteolítica del extracto enzimático de la glándula digestiva de *L. vannamei* se determinó a partir de 50 mg de la muestra liofilizada disueltos en 1 mL de agua destilada, a esta solución se le denominó LV. La solución LV se diluyó 50 veces y 10 µL se utilizaron para evaluar la actividad proteolítica a pH 8.0 y pH 6.0 utilizando azocaseína o Hb como sustrato respectivamente.

6.3 Selección del sustrato proteico para evidenciar la sinergia entre las proteinasas exógenas y las proteinasas digestivas de *L. vannamei*.

Se realizaron ensayos, independientes, con tres diferentes sustratos proteicos para seleccionar aquel que por sus características permitiera evidenciar si las proteinasas utilizadas como potenciales suplementos contribuyen a su hidrólisis. El sustrato proteico debía cumplir con dos condiciones: 1) Debía permitir evidenciar la contribución de las enzimas exógenas a la hidrólisis en presencia de *L. vannamei* y 2) debía ser hidrolizado por

las proteinasas utilizadas como potenciales suplementos, con la expectativa de que la presencia de las proteinasas exógenas incremente la hidrólisis del sustrato proteico.

Se utilizó caseína bovina (CAS; #C7078 Sigma-Aldrich); hemoglobina bovina (Hb; #H2625 Sigma-Aldrich) y albúmina sérica bovina (BSA; #B4287 Sigma-Aldrich) en una concentración de 4 mg/mL en el amortiguador adecuado (TRIS-HCl 50 mM, pH 8.0 o McIlvaine pH 6.0). De manera independiente 125 mU de actividad proteolítica de cada muestra a evaluar (proteinasas comerciales y proteinasas digestivas de decápodos) fueron mezcladas con 500 μ L de cada uno de los sustratos proteicos (BSA, Hb o CAS). Las mezclas fueron incubadas a 28 °C y agitadas a 500 rpm para permitir las condiciones óptimas de reacción. Submuestras de 20 μ L fueron colectadas a diferentes tiempos (5, 30, 60 y 120 min) y hervidas inmediatamente para detener la proteólisis. Cada submuestra se mezcló con amortiguador de muestra (TRIS-HCl 0.125M, SDS 4%, azul de bromofenol 0.02% (p/v) a pH 6.8) en una proporción 1:1 (v/v). La composición de las submuestras (3 μ L) fue analizada por SDS-PAGE. La electroforesis se llevó a cabo de acuerdo al método de Laemmli (Laemmli, 1970), en geles de acrilamida 12% (8 x 10 cm y 0.75 mm). Cuatro microlitros se utilizaron de marcador de peso molecular (# 17-0446-01, Amersham Biosciences). Las condiciones de la electroforesis fueron 15 mA por gel en un baño circulante de 4 °C, en una unidad minivertical (SE260; Amersham Biosciences). Una vez que el marcador del frente de corrida alcanzó la parte inferior del gel, la corriente fue suspendida. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 al 0.05% en una solución acuosa de 40% de metanol y 7% ácido acético durante al menos 4 h, después fue desteñido con la misma solución sin colorante azul. Los geles fueron fotodocumentados para su posterior análisis.

6.4 Hidrólisis de BSA producida por la mezcla de proteinasas.

El extracto enzimático de la glándula digestiva de *L. vannamei* (LV) se mezcló, de forma independiente, con cada una de las proteinasas exógenas (proteinasas comerciales o el fluido gástrico de los decápodos). Las mezclas se realizaron en microtubos de 1 mL; 125 mU de LV y 125 mU de proteínasa exógena se mezclaron con 500 μ L de una solución de

BSA con una concentración de 4 mg/mL disuelta en el amortiguador adecuado según sea el caso (amortiguador TRIS-HCl 50 mM, pH 8.0 o McIlvaine pH 6.0). La composición de las mezclas se detalla en la Tabla I. Una solución de BSA en ausencia de proteinasas se utilizó como control.

Tabla I. Mezclas de reacción para evaluar la hidrólisis de BSA por enzimas digestivas de *L. vannamei* con o sin proteinasas exógenas.

Mezcla de reacción	Actividad y volumen en la mezcla de reacción
Control	500 μ L BSA
LV	125 mU LV + 500 μ L BSA
LV + PC	125 mU LV + 125 mU PC + 500 μ L BSA
PC	125 mU PC + 500 μ L BSA
LV + FG	125 mU LV + 125 mU FG + 500 μ L BSA
FG	125 mU FG + 500 μ L BSA

Se utilizó BSA disuelta en TRIS-HCl pH 8.0 para evaluar proteinasas básicas o en amortiguador McIlvaine pH 6.0 para proteinasas ácidas. Abreviaciones: LV = Extracto enzimático de la glándula digestiva de *L. vannamei*; PC = Proteinasa comercial, se refiere de forma general a las proteinasas comerciales utilizadas en esta investigación; y FG = Fluido gástrico, se refiere de forma general a los fluidos gástricos de los decápodos evaluados en este trabajo.

Las mezclas de reacción se incubaron a 28 °C con agitación (500 rpm), submuestras de 20 μ L fueron recolectadas a diferentes tiempos (5, 30, 60 y 120 min) y hervidas por 5 min para detener la proteólisis. Al término del muestreo, 3 μ L de cada submuestra fueron analizados en geles de acrilamida para evaluar su composición. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 como se describió anteriormente.

6.5 Evaluación de la actividad e integridad de las proteinasas exógenas, en presencia del extracto enzimático de la glándula digestiva de *L. vannamei*.

La integridad y composición de proteinasas en las mezclas de reacción descritas en la Tabla I fue evaluada en zimograma. Las mezclas de proteinasas mostradas en la Tabla I se prepararon nuevamente en ausencia de BSA. A la mezcla de enzimas se le adicionó el volumen necesario de amortiguador (TRIS-HCl o McIlvaine) para completar 100 μ L. Cinco mU de actividad proteolítica de cada mezcla de reacción se combinaron, en una relación 1:1 (v/v), con amortiguador de muestra 2X para resolver la composición de proteinasas en zimograma. Los geles en los que se aplicaron las muestras tratadas con TRIS-HCl, se incubaron a 4 °C durante 30 min en una solución de caseína (Caseína 3% en amortiguador TRIS-HCl 50 mM pH 8.0), en seguida fueron incubados durante 90 min a 25 °C, al término de la incubación el exceso de caseína fue retirada con 3 lavados breves (30 seg) de agua destilada para finalmente realizar la tinción con azul de Coomassie R-250. Los geles en los que se aplicaron las muestras incubadas con amortiguador McIlvaine, se enjuagaron con agua destilada y posteriormente se realizaron lavados breves (30 seg) con amortiguador McIlvaine hasta ajustar a pH 6.0. El gel fue transferido a una solución de Hb (Hb 0.25% (p/v) en amortiguador McIlvaine pH 6.0) e incubado 30 min a 4°C, seguidos de 90 min de incubación a 25 °C. Al término de la incubación el exceso de Hb fue retirada con 3 lavados breves (30 seg) de agua destilada, posteriormente los geles se tiñieron con azul de Coomassie R-250. Los geles fueron fotodocumentados para su posterior análisis.

6.6 Efecto de la concentración de las proteinasas digestivas de *L. vannamei* sobre la actividad de las proteinasas exógenas.

Diferentes concentraciones del extracto enzimático de la glándula digestiva de *L. vannamei* (LV) fueron mezcladas de forma independiente, con cada una de las proteinasas exógenas (proteinasas comerciales y fluido gástrico de decápodos) en una concentración constante. En seis microtubos se colocaron seis diferentes concentraciones decrecientes de LV (125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 y 3.9 mU) y en cada tubo se adicionaron 125 mU de actividad de cada proteínasa exógena (proteinasas comerciales y fluido gástrico de

decápodos) por separado. El volumen de reacción se ajustó a 100 μ L con amortiguador TRIS-HCl pH 8.0 para proteinasas básicas o McIlvaine pH 6.0 para proteinasas ácidas. Cinco mU de actividad de cada mezcla de reacción se combinó con amortiguador de muestra 2X en una relación 1:1 (v/v) para analizar su composición en SDS-PAGE, los geles fueron tratados como se describió en el apartado 6.5 para proteinasas ácidas o básicas. Esta técnica permitió evaluar la presencia o ausencia de proteínas con actividad proteolítica en las mezclas de reacción.

Al mismo tiempo fue necesario visualizar las proteínas responsables de la actividad en las mezclas de reacción descritas arriba. En forma paralela una nueva serie de seis microtubos fue preparada. Se colocaron seis diferentes concentraciones decrecientes de LV (125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 y 3.9 mU) y en cada tubo se adicionaron 125 mU de actividad de cada proteína exógena (proteinasas comerciales y fluido gástrico de decápodos) por separado. El volumen de reacción se ajustó a 25 μ L con amortiguador TRIS-HCl pH 8.0 para proteinasas básicas o McIlvaine pH 6.0 para proteinasas ácidas. Diez microgramos de proteína por muestra se colocaron en SDS-PAGE para analizar su composición. Después de la electroforesis los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250. Esta técnica reveló la integridad de las proteínas responsables de la actividad en las mezclas de reacción.

6.7 Aislamiento e identificación de la(s) proteína(s) digestiva(s) de *L. vannamei* responsable(s) de la hidrólisis de las proteinasas exógenas.

El extracto de la glándula digestiva de *L. vannamei* es un extracto crudo, principalmente compuesto de cinco serino proteinasas: dos isoquimotripsinas, tres isotripsinas A, B, y C y en menor proporción otras proteinasas. Cromatografía de intercambio iónico se utilizó para fraccionar el extracto enzimático de *L. vannamei*. Cincuenta miligramos del extracto enzimático liofilizado se disolvieron en 1 mL de amortiguador TRIS-HCl 50 mM, pH 7.5; 50 μ L de esta solución se adicionaron a la columna Q-Sepharose (# 71-7128-00, Amersham Biosciences), equilibrada con amortiguador TRIS-HCl, pH 7.5. La elución de las proteínas se realizó con NaCl a diferentes concentraciones (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7 y 1.0 M), el tamaño de las fracciones

colectadas fue de 250 μ L. La actividad de tripsina o quimotripsina se analizó con sustratos específicos (González-Zamorano *et al.*, 2013) y se seleccionaron las fracciones con mayor actividad. Las fracciones seleccionadas fueron desaladas y concentradas utilizando una unidad de filtro para centrífuga (Amicon Ultra-15, Merck Millipore, Billerica, MA) a una velocidad 4,000 g y 4 $^{\circ}$ C para estimar la composición de proteinasas en 10 μ L de cada fracción utilizando zimogramas.

Una fracción con las cinco serino proteinasas (SP) se obtuvo por cromatografía de exclusión molecular, usando el método modificado de (Rivera-Pérez *et al.*, 2011).

6.8 Estudio estructural comparativo de tripsinas de decápodos y tripsinas de mamífero, *in silico*.

La estructura primaria de las tripsinas se obtuvo de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Las tripsinas reportadas para diferentes especies de decápodos localizadas en la base de datos fueron utilizadas para establecer un alineamiento con la tripsina de *Bos taurus* (P00760.3) y *Sus scrofa* (P00761.1), utilizando el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Dentro de las tripsinas de decápodos se incluyeron las isotripsinas A, B y C de *L. vannamei*, así como otras tripsinas reportadas para *Marsupenaeus japonicus*, *P. argus*, *Portunus pelagicus*, *Portunus trituberculatus*, *Charybdis japonica* y *Eriochelone sinensis*. Se generaron modelos tridimensionales para la tripsina A, B y C de *L. vannamei* utilizando el programa Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>), el programa cuenta con una base de datos de estructuras cristalográficas. Las isotripsinas de *L. vannamei* poseen 74-75% de identidad con la estructura cristalográfica de la tripsina del cangrejo de río *Pontastacus leptodactylus* (PDB código 2f91A).

Por otro lado se analizó la estructura primaria de las tripsinas en busca de sitios posibles de N- y O-glicosilación utilizando NetNGlyc y NetOGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services>) para predecir posibles sitios de unión a carbohidratos. La glicosilación se corroboró experimentalmente para las isotripsinas A, B y C del extracto de la glándula de *L. vannamei*. Una muestra (10 μ g de proteína) del extracto enzimático de la

glándula digestiva del camarón fue analizada por SDS-PAGE. El gel se sumergió en 100 mL de solución de fijado (50% metanol y 5% ácido acético en H₂O) e incubado por 45 min y 25 °C, la solución fue renovada y la incubación se reanudó por 45 min adicionales. En seguida el gel se lavó en dos ocasiones con ácido acético glacial 3% durante 20 min para iniciar la oxidación. Para la oxidación de los carbohidratos el gel se sumergió por 30 min en 25 mL de ácido periódico disuelto en ácido acético 3%. Al término de la oxidación se repitió el lavado del gel con ácido acético glacial 3% para permitir la tinción, el gel se incubó en oscuridad durante 120 min en 25 mL de solución de tinte (Pro-Q® Emerald 300 (# P21857, Molecular Probes), la solución de tinte fue retirada con dos lavados de 20 min con ácido acético 3%. El gel se fotodocumentó en un transiluminador de UV a 300 nm. Esta técnica detecta hasta 0.5 ng de glicoproteínas, lo que representa 50 veces más que el método de Schiff. Como controles positivos y negativos se utilizaron estándares moleculares que contienen proteínas glicosiladas y no glicosiladas (CandyCane™ Glycoprotein Molecular Weight Standard (# C21852, Molecular Probes).

7. RESULTADOS

7.1 Análisis de la actividad proteolítica total y proteína soluble en las preparaciones enzimáticas comerciales y de decápodos.

Se analizó la actividad proteolítica y la proteína soluble en cada una de las preparaciones enzimáticas de acuerdo a las técnicas descritas en el apartado 6.

Mediante el análisis con azocaseína a pH 8.0 se confirmó la actividad proteolítica en el extracto enzimático de la glándula digestiva de *L. vannamei* (LV) y los fluidos gástricos de *C. bellicosus* (CB) y *P. interruptus* (PI). De la misma forma se procedió con las serino proteinasas comerciales (tripsina porcina, tripsina bovina y quimotripsina bovina). En la tabla II se muestran los resultados obtenidos para la actividad proteolítica total y la concentración de proteína soluble presente en las preparaciones enzimáticas utilizadas en el presente estudio. Los resultados se muestran solo a pH 8.0, la actividad de estas muestras disminuyó cuando el pH decreció (datos no mostrados).

Tabla II. Actividad proteolítica y proteína soluble en las preparaciones para proteinasas básicas.

Preparación enzimática	Actividad [U/mL] a pH 8.0	Proteína soluble [mg/mL]
Tripsina bovina (BTRY)	15.2 ± 0.4	13.7 ± 1.0
Quimotripsina bovina (BCHY)	10.2 ± 0.7	15.1 ± 0.9
Tripsina porcina (PTRY)	23.4 ± 1.0	11.5 ± 0.3
<i>P. interruptus</i> (PI)	55.8 ± 1.5	38.5 ± 0.6
<i>C. bellicosus</i> (CB)	90.1 ± 1.1	33.4 ± 0.8
<i>C. pagurus</i> (CP)	93.8 ± 1.3	14.8 ± 0.2
<i>L. vannamei</i> (LV)	27.1 ± 0.7	17.5 ± 0.8

Cada muestra fue analizada por triplicado, $\bar{X} \pm SD$, CV < 5%.

La actividad proteolítica en la preparación enzimática de bromelaina y el fluido gástrico de la langosta Americana y Europea fue evaluada a pH 6.0 (Tabla III). La actividad de estas muestras disminuyó considerablemente a medida que el pH se incrementó (datos no mostrados). Cada una de las soluciones se diluyó tanto como fue necesario para ser evaluada.

Tabla III. Actividad proteolítica y proteína soluble en las preparaciones para proteinasas ácidas.

Preparación enzimática	Actividad proteolítica total [U/mL] a pH 6.0	Proteína soluble [mg/mL]
Bromelaina (BR)	32.9 ± 0.8	2.13 ± 0.6
<i>H. gammarus</i> (HG)	47.6 ± 1.7	38.5 ± 0.8
<i>H. americanus</i> (HA)	34.1 ± 1.1	29.4 ± 0.8
<i>L. vannamei</i> (LV)	19.3 ± 0.9	17.5 ± 0.8

Cada muestra fue analizada por triplicado, $\bar{X} \pm SD$, CV < 5%.

Los resultados mostraron que *H. gammarus* y *H. americanus* poseen principalmente proteinasas ácidas ya que al incrementar el pH la actividad de estas muestras disminuyó. Por el contrario *L. vannamei*, *C. bellicosus*, *C. pagurus* y *P. interruptus* contienen principalmente proteinasas básicas.

7.2 Selección del sustrato proteico para determinar la sinergia de las proteinasas evaluadas y sus mezclas.

Tres diferentes sustratos proteicos fueron utilizados para estimar la actividad proteolítica de las preparaciones enzimáticas evaluadas en el presente trabajo. Los resultados permitieron la selección del sustrato proteico adecuado para evidenciar la contribución de las enzimas exógenas evaluadas como potenciales suplementos, cuando se mezclan con el extracto enzimático de *L. vannamei* (LV). El grado de hidrólisis de caseína bovina (CAS), hemoglobina bovina (Birschbach *et al.*, 2004) y albúmina sérica bovina (BSA) fue determinado monitoreando por SDS-PAGE los productos de hidrólisis

generados. El grado de hidrólisis de CAS, Hb y BSA se determinó cualitativamente por la ausencia de las proteínas de 32, 17 y 66.4 kDa que corresponden a cada uno de los sustratos proteicos y la aparición de polipéptidos de menor peso molecular. Los datos obtenidos (Tabla IV), demostraron que la CAS y Hb son susceptibles a la hidrólisis en presencia de la mayoría de las proteinasas utilizadas, mientras que la BSA fue hidrolizada en mayor o menor medida por las proteinasas comerciales y digestivas de decápodos con excepción de las proteinasas digestivas de LV.

Tabla IV. Hidrólisis de los sustratos proteicos producida por el extracto enzimático de *L. vannamei* y las proteinasas exógenas (comerciales o fluidos gástricos de decápodos).

Sustrato proteico	LV	BTRY	PTRY	BCHY	BR	CB	PI	CP	HG	HA
CAS	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	N/D	N/D	N/D
Hb	++++	+	+	+++	+	++	++	N/D	N/D	N/D
BSA	+	++++	+++	++++	+++	+++	++	+++	+++	++

Las muestras fueron analizadas en geles de acrilamida al 12%. De forma cualitativa se representa la presencia o ausencia de BSA (66.4 kDa): Totalmente hidrolizada, ++++ (0% de la BSA remanente) o parcialmente hidrolizada, +++ (25% de BSA remanente), ++ (50% de BSA remanente) y + (75% de proteína remanente) a los 120 min de reacción. Abreviaciones: LV = extracto enzimático de la glándula digestiva de *L. vannamei*; BTRY = solución de tripsina bovina; PTRY = solución de tripsina porcina; BCHY = quimotripsina bovina; BR = bromelaina; CB = fluido gástrico de *C. bellicosus*; PI = fluido gástrico de *P. interruptus*; CP = fluido gástrico de *C. pagurus*; HG = fluido gástrico de *H. gammarus*; HA = fluido gástrico de *H. americanus*; CAS = caseína bovina; Hb = hemoglobina bovina; y BSA = albúmina sérica bovina.

La proteólisis de BSA generada por las diferentes preparaciones enzimáticas monitoreada a través de SDS-PAGE se muestra en la Fig. 3. La solución de BSA sin enzimas se utilizó como control. El grado de hidrólisis de BSA se determinó cualitativamente por la ausencia de BSA (66.4 kDa) y por la aparición de polipéptidos de menor peso molecular. La proteólisis fue comparada con el control y con la proteólisis de BSA generada por LV. En la Fig. 3 se muestra que las enzimas exógenas (proteinasas comerciales y digestivas de decápodos) tienen la capacidad para hidrolizar BSA de mejor

forma que lo hace LV, se espera que LV en presencia de las proteinasas exógenas incremente la hidrólisis de BSA.

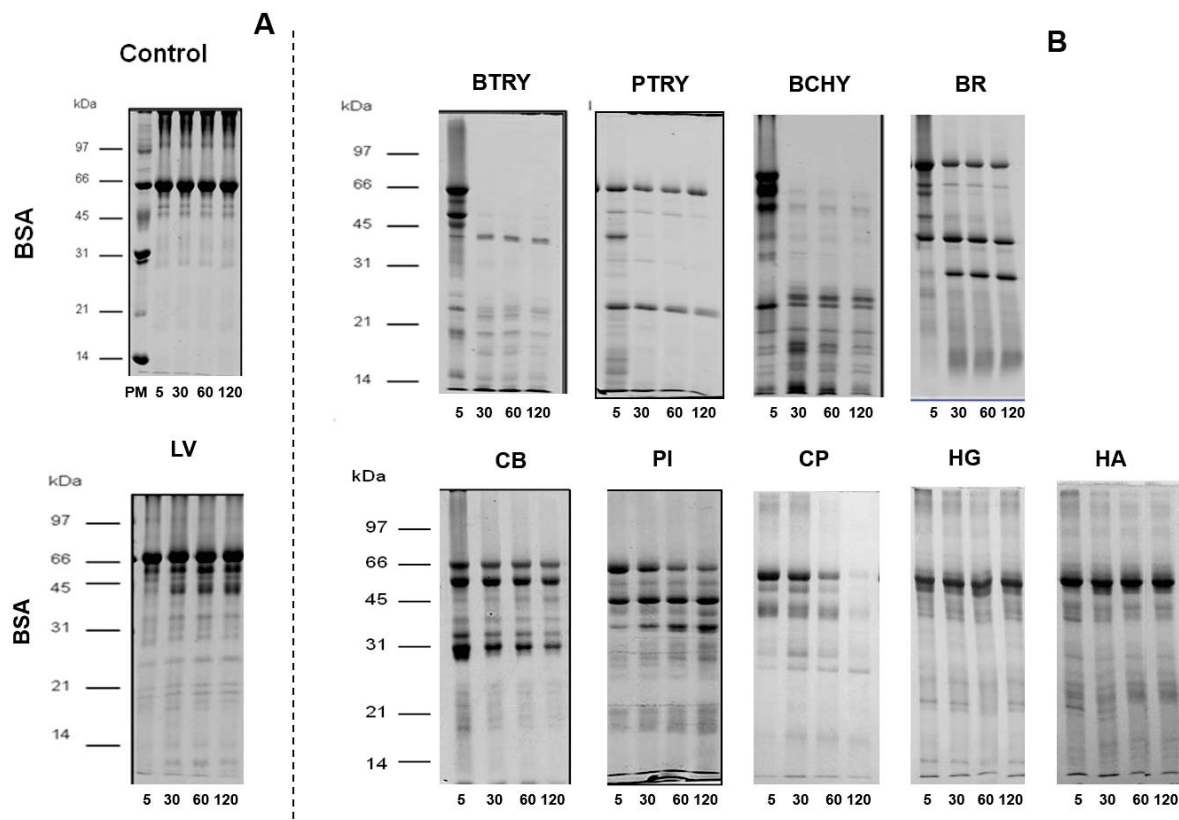


Figura 3. Hidrólisis de BSA evaluada por SDS-PAGE. Quinientos microlitros de BSA 4 mg/mL fueron mezclados de forma independiente con cada proteínasa exógena, la hidrólisis se monitoreó a diferentes tiempos (5, 30, 60 y 120 min). Panel A: (arriba) BSA sin proteinasas (control negativo), (abajo) hidrólisis de BSA producida por LV. Panel B: (arriba) hidrólisis de BSA producida por las proteinasas comerciales (BTRY, PTRY, BCHY y BR), (abajo) hidrólisis de BSA producida por las proteinasas digestivas de decápodos (CB, PI, CP, HG y HA). Abreviaciones: LV = extracto enzimático de la glándula digestiva de *L. vannamei*; BTRY = solución de tripsina bovina; PTRY = solución de tripsina porcina; BCHY = quimotripsina bovina; BR = bromelaina; CB = fluido gástrico de *C. bellicosus*; PI = fluido gástrico de *P. interruptus*; CP = fluido gástrico de *C. pagurus*; HG = fluido gástrico de *H. gammarus*; HA = fluido gástrico de *H. americanus*; y BSA = albúmina sérica bovina.

7.3 Hidrólisis de BSA originada por las proteinasas digestivas de *L. vannamei* en presencia de proteinasas exógenas a pH básico.

Los resultados anteriores demostraron que las proteinasas exógenas (proteinasas comerciales y digestivas de decápodos) tienen la capacidad de hidrolizar BSA. Estos datos sugieren que eventualmente pueden auxiliar a las proteinasas digestivas de LV para incrementar la hidrólisis de BSA. De forma independiente LV se mezcló con cada proteínasa exógena en una relación 1:1 (mU/mU) y 500 μ L de BSA (4 mg/mL). La hidrólisis de BSA en las mezclas de reacción fue monitoreada por SDS-PAGE. Los resultados muestran que solo algunas proteinasas exógenas auxilian a LV para incrementar la hidrólisis de BSA. La Fig. 4 muestra que la presencia de PTRY no aumentó la hidrólisis de BSA al sumarse con las proteinasas digestivas de LV (Fig. 4B), mientras que CB se sumó a LV para incrementar la hidrólisis de BSA (Fig. 4C). La capacidad de PTRY para hidrolizar BSA disminuyó cuando se mezcló con LV mientras que CB mantiene su capacidad de hidrólisis y se suma a las proteinasas de LV. Los resultados para tripsina bovina (BTRY) y quimotripsina bovina (BCHY) presentan la misma tendencia que los resultados presentados para PTRY, mientras que los resultados obtenidos para el fluido gástrico de *P. interruptus* (PI) y *C. pagurus* (CP) son consistentes con los resultados presentados para CB.

En conclusión las tres serino proteinasas comerciales (PTRY, BTRY y BCHY) utilizadas en el presente trabajo, no contribuyeron a la hidrólisis de BSA cuando se mezclan con LV, mientras que las serino proteinasas digestivas de decápodos (CB, PI y CP) se suman a las proteinasas de LV para contribuir e incrementar la hidrólisis de BSA.

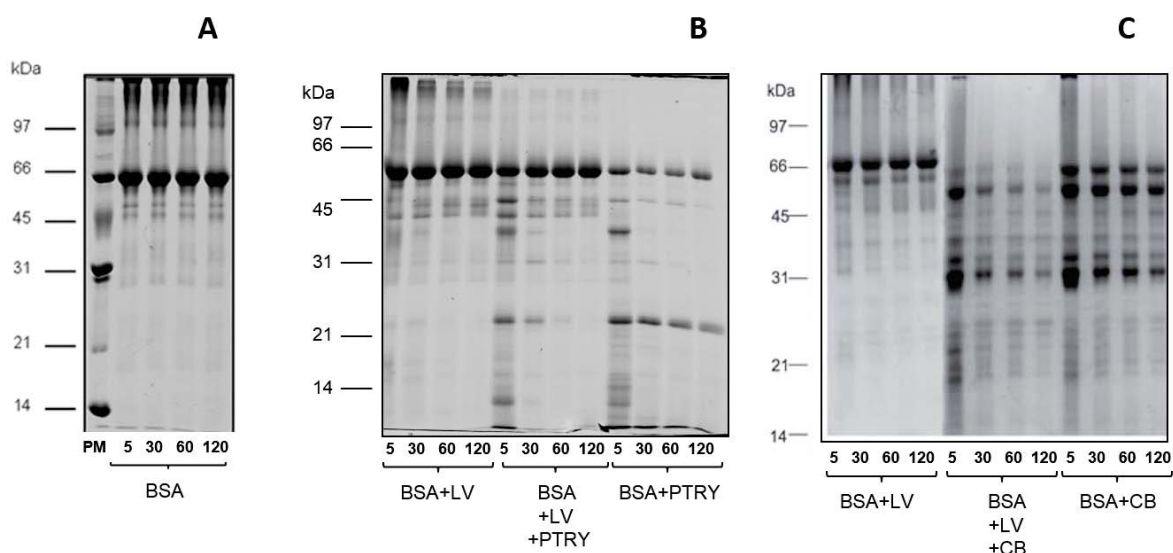


Figura 4. Hidrólisis de BSA generada por las proteinasas de *L. vannamei* en presencia de serino proteinasas exógenas. BSA sin enzimas fue utilizada como control (Panel A). Productos de hidrólisis de BSA generada por LV en presencia de PTRY (Panel B) o CB (Panel C) a diferentes tiempos (5, 30, 60 y 120 min) analizados en SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Abreviaciones: LV = extracto enzimático de la glándula digestiva de *L. vannamei*; PTRY = solución de tripsina porcina; CB = fluido gástrico de *C. bellicosus*; y BSA = albúmina sérica bovina.

7.4 Hidrólisis de BSA originada por las proteinasas digestivas de *L. vannamei* en presencia de proteinasas exógenas ácidas.

De forma independiente LV se mezcló con cada proteínasa exógena en una relación 1:1 (mU/mU) y 500 μ L de BSA (4 mg/mL). La hidrólisis de BSA en las mezclas de reacción fue evaluada en SDS-PAGE. Los resultados mostraron que solo algunas proteinasas exógenas incrementan la hidrólisis de BSA. La presencia de BR no aumentó la hidrólisis de BSA al sumarse con las proteinasas de LV (Fig. 5B). La capacidad de BR para hidrolizar BSA disminuyó en presencia de LV. Por el contrario la mezcla de HA con LV (Fig. 5C) incrementó la hidrólisis de BSA a los 120 min. Estos resultados sugirieron que HA y LV trabajan sinérgicamente para hidrolizar la BSA.

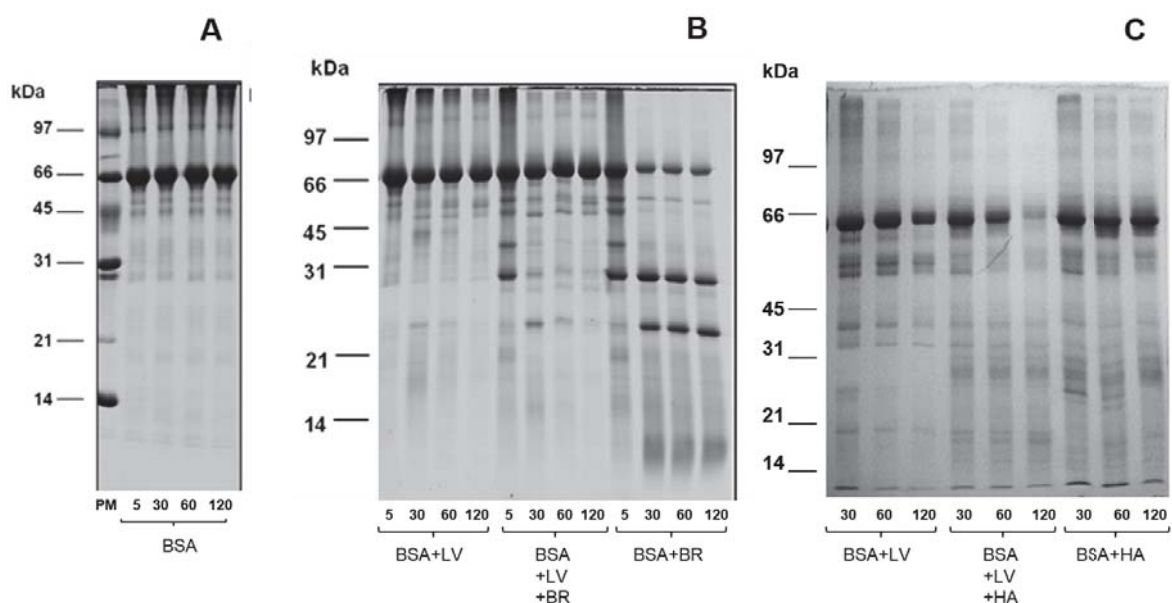


Figura 5. Hidrólisis de BSA producida por las proteinasas digestivas de *L. vannamei* en presencia de proteinasas exógenas ácidas. Panel A: BSA sin enzimas (control negativo). Panel B: hidrólisis de BSA a diferentes tiempos (5, 30, 60 y 120 min) generada por LV en presencia de BR. Panel C: hidrólisis de BSA a diferentes tiempos (5, 30, 60 y 120 min) generada por LV en presencia de HA. Como control positivo se analizó la hidrólisis de BSA generada por BR, HA y LV por separado. Las muestras se examinaron con SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Abreviaciones: LV = extracto enzimático de la glándula digestiva de *L. vannamei*; BR = solución de bromelaina; HA = fluido gástrico de *H. gammarus*; y BSA = albúmina sérica bovina.

Hasta este momento los resultados sugieren consistentemente que las proteinasas comerciales no contribuyen con LV para hidrolizar BSA, aun cuando estas son capaces de hidrolizar BSA en ausencia de LV. Por el contrario, las proteinasas digestivas de otros decápodos son capaces de sumarse a la actividad de las proteinasas de LV e incrementar la hidrólisis de BSA.

7.5 Actividad e integridad de las serino proteinasas exógenas en presencia del extracto enzimático de *L. vannamei*.

Paralelamente al análisis de la hidrólisis de BSA producida por LV en presencia de las serino proteinasas exógenas, la actividad proteolítica de las proteinasas en dichas

mezclas fue analizada por zimograma. De forma independiente LV se mezcló con tripsina porcina (PTRY) o fluido gástrico *C. bellicosus* (CB) en una proporción 1:1 (mU/mU), de la misma forma que se procedió en el apartado 7.3 con excepción de la presencia de BSA que en este procedimiento fue omitida. Los resultados demostraron que PTRY perdió su actividad en presencia de LV (Fig. 6A) mientras que las proteinasas digestivas de CB se mantuvieron activas cuando se mezclaron con LV (Fig. 6B), esto explica porque solo CB puede ayudar a incrementar la hidrólisis de BSA en contribución con LV. Los resultados para tripsina bovina (BTRY) y quimotripsina bovina (BCHY) son similares a los resultados presentados para PTRY, mientras que el fluido gástrico de *P. interruptus* (PI) y *C. pagurus* (CP) tiene el mismo efecto que las proteinasas digestivas de *C. bellicosus* (CB). En conclusión las tres proteinasas comerciales (PTRY, BTRY y BCHY) utilizadas en este estudio, pierden su actividad en presencia de LV, mientras que las proteinasas digestivas de decápodos (CB, CP y PI) permanecen activas en presencia de LV.

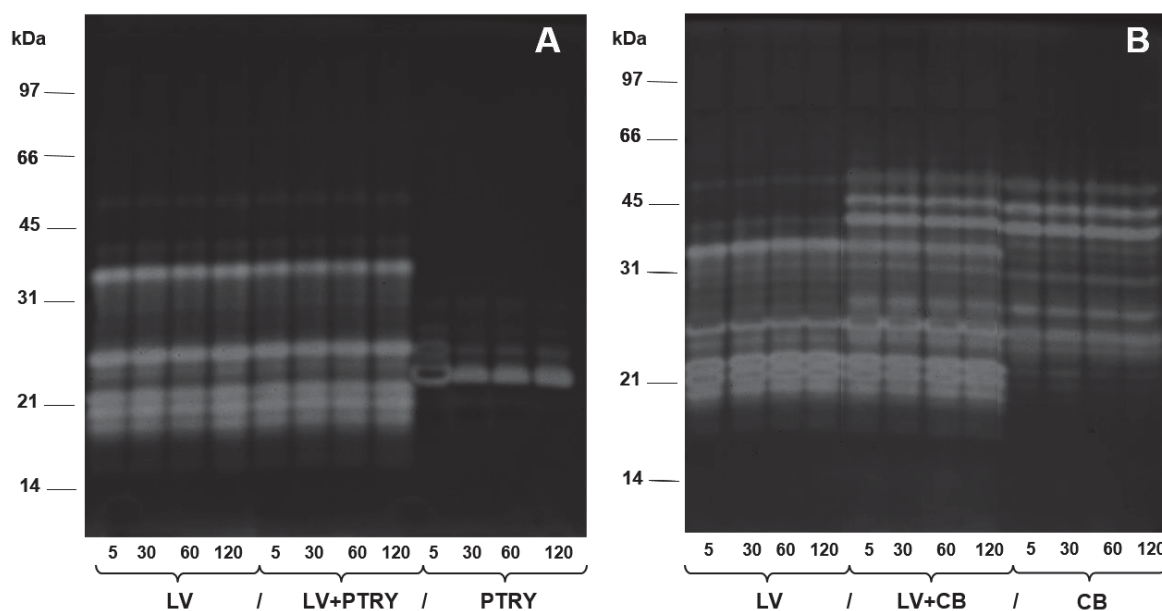


Figura 6. Actividad proteolítica de proteinasas exógenas básicas en presencia de proteinasas digestivas de *L. vannamei*. Panel A: mezcla de LV con PTRY. Panel B: mezcla de LV con CB. La actividad proteolítica en las mezclas se analizó a diferentes tiempos (5, 30, 60 y 120 min) en zimogramas a pH 8.0. Abreviaciones: LV = extracto enzimático de la glándula digestiva de *L. vannamei*; PTRY = solución de tripsina porcina; y CB = fluido gástrico de *C. bellicosus*.

7.6 Actividad e integridad de las cisteíno y aspártico proteinasas exógenas en presencia del extracto enzimático de *L. vannamei*.

La actividad proteolítica total de las mezclas de proteinasas exógenas ácidas (cisteíno y aspártico) con LV se evaluó en zimograma a pH 6.0. De forma independiente se prepararon mezclas de LV con bromelaina (BR), LV con fluido gástrico de *H. gammarus* y LV con fluido gástrico de *H. americanus* en una relación 1:1 (mU/mU), el volumen de las mezclas se ajustó 100 μ L con amortiguador McIlvaine pH 6.0. Los resultados demostraron que BR perdió su actividad proteolítica en presencia de LV (Fig. 7A), mientras que las proteinasas digestivas de HA (Fig. 7B) y HA (datos no mostrados) se mantienen activas cuando se mezclan con LV. Lo anterior explica porque la mezcla de BR con LV es incapaz de incrementar la hidrólisis de BSA mientras que la presencia de HA o HG ejerce un efecto sinérgico con LV sobre la hidrólisis de BSA. En la Fig. 7 se indican las principales proteinasas de LV que mantienen actividad a pH 6.0 [dos quimotripsinas (ChyH y ChyL) y tres tripsinas (A, B, y C)].

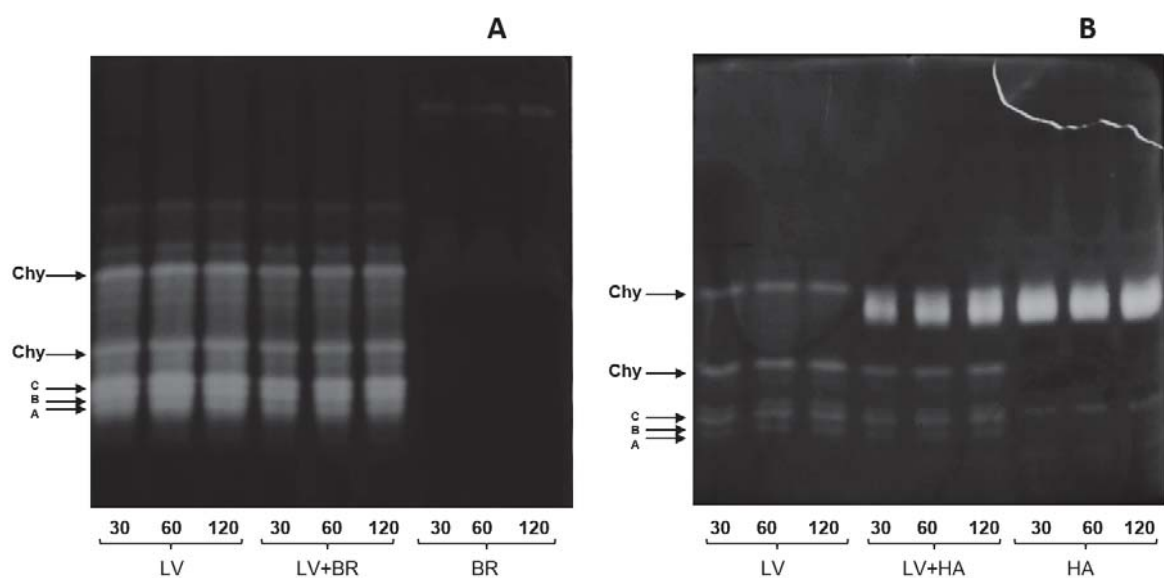


Figura 7. Actividad de proteinasas exógenas ácidas en presencia de proteinasas digestivas de *L. vannamei*. Panel A: mezcla de BR con LV. Panel B: mezcla de HA con LV. La actividad proteolítica en las mezclas se evaluó en zimograma a pH 6.0 en diferentes tiempos (30, 60 y 120 min). Abreviaciones: LV = extracto enzimático de la glándula digestiva de *L. vannamei*; BR = solución de bromelaina; y HA = fluido gástrico de *H. americanus*.

Los resultados demostraron que la proteínasa comercial BR no contribuyó a la proteólisis debido a que pierde actividad en presencia de LV; mientras que las proteinasas digestivas de los decápodos se suman a la actividad de LV para contribuir a la hidrólisis de BSA.

7.7 Efecto de la concentración de las proteinasas digestivas de *L. vannamei* sobre la actividad de las proteinasas exógenas comerciales.

Se investigó la hidrólisis como primera opción para determinar la causa por la que las proteinasas comerciales pierden actividad en presencia de LV. El presente trabajo analizó la posible hidrólisis sobre la tripsina porcina (PTRY) y tripsina bovina (BTRY). De forma independiente y por duplicado se prepararon seis mezclas de LV con PTRY (Fig. 8A) y seis mezclas de LV con BTRY (Fig. 8B). En cada mezcla la concentración de PTRY y BTRY se mantuvo constante (125 mU), mientras que la concentración de LV fue en decremento (125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 y 3.9 mU). Las muestras se analizaron en SDS-PAGE para zimograma y tinción con azul Coomassie. Los resultados mostraron que la actividad de la tripsina porcina o bovina disminuyó a medida que la concentración de LV se incrementó. La actividad de PTRY o BTRY se observó solo en aquellas muestras en las que la concentración de LV disminuyó al menos cuatro veces. En la Fig. 8 (panel izquierdo) es posible observar algunos productos de hidrólisis de BTRY o PTRY en los carriles 1-6 y la disminución de la banda de proteína que contiene la actividad de proteínasa. Es importante mencionar que estos resultados se han observado utilizando proteinasas digestivas de otros decápodos; el presente trabajo demostró que serino proteinasas digestivas de *C. bellicosus*, *P. interruptus* y *P. californiensis* tienen la capacidad para hidrolizar BTRY (datos no mostrados).

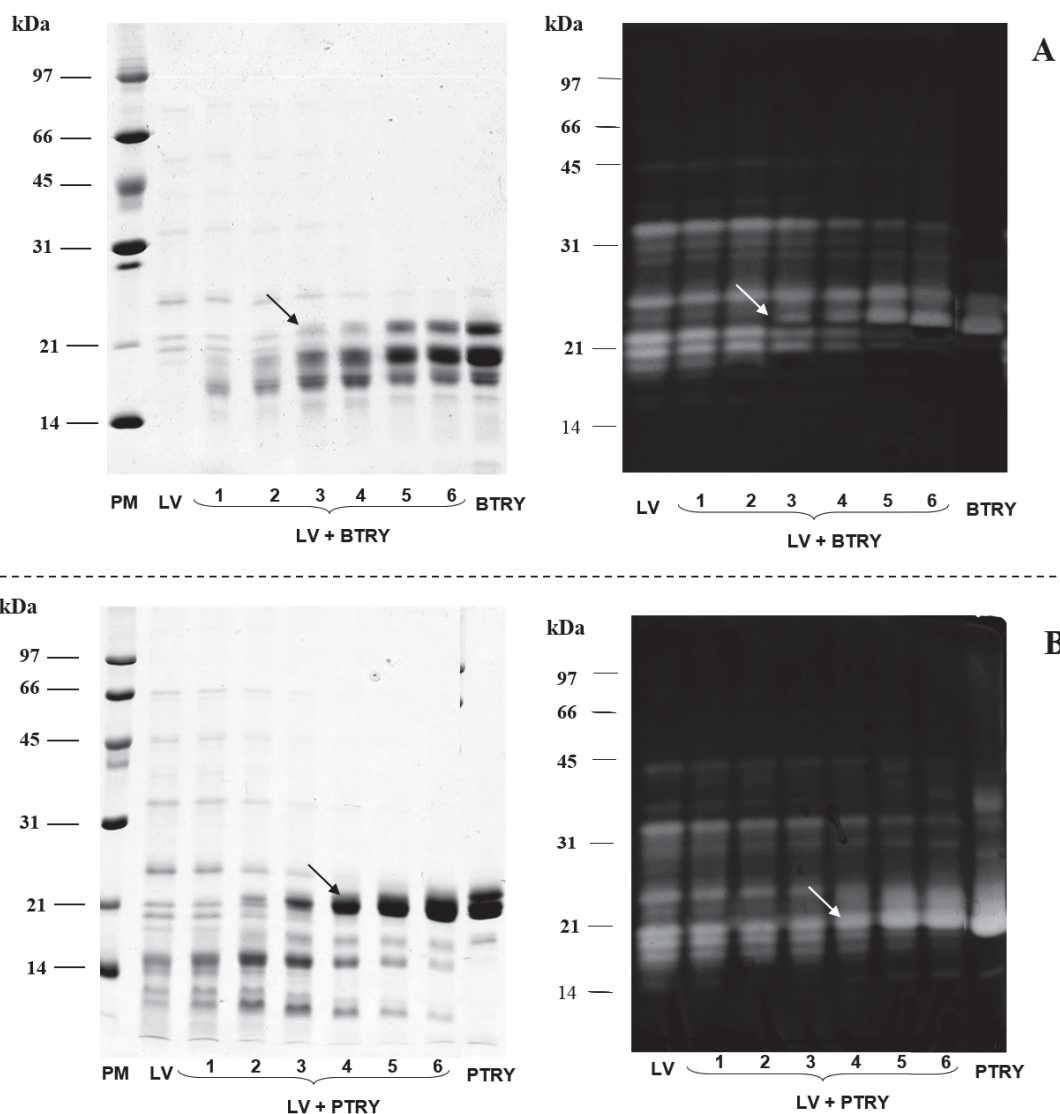


Figura 8. Hidrólisis de tripsina porcina y bovina en presencia de proteinasas digestivas de *L. vannamei*. Panel A: mezcla de BTRY con LV. Panel B: mezcla de PTRY con LV. La concentración de BTRY y PTRY se mantuvo constante (125 mU) mientras que la concentración de LV fue en decremento (125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 y 3.9 mU), carril 1-6. Las imágenes a la izquierda corresponden a SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie y a la derecha zimograma. Las flechas indican la presencia de BTRY o PTRY en la mezcla donde la concentración de LV no es suficiente para inactivarlas por hidrólisis. Abreviaciones: LV = extracto enzimático de la glándula digestiva de *L. vannamei*; BTRY = solución de tripsina bovina; y PTRY = solución de tripsina porcina.

7.8 Serino proteinasas digestivas de *L. vannamei* responsables de la hidrólisis de tripsina bovina y porcina.

El extracto enzimático de la glándula digestiva de *L. vannamei* (LV) es una mezcla compleja de proteinasas en la que predominan cinco serino proteinasas, dos isoquimotripsinas (ChyL y ChyH) y tres isotripsinas (A, B y C). Dada la complejidad del extracto se planteó investigar el papel que juegan las principales serino proteinasas presentes en LV, en la hidrólisis de la tripsina bovina y porcina. LV fue fraccionado mediante cromatografía de exclusión molecular e intercambio iónico.

Las fracciones obtenidas por cromatografía se denominaron SP, BII, BI y ABC. La fracción SP contiene las cinco principales serino proteinasas (ChyL, ChyH, A, B y C); la fracción ABC contiene las isotripsinas A, B y C, la fracción BII presenta actividad de ChyL, A, B y C y por último la fracción BI que presenta actividad de ChyH. Cada fracción se mezcló de manera independiente con BTRY en una relación 1:1 (mU/mU). La composición de las mezclas se analizó en zimogramas (Fig. 9) para evaluar el efecto de su presencia sobre la actividad de la BTRY.

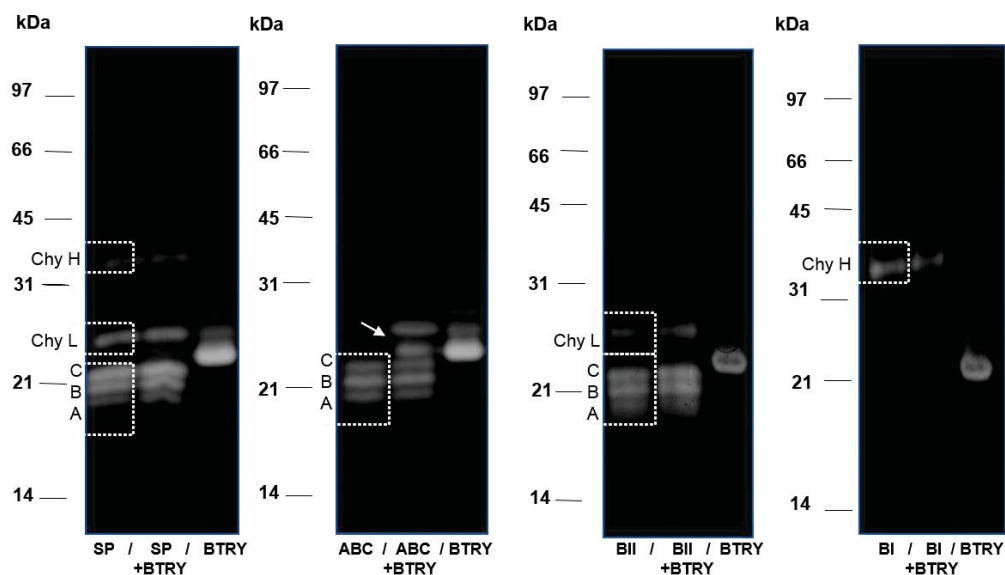


Figura 9. Pérdida de la actividad de tripsina bovina en presencia de las serino proteinasas de *L. vannamei*. Mezclas independientes de BTRY con las fracciones SP, ABC, BII, y BI se evaluaron en zimograma. La flecha indica la actividad residual de BTRY en la mezcla de enzimas. Abreviaturas: SP = fracción cromatografica con actividad de isoquimotripsinas (ChyH y ChyL) e isotripsinas (A, B y C); ABC = fracción con actividad de A, B y C; BI = fracción con actividad de ChyL y tripsinas A, B y C; BII = fracción con actividad de ChyH; y BTRY = solución de tripsina bovina.

Los resultados demostraron que la tripsina bovina pierde su actividad debido a la hidrólisis producida por las serino proteinasas de LV. Los datos sugieren que BTRY tiene un mayor número de sitios susceptibles a la hidrólisis o que estos se encuentren expuestos de tal forma que las proteinasas de LV pueden actuar sobre ellos. Hasta este momento los resultados indican que quimotripsinas y tripsinas de decápodos utilizan a la tripsina bovina y porcina como sustrato, es interesante entender qué características le permiten a una tripsina utilizar a otra tripsina como sustrato. Las tripsinas de *L. vannamei* también tienen la capacidad de hidrolizar tripsina porcina (Fig. 10).

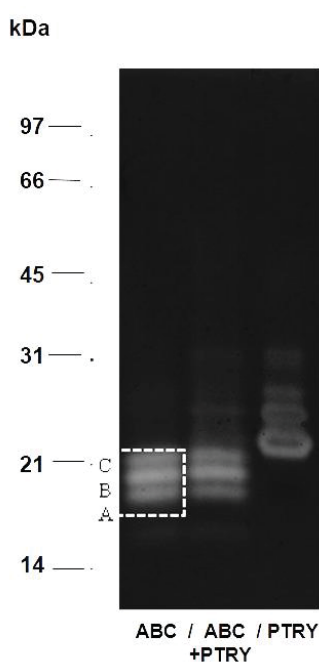


Figura 10. Pérdida de la actividad de tripsina porcina producida por las tripsinas de *L. vannamei*. La mezcla de PTRY con la fracción ABC se incubó por 5 min. La actividad se evaluó en zimograma. Abreviaturas: ABC = fracción con actividad de las isotripsinas (A, B y C); y PTRY = solución de tripsina porcina.

7.9 Estudio estructural *in silico* de las proteinasas digestivas de *L. vannamei*, responsables de la hidrólisis de la tripsina bovina y porcina.

Los resultados sugirieron que el número de sitios susceptibles a la hidrólisis en la tripsina porcina y bovina es mayor que en las quimotripsinas y/o tripsinas de *L. vannamei*. Un análisis comparativo de la estructura primaria de tripsinas de mamíferos y decápodos

disponibles en las bases de datos (infraorden: Penaeidae, Palinura y Brachyura) demostró que la tripsina de bovino y porcino posee un mayor número de residuos Lys que las tripsinas de decápodos (Fig. 11 y tabla V). Otra característica estructural que marca una diferencia importante entre tripsinas de mamíferos y decápodos, es la presencia de potenciales sitios de glicosilación. Todas las tripsinas de decápodos analizadas en el presente trabajo presentan de uno hasta siete probables sitios de glicosilación (Fig. 11 y Tabla V). Las quimotripsinas del camarón también poseen posibles sitios de glicosilación (Tabla VI).

```

B.taurus      IVGGYTCGANTVPY-----QVSLNSGYHFCGGSLINSQWVVSAAHCYK-----SGIQV 48
S.scrofa      IVGGYTCAANSIPY-----QVSLNSGSHFCGGSLINSQWVVSAAHCYK-----SRIQV 48
L.vannamei A  IVGGTDATPGELPYQLSFQDISFGFAWHFCGASIYENENWAICAGHCVCQGEDMNNPDYLQV 60
L.vannamei B  IVGGSDATPGELPYQLSFQDVSFGFAWHFCGASIYENENWAICAGHCVCQGEDMNNPDYLQV 60
L.vannamei C  IVGGSEVTPGELPYQLSFQDNSWGTAWHFCGASIYENENWAICAGHCVCQGGDFDNP SYLQV 60
M.japonicus   -----FCGASIYENENWAICAGHCVCQGEDMNNPDYLQV 32
M.japonicus   IVGGSEVTPGELPYQLSFQDVSFGFAWHFCGASIYENENWAICAGHCVCQGEDMNNPDYLQV 60
P.argus       IVGGDDVKPGEIPYQLSFQDISWGSFAWHFCGASIYNEHWAICAGHCVCQGEDMNNPDYLQV 60
P.argus       IVGGDDDKPGEIPYQLSFQDISWGSFAWHFCGASIYNEHWAICAGHCVCQGEDMNNPDYLQV 60
P.argus       IVGGTDAEPGKIIPYQLSFQDISWGSFAWHFCGASIYNEHWAICAGHCVCQGEDMNNPDYLQV 60
P.argus       IVGGTDVTPGEIPYQLSFQDISFGFAWHFCGASIYENENWAICAGHCVCQGEDMNNPDYLQV 60
P.argus       IVGGTDAEPGEIPYQLSFQDISLGFSAWHFCGASIYNEHWAICAGHCVCQGEDMNNPDYLQV 60
P.pelagicus   IVGGEDTLHGEIQYQLSFQDTSYTEPWHFCGGTLYNDHWGITACHLQ-YDVANPGIVQA 59
P.trituberculatus -----DISFGFAWHFCGASIYSENWVVCAGHWVQGENMNPDDYLQV 41
P.trituberculatus -----DVSFGFAWHFCGASIYENENWAICAGHCVCQGEDMNNPDYLQV 41
P.trituberculatus -----DISFGFAWHFCGASIYENENWAICAGHCVCQGEDMNNPDYLQV 41
C.japonica    -----DNSWGTAWHFCGASIYENENWAICAGHCVCQGGDFDNP SYLQV 41
C.japonica    -----DVSYGKHFHFCGASIYSENWVVCAGHWVQGENMYSQDYLQV 41
C.japonica    -----DTSYGKHFHFCGASIYSENWVVCAGHWVQGENMYSQDYLQV 41
E.sinensis    -----DISFGFQFHFHFCGASIYENENWVCAGHCVCQGEDFNNPDYLQV 41
E.sinensis    -----DISFGFQFHFHFCGASIYENENWVCAGHCVCQGEDFNNPDYLQV 41
                ***.:. :. : * * : . :*.

```

```

B.taurus      RLGEDNINVEGNEQFISAKSIVHP-SYNSNTLNNDIMLIKLSAASLNSRVASISLPT 107
S.scrofa      RLGEHNI DVLEGNEQFINAAKII THP-NFNGNTLDNDIMLIKLS SPATLNSRVATVSLPR 107
L.vannamei A  VAGELNQDVDEGTEQTVILSKIIQHE-DYNGFTISNDISLLKLSQPLSFNDNVR AIDIPA 119
L.vannamei B  VAGEHNRDVDEGNEQTVVLSKIIQHE-DYNGFTISNDISLLQLSQPLSFNDFV AIPALPE 119
L.vannamei C  VAGEHNFVNEGNEQTVVLSKIIQHE-DYNGFTISNDISLLKFSQPLSFNDYVRAIDIPA 119
M.japonicus   VAGEHNRDVDEGNEQTIILSKIIQHE-GYNGFTISNDISLLQLSQPLTFNDYVGP IALPE 91
M.japonicus   VAGEHNQDVTEGNEQTVVLSKIIQHE-DYNGFTISNDISLLKLSAPLSFNDYVSP IAIPE 119
P.argus       VAGEHNMAVNEGNEQAVVLSKIIQHE-DYNAFTISNDISVLQLSSPLTFNDYVQ PIALPA 119
P.argus       VAGEHNMAVNEGNEQAVVLSKIIQHE-DYNAFTISNDISVLQLSSPLTFNDYVQ PIALPA 119
P.argus       VAGEHNMAVNEGNEQAVVLSKIIQHE-DYNAFTISNDISVLQLSSPLTFDDYVRAIALPA 119
P.argus       VAGEHMDVNEGNEQTVPLSKIIQHE-DYNGFTISNDISVLHLSSPLTFNDYVQ PIALPA 119
P.argus       VAGELDMGVNEGNEQTVPLSKIIQHE-DYNGFTISNDISVLHLSSPLTFNDYVQ PIALPA 119
P.pelagicus   VAGEYYLKNVDGSEQPRKLD EII LHP-HFDSGLLINDVALIHFP EAMIYDEEYVNP IGLQE 118
P.tituberculatus VAGEHNRDVDEGNEQTVVLSKIIQHE-DYNGFTISNDISLLKLSQPLSFNDYVGP IALPE 100
P.tituberculatus VAGELDQDVTEGNEQSVILSKIIQHE-DYNGWTISNDISLLKLSQPLTFNDFV AIPALPA 100
P.tituberculatus VAGEHNRDVDEGNEQTVILSKIIQHE-EYNCFTISNDISLLKLSQPLTFNNFVGP IALPE 100
C.japonica    VAGDHTLYVNDGYEQKVILSKIIQHE-EYNCFTLGNDVSLQLSESPLTFDNRVRAIDLQS 100
C.japonica    VAGEHNFVNEGNEQTVVLSKIIQHE-DYNGFTISNDISLLKFSQPLSFNDYVRAIDIPA 100
C.japonica    VAGDHTLYVNDGYEQKVILSKIIQHETDYSFTLGNDVSLQLSESPLTFDNRVRAIDLQS 101
E.sinensis    VAGEQDLVDVDEGNEQAVVLSKIIQHE-DYNGFTISNDISLLQLSSPLTFNSFVGSVGLQS 100
E.sinensis    VAGEQDLVDVDEGNEQAVVLSKIIQHE-DYNGFTISNDISLLQLSSPLTFNSFVGPVGLQS 100
                *: * : * * : * * : : : * : : : : . : . * : : :

```

B. taurus SCASAGTQCLISGWGNTKSSGTSYPDVLRKCLKAPI-LSDSSCKSAYPG-QITSNMFCAGY 165
S. scrofa SCAAAGTECLISGWGNTKSSGSSYPSLLQCLKAPV-LSDSSCKSSYPG-QITGNMICVGF 165
L. vannamei A QGHAASGDCIVSGWG-TTSEGGSTPSVLQKVTVPVPI-VSDDECRDAYGQSDIEDSMICAGV 177
L. vannamei B AGHAASGDCIVSGWG-TTSEGGSTPSVLQKVTVPVPI-VSDDECRDAYGQNDIDDSMICAGM 177
L. vannamei C QGHAASGDCIVSGWG-ALTEGGSSPSALQKVTVPVPI-VSDDECRDAYGQSDIEDSMICAGV 177
M. japonicus AGHAASGECIVSGWG-ALSEGGSSPSVLQKVTVPVPI-VSDADCRDAYGQNDIDDSMICAGV 149
M. japonicus SGHAASGDCIVSGWG-TTSEGGSTPSVTLMKVTVPVPI-VSDAECRDAYGQNDVDDSMICAGL 177
P. argus QGHAATGDCVVSOGWG-TTTEGGSTPNVLQMVTVPI-VSDAECRDAYGQGEIDDSMICAGV 177
P. argus QGHAATGDCVVSOGWG-TTTEGGSTPNVLQMVTVPI-VSDAECRDAYGQGEIDDSMICAGV 177
P. argus QGHAASGDCVVSOGWG-TTTEGGSTPNVLQMVTVPI-VSDAECRDAYGQGEIDDSMICAGV 177
P. argus QGHAASGDCIVSGWG-ALTEGGSTPSVLQKVTVPVPI-VSDAECRNAYGQSEIDDSMICAGL 177
P. argus QGHAASGDCIVSGWG-ALTEGGSSPSVLQKVTVPVPI-VSDAECRDAYGQGEIDDSMICAGV 177
P. pelagicus EKNLVGVDTVTGWG-ALSEGGNAASVLQKVVHVPT-VSDEECRTSYSG--IEDSMICAGY 174
P. trituberculatus AGHAASGDCIVSGWG-ALSEGGSSPSVLQKVTVPVPI-VSDAECRDAYGQNDIDDSMICAGV 158
P. trituberculatus AGHAASGDCIVSGWG-TTSEGGSTPSVTLMKVTVPVPI-VSDEECRAAYGQSEIDDSMICAGL 158
P. trituberculatus AGHAASGDCIVSGWG-ALSEGGSSPSVLQKVTVPVPI-VTDAECCKHYGENQIDDSMICVGL 158
C. japonica QGHAASGDCIVSGWG-TTSEGGSTPSVLQKVTVPVPI-VSDDECRDAYGQSDIEDSMICAGV 158
C. japonica E-KEFLLGECVVSOGWG-TTTEEGSDPNLYYVDLPTVVTDACRAAYHYGENQIDDSMICVGL 158
C. japonica E-KEFLLGECVVSOGWG-TTTEEGSDPNLYYVDLPT-VTDTECRKHYGENQIDDSMICAGL 158
E. sinensis V-KEYIGDCVVSOGWG-TTSEGGSTPSVLQYVDVPT-VSDADCRAYGENDIDDSMICAGL 157
E. sinensis V-KEYIGDCVVSOGWG-TTSEGGSTPSVLQYVDVPT-VSDADCRAYGENDIDDSMICAGL 157

* : : * * * : : . . . * : * : : * . * * : . . : * * *

B. taurus LEGGKDSQCQDSSGGPVCVCSG---KLGIVSWG-----SGCAQKNKPGVYTKVCN 211
S. scrofa LEGGKDSQCQDSSGGPVCVCSG---QLQIVSWG-----YGAQKNKPGVYTKVCN 211
L. vannamei A PEGGKDSQCQDSSGGPLACSDTASTYLAGIVSWG-----YGCARPGYPGVYAEVSY 227
L. vannamei B PEGGKDSQCQDSSGGPLACSDTGSTYLVGIVSWG-----YGCARPNYPGVYAEVSY 227
L. vannamei C PEGGKDSQCQDSSGGPLACSDTGSTYLAGIVSWG-----YGCARPNYPGVYAEVSY 227
M. japonicus PEGGKDSQCQDSSGGPLACSDTGSYPYLAGIVSWG-----YGCARPNYPGVYAEVSY 182
M. japonicus PEGGKDSQCQDSSGGPLVCSDTGSAYLAGIVSWG-----YGCARPGYPGVYTEVAY 227
P. argus PEGGKDSQCQDSSGGPLACSDTGSTYLAGIVSWG-----YGCARPNYPGVYCEVAY 227
P. argus PEGGKDSQCQNSGGPLACSDTGSTYLAGIVSWG-----YGCARPNYPGVYCEVAY 227
P. argus PEGGKDSQCQDSSGGPLACSDTGSTYLAGIVSWG-----YGCARPNYPGVYCEVAY 227
P. argus PEGGKDSQCQDSSGGPLACSDTGSTYLAGIVSWG-----YGCARPNYPGVYCEVAY 227
P. argus TEGGKDACQDSSGGPLVVCYDEHWIPLPGWHRVGLRLCPSKLP RRVLRSGLLRRLGQGY 237
P. pelagicus PEGGKDACQDSSGGPMVCKG----YLTGIVSWG-----YGCARPNYPGVYTEVAY 220
P. trituberculatus PEGGKDSQCQDSSGGPLACSDTGSYPYLA-----YGCARPNYPGVYTEVAY 185
P. trituberculatus PEGGKDSQCQDSSGGPLACSDTGSYTYLA-----YGCARPNYPGVYTEVAY 185
P. trituberculatus PEGGKDACQDSSGGPLACSDTGSYPYLA-----YGCARPNYPGVYTEVAY 185
C. japonica PEGGKDSQCQDSSGGPLACSDTGSYTYLA-----YGCARPNYPGVYTEVAY 185
C. japonica PEGGKDACQDSSGGPLACSDTGSYTYLA-----YGCARPNYPGVYTEVAY 185
C. japonica PEGGKDACQDSSGGPLACSDTGSYTYLA-----YGCARPNYPGVYTEVAY 185
E. sinensis PEGGVDACQDSSGGPMVCGLLT-----YGCARPNYPGVYTEVAY 180
E. sinensis PEGGVDACQDSSGGPMVCGLLT-----YGCARPNYPGVYTEVAY 180

*** * : * * * : * * * * : * * .

B. taurus YVSWIKQTIASN 223
S. scrofa YVNWIQQTIAAN 223
L. vannamei A HVDWIKANAV-- 237
L. vannamei B HVDWIKANA--- 236
L. vannamei C HVDWIKANA--- 236
M. japonicus -----
M. japonicus FVDWILTNAV-- 237
P. argus FVDWVKANTA-- 237
P. argus FVDWVKANTA-- 237
P. argus FVDWVKANTA-- 237
P. argus FVDWVKANTA-- 237
P. argus CLGILFENDSVR 249
P. pelagicus FVDWITANTV-- 230
P. trituberculatus -----
P. trituberculatus -----
P. trituberculatus -----
C. japonica -----
C. japonica -----
C. japonica -----
E. sinensis -----
E. sinensis -----

Figura 11. Comparación de la estructura primaria de tripsina bovina y porcina con tripsinas de decápodos. Una alineación múltiple de la estructura primaria de la tripsina bovina (*Bos taurus*) y tripsina porcina (*Sus scrofa*) con la estructura primaria de tripsina de decápodos permitió determinar similitudes y diferencias entre ellas. Aminoácidos lisina (Lys) se indican en color negro y la arginina (Arg) en gris. Los sitios potenciales de glicosilación se obtuvieron con herramientas bioinformáticas (<http://www.cbs.dtu.dk/services>) que predicen sitios de N-glicosilación y O-glicosilación. Se identificaron la Thr^{136, 142}, Thr^{135, 136, 142} y Asn⁵⁴ en las tripsinas A, B y C respectivamente. Los sitios potenciales de glicosilación se resaltan en negrita y subrayadas.

Tabla V. Comparación del número de Lys, Arg y sitios predichos de glicosilación entre la estructura primaria de tripsina bovina, porcina y decápodos.

Especie	No. Acceso NCBI	Número de Lys (K)	Número de Arg (R)	Número de sitios predichos de glicosilación Thr (T) o Asn (N)
<i>B. Taurus</i>	P00760.3	13	2	-
<i>S. scrofa</i>	P00761.1	9	4	-
<i>L. vannamei</i> A	CAA60129.1	5	3	2
<i>L. vannamei</i> B	CAA75311.1	4	2	3
<i>L. vannamei</i> C	CAA75311.1	5	3	1
<i>M. japonicus</i>	ACE80257.1	3	1	1
<i>M. japonicus</i>	AAT09989.1	4	2	5
<i>P. argus</i>	ADB66711.1	2	2	1
<i>P. argus</i>	ADB66713.1	2	2	1
<i>P. argus</i>	ADB66715.1	3	2	2
<i>P. argus</i>	ADB66712.1	3	2	1
<i>P. argus</i>	ADB66714.1	3	7	1
<i>P. pelagicus</i>	ABM65758.1	4	2	-
<i>P. trituberculatus</i>	ABQ02513.1	4	1	1
<i>P. trituberculatus</i>	ABQ02514.1	4	1	7
<i>P. trituberculatus</i>	ABQ02512.1	4	-	1
<i>C. japonica</i>	ABQ02513.1	4	2	6
<i>C. japonica</i>	ABQ02514.1	5	-	2
<i>C. japonica</i>	ABQ02512.1	6	2	2
<i>E. sinensis</i>	ABQ02521.1	2	1	2
<i>E. sinensis</i>	ABQ02519.1	2	1	2

Tabla VI. Sitios potenciales de glicosilación en quimotripsinas de *L. vannamei*.

Quimotripsina	No. Acceso NCBI	Número de Lys (K)	Número de Arg (R)	Número de sitios predichos de glicosilación Thr (T) o Asn (N)
Chy BII	CAA71673.1	3	5	6
Chy BI	CAA71672.1	5	5	6

La glicosilación de las isotripsinas de LV se determinó experimentalmente en SDS-PAGE (Fig. 12).

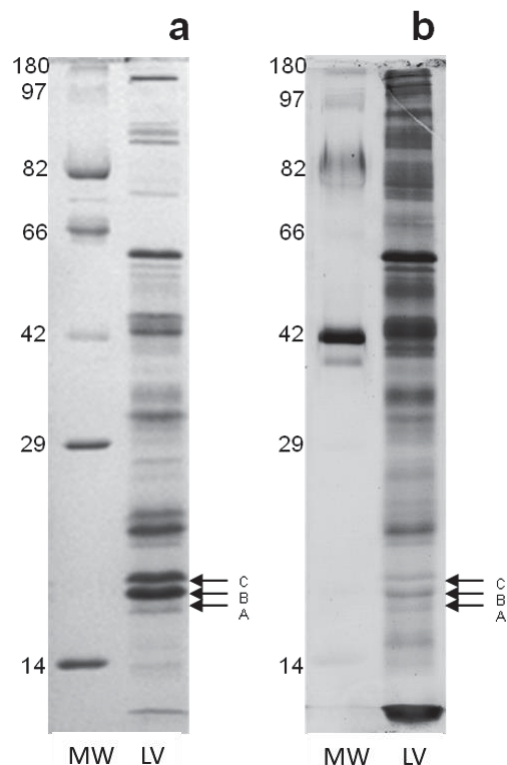


Figura. 12. Glicosilación en las isotripsinas de *L. vannamei*. El extracto enzimático de *L. vannamei* se resolvió en SDS-PAGE. Las isotripsinas de A, B y C de *L. vannamei* se indican con flechas. a) tinción con azul Coomassie y b) tinción para glicoproteínas (Pro-Q[®] Emerald 300). MW: CandyCane[™] Glycoprotein Molecular Weight Standards, incluye controles positivos [α_2 -macroglobulina (180 kDa), glucosa oxidasa (82 kDa) y α_1 -glicoproteína ácida (42 kDa)] y controles negativos [Fosforilasa b (97 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y lisozima (14 kDa)].

Los resultados sugieren que los carbohidratos potencialmente unidos a las tripsinas y quimotripsinas de los decápodos pueden participar protegiendo a la enzima de la proteólisis por impedimento estérico. Además se sugiere que el mayor número de residuos Lys en la estructura primaria de BTRY y PTRY tiene un papel importante en la susceptibilidad de estas tripsinas a ser hidrolizadas por las tripsinas de *L. vannamei* o de otros decápodos. Para apoyar la hipótesis sobre la susceptibilidad de las tripsinas debido al número de Lys en su estructura, se utilizó tripsina porcina metilada (PTRY-CH₃). La PTRY-CH₃ es una proteinasa

que se encuentra modificada en todas sus Lys con grupos metilo, tal como se muestra en la Fig. 13. La carga positiva en Arg y Lys es muy importante en el mecanismo de reacción de las tripsinas (Fig. 14) (Perona y Craik, 1995), en la PTRY-CH₃ la carga positiva en las Lys esta ausente y se ha demostrado que es menos susceptible a la proteólisis. Este trabajo comparó la hidrólisis de la PTRY y de la PTRY-CH₃ frente a las tripsinas de *L. vannamei* (A, B y C) (Fig. 15).

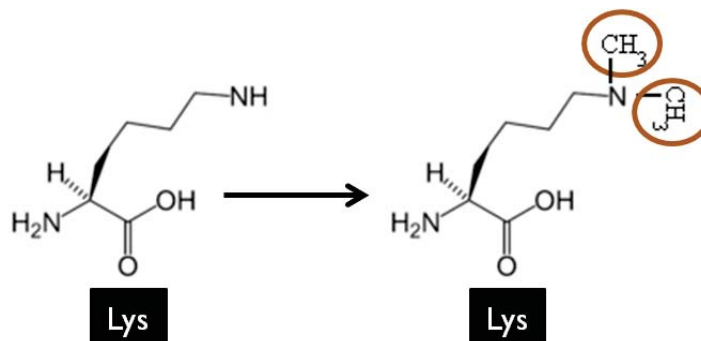


Figura. 13. Modificación de Lys con grupos metilo (ϵ -*N,N*-dimetil-lisina). La tripsina porcina se modifica en el grupo amino libre de las Lys con grupos metilo para obtener ϵ -*N,N*-dimetil-lisina, de tal forma que la carga positiva de la Lys es eliminada.

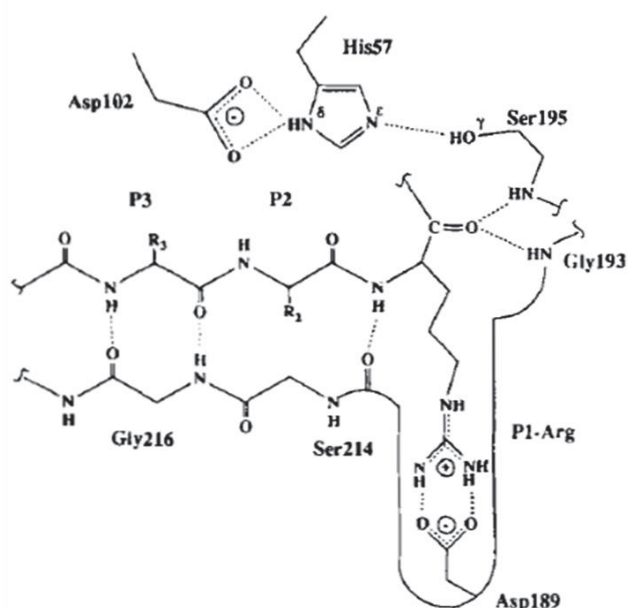
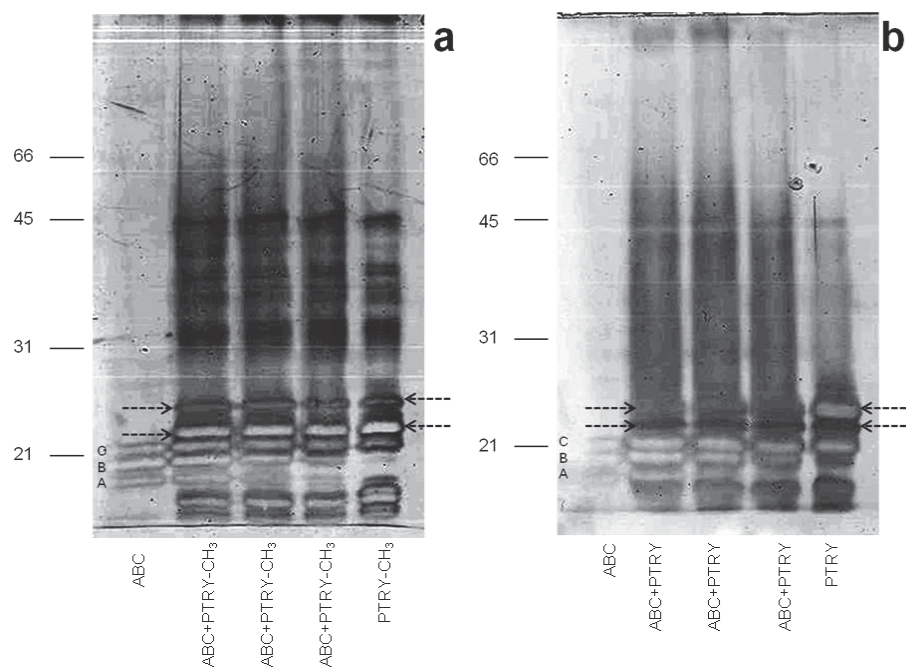


Figura. 14. Interacción de la triada catalítica de tripsina y los sitios P1-P4 del sustrato. (Tomado de Perona y Craik, 1995).



Figra.15. Hidrólisis de tripsina porcina y tripsina porcina metilada producida por isotripsinas de *L. vannamei*. (a) La tripsina porcina metilada (PTRY-CH₃) y (b) tripsina porcina (PTRY) fueron incubadas durante 5 min en presencia de las isotripsinas A, B y C de *L. vannamei* (ABC). Las flechas indican la posición de la tripsina porcina.

Los resultados demostraron que la tripsina porcina metilada (PTRY-CH₃) resiste a la hidrólisis ocasionada por las isotripsinas de *L. vannamei* (Fig. 15). Lo anterior indica que al reducir el número de Lys con carga positiva sobre la tripsina porcina disminuye también su hidrólisis. Este dato apoya la hipótesis sobre la susceptibilidad de las tripsinas de bovino y porcino debido al mayor número de Lys en su estructura. Adicionalmente se utilizó un modelo tridimensional de la isotripsina A y quimotripsina BII de *L. vannamei* para realizar un análisis comparativo con la estructura tridimensional de la tripsina bovina que permita apreciar posibles características que expliquen el fenómeno.

7.10 Análisis comparativo del modelo tridimensional de tripsina A de *L. vannamei* y tripsina bovina.

La isotripsina A de *L. vannamei* tiene 74% de identidad con la tripsina del cangrejo de río *Pontastacus leptodactylus* (PDB código 2f91A) y la quimotripsina II (ChyII)

mantiene 75% de identidad con la colagenasa de *U. pugilator* (PDB código 1azzB) de acuerdo con la base de datos de SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>).

El análisis con PyMol de los modelos computacionales obtenidos para las proteinasas de *L. vannamei* y la estructura tridimensional de la BTRY, permitió observar la posición y el número de Lys (K) y Arg (R) presentes en estas moléculas (Fig. 16). BTRY posee 13 K y 2 R en su estructura (Fig. 16a), en total posee 15 sitios potenciales donde la isotripsina A puede hidrolizar. Por el contrario la isotripsina A tiene 5 K y 3 R (Fig.16b), en total 8 sitios potenciales de hidrólisis. Por ser aminoácidos básicos, la K y R se encuentran generalmente en la superficie de la estructura terciaria en las proteínas.

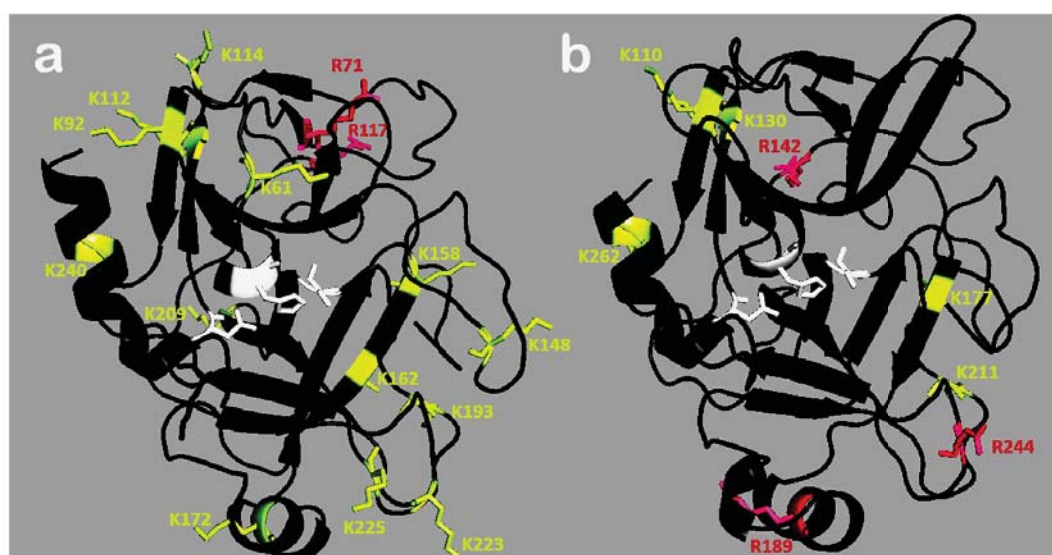


Figura.16. Comparación del modelo estructural de la isotripsina A y tripsina bovina. a) Tripsina bovina BTRY y b) isotripsina A. El modelo se analizó en PyMol, se indica la triada catalítica en color blanco, las Lys (K) en rosa y Arg (R) en verde.

La Fig. 17 muestra una comparación de la superficie molecular de BTRY y la isotripsina A, la comparación revela la presencia de K y R predominantemente en la superficie de BTRY (Fig. 17A).

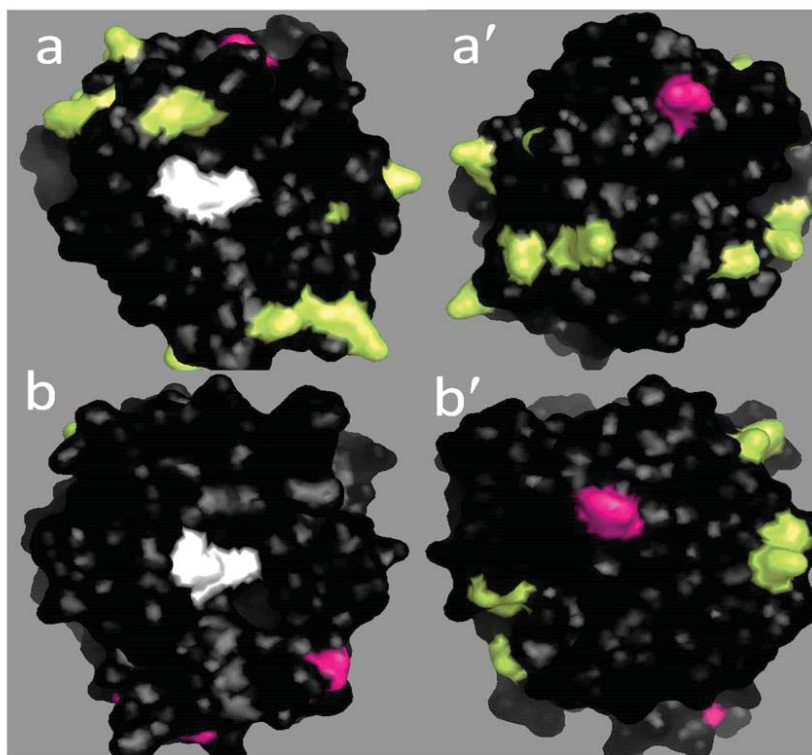


Figura.17. Comparación de la superficie molecular de tripsina bovina e isotripsina A de *L. vannamei*. a) tripsina bovina mostrando de frente la triada catalítica (color blanco) y a') modelo de la tripsina bovina con un giro de 180° en el plano horizontal. b) isotripsina A mostrando la triada catalítica (color blanco) y b') modelo de la isotripsina A girada 180° en horizontal. Se indican K en verde y R en rosa.

Por su parte la quimotripsina BII posee 3 K y 5 R en total 8 sitios potenciales de hidrólisis, mientras que BTRY contiene 9 Y, 4 W, 3 F y 2 M, 18 hipotéticos sitios de proteólisis (modelo no mostrado): Este análisis estructural revela y sugiere que BTRY, en este contexto tiene desventaja.

Además de la exposición de los posibles sitios de hidrólisis (K o R) el presente trabajo sugirió que las tripsinas de decápodos podrían estar protegidas de la proteólisis por impedimento estérico. Sitios posibles de glicosilación se han detectado en las tripsinas y quimotripsinas de *L. vannamei* y otros decápodos. Solo como una aproximación se localizaron los sitios potenciales de glicosilación en el modelo tridimensional de la isotripsina A para observar la proximidad a K o R (Fig. 18). Es posible que un oligosacárido unido a la T¹³⁶ proteja a R y K situadas justo debajo de esta treonina.

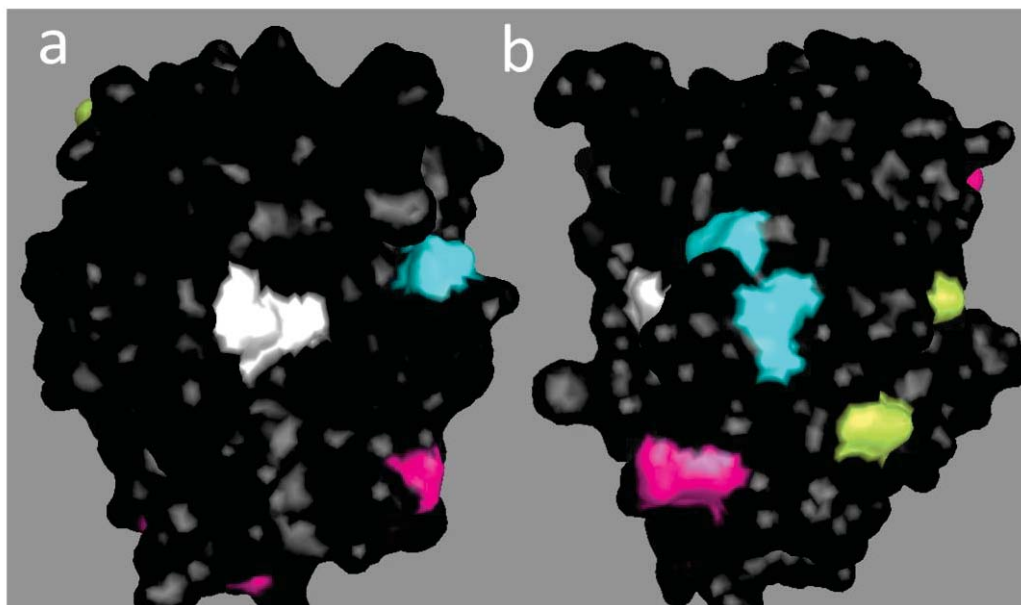


Figura.18. Proximidad de sitios de glicosilación a los sitios potenciales de hidrólisis en la isotripsina A de *L. vannamei*. a) isotripsina A mostrando de frente la triada catalítica, indicada en color blanco. b) tripsina A girada 90° en horizontal, hay una T entre una K y una R. Se indican las K en color verde, las R en color rosa y T en color azul cian.

8. DISCUSIÓN

La actividad proteolítica total en el extracto enzimático de la glándula digestiva de *L. vannamei* disminuye a medida que el pH decrece, estos datos reafirman lo observado por otros autores con relación a la presencia predominante de serino proteinasas en la glándula digestiva de este decápodo (Hernández-Cortés *et al.*, 1997; Klein *et al.*, 1998; Sainz *et al.*, 2004). De igual manera la actividad proteolítica total registrada para las muestras del fluido gástrico provenientes de *C. bellicosus*, *C. pagurus* y *P. interruptus* decrece si el pH disminuye. La mayor actividad proteolítica en el fluido gástrico de los organismos arriba mencionados se registró a pH 8.0 ya que cuentan predominantemente con proteinasas digestivas del tipo serino. Por el contrario y de acuerdo a otros autores (Rojo *et al.*, 2010), la actividad proteolítica en el fluido gástrico de *H. gammarus* y *H. amerianus* se incrementó a medida que el pH disminuyó, corroborando que en estos decápodos la presencia de proteinasas digestivas ácidas (aspártico y cisteíno proteinasas) es predominante. En el caso de las proteinasas comerciales (bromelaina, tripsina bovina y porcina) únicamente se corroboró el pH óptimo. Estos datos permitieron determinar el volumen de extracto enzimático necesario para preparar las mezclas de proteinasas para su evaluación, asegurando que la composición guarde la proporción 1:1 (una mU de actividad proteolítica de enzima exógena por cada mU de extracto enzimático de *L. vannamei*). El presente trabajo se realizó monitoreando la actividad a pH 8.0 y 6.0 de tal modo que fuese posible evaluar las mezclas de proteinasas en condiciones básicas y ácidas manteniendo en todo momento la misma proporción en relación a la actividad proteolítica de las proteinasas involucradas. La integridad de las proteinasas en las mezclas se evaluó en zimogramas y su capacidad proteolítica se valoró utilizando albúmina sérica bovina (BSA). Se demostró que las proteinasas digestivas de *L. vannamei* no tienen la capacidad para hidrolizar BSA mientras que las proteinasas exógenas (comerciales y proteinasas digestivas de otros decápodos) si poseen dicha capacidad. El uso de BSA como sustrato proteico permitió evaluar la contribución y sinergia de proteinasas exógenas evaluadas como potenciales suplementos y las proteinasas digestivas de *L. vannamei*. Se demostró que particularmente las proteinasas digestivas de decápodos tienen un efecto sinérgico con las proteinasas

digestivas de *L. vannamei* para hidrolizar BSA, por el contrario las proteinasas comerciales no comparten esta característica; aún cuando poseen la capacidad de hidrolizar eficientemente la BSA. Los resultados experimentales demostraron que estas observaciones derivan de la pérdida de actividad proteolítica de las proteinasas comerciales en presencia de las proteinasas digestivas del camarón. Particularmente en el presente trabajo se demostró que las tripsinas y quimotripsinas digestivas de *L. vannamei* hidrolizan tripsina porcina y bovina. En comparación y a diferencia de las proteinasas comerciales, las proteinasas digestivas de los decápodos se mantuvieron activas por al menos dos horas, en presencia de las proteinasas digestivas de *L. vannamei* sugiriendo que de algún modo las proteinasas de decápodos no son reconocidas como sustratos por las proteinasas presentes en el extracto enzimático de la glándula digestiva del camarón, sugiriendo un posible reconocimiento estructural que permita a las proteinasas de organismos relacionados filogenéticamente permanecer en un espacio sin generar cambios físicos entre estas.

El análisis de la estructura primaria y terciaria de las tripsinas de mamífero (bovino y porcino) y su comparación con tripsinas de decápodos contribuyó a sugerir, en parte, porque las proteinasas digestivas de *L. vannamei* tienen la capacidad de utilizar como sustrato a las tripsinas de mamífero. Como una primera consideración es importante recordar que las tripsinas (EC 3.4.21.4) y quimotripsinas (EC 3.4.21.1) como parte del grupo de las serino proteinasas presentan la misma triada catalítica (Asp¹⁰², His⁵⁷, Ser¹⁹⁵), la diferencia estriba en que los aminoácidos que componen el bolsillo de unión son diferentes, produciendo la divergencia en la especificidad de estas enzimas. La tripsina hidroliza enlaces peptídicos en el extremo carboxilo de aminoácidos básicos (Lys y Arg) mientras que las quimotripsinas hidrolizan en el extremo carboxilo de aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp). Por otro lado se ha determinado que algunas quimotripsinas de decápodos poseen actividad colagenolítica, confiriendo la capacidad de reconocer e hidrolizar un mayor número de aminoácidos (aromáticos, básicos, alifáticos y ácidos) disminuyendo su especificidad (Tsai *et al.*, 1986b). En el contexto del presente estudio se sugiere que esta inespecificidad sea una ventaja; debido a que la probabilidad de que las

quimotripsinas de decápodos encuentren sitios susceptibles de hidrólisis sobre las tripsinas y quimotripsinas de mamíferos se incrementa.

En 1996 Tsu y Craik señalaron por primera vez que la quimotripsina aislada de la glándula digestiva del cangrejo *Uca pugilator* presenta actividad colagenolítica. Esta característica la comparten otras quimotripsinas de decápodos; por ejemplo la quimotripsina aislada del cangrejo rey (*Paralithodes camtschaticus*), la cual mantiene 74% de identidad con la colagenasa de *U. pugilator* (Rudenskaya, 2003). A las colagenasas de decápodos en un principio se les asignó el nombre de braquiurinas, nombre que deriva de Brachyura el subgrupo filogenético de los cangrejos en el que se describieron por primera vez. La capacidad única de las braquiurinas para hidrolizar colágeno es una particularidad que refleja las características especiales de la alimentación en los decápodos, la cual incluye la piel y el tejido muscular de peces, moluscos y nematodos, estas fuentes contienen grandes cantidades de colágeno (proteína que es extremadamente estable a las otras proteinasas digestivas). Las braquiurinas además se caracterizan por mantener su actividad en un amplio rango de pH (4.5-9), lo que las hace particularmente especiales. Actualmente existe evidencia sugiriendo que las quimotripsinas de *L. vannamei* son braquiurinas. En 1992, Van Wormhoudt reportó el extremo N-terminal de dos enzimas con actividad colagenolítica en la glándula digestiva de *L. vannamei* (Nos. de acceso NCBI: AAB24454.1 reportada como quimotripsina II y AAB24454.1 reportada como quimotripsina I). La quimotripsina I (ChyI) tiene 100% de identidad con el extremo amino de la quimotripsina BI (No. acceso: CAA71672.1) y quimotripsina II (ChyII) un 80% de identidad con la proteínasa BII (No. de acceso: CAA71673.1). Estos datos sugieren que una o las dos quimotripsinas de *L. vannamei* son braquiurinas. Otros datos que apoyan esta hipótesis es el amplio rango de pH (4 a 9) en el cual mantienen su actividad y su alto porcentaje (75%) de identidad con la colagenasa de *U. pugilator* (PDB código 1azzB) de acuerdo con la base de datos de SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>). Lo anterior sugiere que la actividad colagenolítica de las quimotripsinas del camarón puede conferirle ventaja sobre las tripsinas o quimotripsinas de mamíferos.

Otra característica estructural interesante, presente solo en las quimotripsinas del camarón son sitios potenciales de glicosilación en su secuencia de aminoácidos. Esta

característica también está presente en la colagenasa de *U. pugilator* que posiblemente estabiliza a estas enzimas como se ha demostrado para otras proteínas (Marshall y Rabinowitz, 1975; Marshall, 1978; Srivastava, 1991; Wang *et al.*, 1996), es importante resaltar que estos sitios potenciales de glicosilación se encuentran cercanos a Lys o Arg, sitios reconocidos por las tripsinas, sugiriendo que los oligosacáridos unidos a esta proteínasa protegen por impedimento estérico los sitios susceptibles a la proteólisis.

Por su parte, la primera estructura primaria de una tripsina en un crustáceo decápodo se reportó en *Astacus fluviatilis* por Titani y colaboradores (1983), más tarde en 1996 Klein y colaboradores reportaron la estructura primaria de tres isoformas de tripsina deducidas de la secuencia de cDNA en *L. vannamei*. El estudio comparativo de la estructura primaria de tripsina bovina y porcina en relación con tripsinas de decápodos, se demostró que la tripsina bovina y porcina contiene de dos a seis veces más Lys que las tripsinas de decápodos como *P. argus* y *E. sinensis*. El modelo tridimensional de la isotripsina A de *L. vannamei* evidenció la presencia de Lys sobre la superficie molecular de estas enzimas, tal como se esperaba para un aminoácido básico, predominando en la superficie de la tripsina bovina. Esta diferencia estructural podría, en parte, explicar porque las tripsinas de mamíferos son susceptibles a la proteólisis generada por tripsinas de decápodos. El número de Lys presentes y en la superficie de la tripsina bovina y porcina determinan la susceptibilidad que tienen de ser hidrolizadas por las tripsinas de *L. vannamei*. Una forma de disminuir la proteólisis de la tripsina porcina en presencia de tripsinas del camarón es modificando las Lys con grupos metilo, eliminando así la carga positiva sobre estos aminoácidos. Otra explicación radica en la presencia de carbohidratos unidos covalentemente a las proteínasas digestivas del camarón, característica que parece estar presente en proteínasas digestivas de otros decápodos a diferencia de las tripsinas y quimotripsinas de decápodos que no son glicoproteínas. En 2004 Sainz y colaboradores sugirieron que las isotripsinas de *L. vannamei* eran glicoproteínas que poseían posiblemente residuos de N-acetil-D-galactosamina, N-acetil- β -D-glucosamina y/o oligómeros de N-acetil- β -D-glucosamina. En el presente trabajo un análisis *in silico* determinó sitios potenciales en donde los oligosacáridos podrían estar unidos. En la isotripsina A se

identificaron dos treoninas (Thr^{136, 142}), en la isotripsina B (Thr^{135, 136, 142}) y en la tripsina C una asparagina como sitio potencial (Asn⁵⁴). De 2-7 sitios potenciales de glicosilación fueron encontrados en otras tripsinas reportadas para *M. japonicus*, *P. argus*, *P. pelagicus*, *P. trituberculatus*, *C. japonica* y *E. sinensis*. Se ha demostrado que los carbohidratos unidos covalentemente pueden proteger y estabilizar a las proteínas. En base a lo anterior, se sugiere que las isotripsinas de *L. vannamei* estén protegidas de la proteólisis por impedimento estérico, es de notar que algunos de estos sitios potenciales de glicosilación se encuentran cerca de Lys o Arg; sugiriendo que los carbohidratos protegen estéricamente estos sitios susceptibles a la proteólisis. En conclusión los datos sugieren que el número de residuos de Lys y su cercanía con sitios de glicosilación son características que le permiten a las isotripsinas de *L. vannamei* resistir a la proteólisis y utilizar a las tripsinas de bovino y porcino como sustratos.

Por otro lado, los resultados obtenidos con proteinasas exógenas ácidas (cisteíno y aspártico) fueron consistentes con lo ya mencionado para las proteinasas exógenas básicas, las únicas proteinasas que se mantienen activas frente a las proteinasas digestivas del camarón son proteinasas digestivas de otros decápodos. Los resultados demostraron que solo la catepsina digestiva de las langostas mantiene su actividad en presencia de las enzimas digestivas de *L. vannamei*. Esta resistencia a la proteólisis le permite sumarse a la actividad de las proteinasas de *L. vannamei* para incrementar la hidrólisis de BSA, produciendo de este modo un efecto sinérgico. Por el contrario la bromelaina perdió su actividad en presencia de las proteinasas de *L. vannamei*, incapacitándola para hidrolizar la BSA. Por otro lado la incorporación de proteinasas con especificidad diferente a las serino proteinasas de *L. vannamei* permitió observar que es posible que catepsina D escinda enlaces peptídicos de tal forma que permita a las serino proteinasas del camarón hidrolizar la BSA, la hidrólisis de BSA es mayor cuando estas proteinasas actúan en conjunto que cuando están separadas.

Esta investigación proporciona información relevante que intenta dilucidar qué ocurre cuando las proteinasas exógenas ingresan al sistema digestivo y se encuentran con las proteinasas digestivas, utilizando como modelo *L. vannamei*. Los resultados obtenidos permitieron demostrar que las proteinasas exógenas pueden ser hidrolizadas por las

proteinasas digestivas del organismo que las consume. Por lo que una selección de los suplementos enzimáticos es crucial para asegurar un efecto sobre el consumidor. El presente trabajo permitió explicar, en parte, porque algunas proteinasas son hidrolizadas mientras que otras se mantienen íntegras y participan activamente en la proteólisis.

9. CONCLUSIONES

-Las proteinasas utilizadas como suplementos que mantienen su actividad frente a las secreciones de la glándula digestiva de *L. vannamei* pueden establecer sinergia con las proteinasas digestivas del camarón para incrementar la proteólisis.

- Las serino proteinasas de *L. vannamei* tienen la capacidad para hidrolizar tripsina porcina y bovina, quimotripsina bovina y bromelaina de piña, debido a sus características estructurales y bioquímicas.

- Dado que las serino proteinasas de decápodos comparten varias características estructurales y bioquímicas, se sugiere que las serino proteinasas de otros decápodos compartan la capacidad para hidrolizar tripsina bovina y porcina, tal como se confirmó experimentalmente con las proteinasas digestivas de *C. bellicosus*, *P. californiensis* y *P. interruptus*.

-La hidrólisis de la tripsina porcina y bovina, quimotripsina bovina y bromelaina, disminuye cuando su concentración supera de 4 a 8 veces la actividad de las proteinasas digestiva de *L. vannamei*.

-El uso de proteinasas digestivas de decápodos como enzimas exógenas para incrementar la actividad proteolítica en decápodos resulta ser una opción que tiene grandes posibilidades de ejercer un efecto positivo *in vivo*.

-El presente trabajo permitió establecer un sistema *in vitro*, apoyado en dos técnicas ya existentes, zimograma y SDS-PAGE, para evaluar la compatibilidad, integridad y contribución de las proteinasas utilizadas como enzimas exógenas.

9.1 RECOMENDACIONES GENERALES.

Investigaciones futuras son necesarias para determinar las características que le permiten a las proteinasas digestivas de especies diferentes de decápodos permanecer en un espacio sin afectar su actividad biológica.

Para que una enzima exógena tenga mayor probabilidad de éxito al ser utilizada como suplemento enzimático tres condiciones deben cumplirse: 1) debe mantenerse activa, 2) debe tener la capacidad de hidrolizar el sustrato en cuestión, y 3) la concentración debe ser suficiente para ejercer su efecto.

10. REFERENCIAS

- Adeola, O., Cowieson, A. J., 2011. Board-Invited Review: Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. *Journal of Animal Sciences*. 89, 3189-3218.
- Al-Mohanna, S. Y., Nott, J. A., 1986. B-cells and digestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 66, 403-414.
- Al-Mohanna, S. Y., Nott, J. A., 1987. R-cells and the digestive cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *Marine Biology*. 95, 129-137.
- Al-Mohanna, S. Y., Nott, J. A., Lane, D. J. W., 1985. Mitotic E- and Secretory F-Cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 65, 901-910.
- Amaya, E. A., Davis, A., Rouse, D. B., 2007. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. *Aquaculture*. 262, 393-401.
- Baidoo, S. K., Liu, Y. G., Yungblut, D., 1998. Effect of microbial enzyme supplementation on energy, amino acid digestibility and performance of pigs fed hullless barley based diets. *Canadian Journal of Animal Science*. 78, 625-631.
- Barker, P. L., Gibson, R., 1977. Observations on the feeding mechanism, structure of the gut, and digestive physiology of the European lobster *Homarus gammarus* (L.) (Decapoda: Nephropidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 26, 297-324.
- Bärlocher, F., 1982. The contribution of fungal enzymes to the digestion of leaves by *Gammarus fossarum* Koch (Amphipoda). *Oecologia*. 52, 1-4.
- Beauchemin, K. A., Colombatto, D., Morgavi, D. P., Yang, W. Z., 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *Journal of Animal Science*. 81, 37-47.
- Birschbach, P., Fish, N., Henderson, W., Willrett, D., 2004. Enzymes: Tools for creating healthier and safer foods. *Food Technology*. 58.
- Brunet, M., Arnaud, J., Mazza, J., 1994. Gut structure and digestive cellular processes in marine Crustacea. *Oceanography and Marine Biology Annual Review*. 32, 335-367.
- Brunson, J. F., Romaine, R. P., Reigh, R. C., 1997. Apparent digestibility of selected ingredients in diets for white shrimp *Penaeus setiferus* L. *Aquaculture Nutrition*. 3, 9-16.
- Campbell, G. L., Bedford, M. R., 1992. Enzyme applications for monogastric feeds: A review. *Canadian Journal of Animal Science*. 72, 449-466.
- Ceccaldi, H. J., 1998. A synopsis of the morphology and physiology of the digestive system of some crustacean species studied in France. *Reviews in Fisheries Science*. 6, 13-93.
- Celis-Guerrero, L. E., García-Carreño, F. L., Navarrete del Toro, M. A., 2004. Characterization of Proteases in the Digestive System of Spiny Lobster (*Panulirus interruptus*). *Marine Biotechnology*. 6, 262-269.
- Córdova-Murueta, J. H., García-Carreño, F., Navarrete del Toro, A., 2003. Digestive enzymes present in crustacean feces as a tool for biochemical, physiological, and ecological studies. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 297, 43-56.
- Cowieson, A. J., Ravindran, V., 2008. Effect of exogenous enzymes in maize-based diets varying in nutrient density for young broilers: growth performance and digestibility of energy, minerals and amino acids. *British Poultry Science*. 49, 37-44.

- Cowieson, A. J., Acamovic, T., Bedford, M. R., 2006. Using the precision-feeding bioassay to determine the efficacy of exogenous enzymes- A new perspective. *Animal Feed Science and Technology*. 129, 149-158.
- Chesson, A., 1993. Feed enzymes. *Animal Feed Science and Technology*. 45, 65-79.
- Dabrowski, K., Glogowski, J., 1977. Studies on the Role of Exogenous Proteolytic Enzymes in Digestion Processes in Fish. *Hydrobiologia*. 54, 129-134.
- Dall, W., 1967. The functional anatomy of the digestive tract of a shrimp *Metapenaeus bennettiae* Racek and Dall (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). *Australian Journal of Zoology*. 15, 699-714.
- DeVillez, E., Buschlen, K., 1967. Survey of a tryptic digestive enzyme in various species of crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 21, 541-544.
- Díaz-López, M., Moyano, F. J., Alarcón, F. J., García-Carreño, F., Navarrete del Toro, A., 1998. Characterization of fish acid proteases by substrate-gel electrophoresis. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 121, 369-377.
- Díaz-Tenorio, L. M., García-Carreño, F. L., Navarrete del Toro, M. A., 2006. Characterization and comparison of digestive proteinases of the Cortez swimming crab, *Callinectes bellicosus*, and the arched swimming crab, *Callinectes arcuatus*. *Invertebrate Biology*. 125, 125-135.
- Diebold, G., Mosenthin, R., Piepho, H. P., Sauer, W. C., 2004. Effect of supplementation of xylanase and phospholipase to a wheat-based diet for weanling pigs on nutrient digestibility and concentrations of microbial metabolites in ileal digesta and feces. *Journal of Animal Science*. 82, 2647-2656.
- Divakaran, S., Velasco, M., 1999. Effect of proteolytic enzyme addition to a practical feed on growth of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research*. 30, 335-339.
- Emiola, I. A., Opapeju, F. O., Slominski, B. A., Nyachoti, C. M., 2009. Growth performance and nutrient digestibility in pigs fed wheat distillers dried grains with solubles-based diets supplemented with a multicarbohydrase enzyme. *Journal of Animal Sciences*. 87, 2315-2322.
- Española, R. A., 2001. *Diccionario de la lengua española*.
- Felgenhauer, B., 1992. Internal anatomy of the decapoda: An overview, *Microscopic anatomy of invertebrates*. Wiley-Liss, Inc., pp. 45-75.
- Forrellat, A., González, R., Collazo, T., Gallardo, N., Carrillo, O., 1990. Caracterización y estabilidad de la hepatopancreatina de *Penaeus schmitti* para ser utilizada como reactivo biológico. *Revista de Investigaciones Marinas*. 11.
- Forster, I. P., Dominy, W., Obaldo, L., Tacon, A. G. J., 2003. Rendered meat and bone meals as ingredients of diets for shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931). *Aquaculture*. 219, 655-670.
- García-Carreño, F., Haard, N. F., 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *Journal of Food Biochemistry*. 17, 97-113.
- García-Ruiz, A. I., García-Palomares, J., García-Rebollar, P., Chamorro, S., Carabaño, R., de Blas, C., 2006. Effect of protein source and enzyme supplementation on ileal protein digestibility and fattening performance in rabbits. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 4, 297-303.
- Gates, B. J., Travis, J., 1969. Isolation and comparative properties of shrimp trypsin. *Biochemistry*. 8, 4483-4489.
- González-Zamorano, M., Navarrete del Toro, A., García-Carreño, F. L., 2013. Exogenous proteinases as feed supplement for shrimp: *in vitro* evaluation. *Aquaculture Nutrition*. 19, 731-740.

- Hehemann, J.-H., Redecke, L., Murugaiyan, J., von Bergen, M., Betzel, C., Saborowski, R., 2008. Autoproteolytic stability of a trypsin from the marine crab *Cancer pagurus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 370, 566-571.
- Hernández-Cortés, P., Whitaker, J. R., García-Carreño, F., 1997. Purification and characterization of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Journal of Food Biochemistry*. 21, 497-514.
- Herstad, O., McNab, M., 1975. The effect of heat treatment and enzyme supplementation on the nutritive value of barley for broiler chicks. *British Poultry Science*. 16, 1-8.
- <http://productos.mercola.com/enzimas-digestivas/>.
- Klein, B., Sellos, D., Van Wormhoudt, A., 1998. Genomic organisation and polymorphism of a crustacean trypsin multi-gene family. *Gene*. 216, 123-129.
- Kolkovski, S., 2001. Digestive enzyme in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*. 200, 181-201.
- Kolkovski, S., Tandler, A., Kissel, G., Gertler, A., 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation growth survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, *Sparidae linnaeus*) larvae. *Fish Physiology Biochemistry*. 12, 203-209.
- Koshio, S., Teshima, S.-i., Kanazawa, A., Watase, T., 1993. The effect of dietary protein content on growth, digestion efficiency and nitrogen excretion of juvenile kuruma prawns, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*. 113, 101-114.
- Kumar, S., Sahu, N. P., Pal, A. K., Choudhury, D., Mukherjee, S. C., 2006. Studies on digestibility and digestive enzyme activities in *Labeo rhita* (Hamilton) juveniles: effect of microbial α -amylase supplementation in non-gelatinized or gelatinized corn-based diet at two protein levels. *Fish Physiology and Biochemistry*. 32, 209-220.
- Kureshy, N., Davis, A., 2002. Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 204, 125-143.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
- Lemos, D., Navarrete del Toro, A., Córdova-Murueta, J. H., García-Carreño, F., 2004. Testing feeds and feed ingredients for juvenile pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: in vitro determination of protein digestibility and proteinase inhibition. *Aquaculture*. 239, 307-321.
- Marshall, J. J., 1978. Manipulation of the properties of enzymes by covalent attachment of carbohydrate. *Trends in Biochemical Sciences*. 3, 79-83.
- Marshall, J. J., Rabinowitz, M. L., 1975. Enzyme stabilization by covalent attachment of carbohydrate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 167, 777-779.
- Maugle, P. D., Deshimaru, O., Katayama, T., Nagatani, T., Simpson, K. L., 1983. Effect of microencapsulated amylase and bovine trypsin dietary supplements on growth and metabolism of Shrimp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 49, 1421-1427.
- McGaw, I. J., Curtis, D. L., 2013. A review of gastric processing in decapod crustaceans. *Journal Comparative Physiology B*. 183, 443-465.
- Miller, D. R., Granzin, B. C., Elliot, R., Norton, B. W., 2007. Effects of an exogenous enzyme, Roxazyme[®] G2 Liquid, on milk production in pasture fed dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*. 145, 194-208.
- Morgavi, D. P., Beauchemin, D. A., Nsereko, V. L., Rode, L. M., McAllister, T. A., Iwaasa, A. D., Wang, Y., Yang, W. Z., 2001. Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen microorganisms and gastrointestinal proteases. *Journal of Animal Science*. 79, 1621-1630.

- Muhlia-Almazán, A., García-Carreño, F. L., 2002. Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 133, 383-304.
- Munilla-Moran, R., Stark, J. R., Barbour, A., 1990. The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* 88, 337-350.
- Odetallah, N. H., Wang, J. J., Garlich, J. D., Shih, J. C., 2005. Versazyme supplementation of broiler diets improves market growth performance. *Poultry Science*. 84, 858-864.
- Officer, D. I., 1995. Effect of multi-enzyme supplements on the growth performance of piglets during the pre- and post-weaning periods. *Animal Feed Science and Technology*. 56, 55-65.
- Ogunkoya, A. E., Page, G. I., Adewolu, M. A., Bureau, D. P., 2006. Dietary incorporation of soybean meal and exogenous enzyme cocktail can affect physical characteristics of faecal material egested by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 254, 466-475.
- Olukosi, O. A., Sands, J. S., Adeola, O., 2007. Supplementation of carbohydrases or phytase individually or in combination to diets for weanling and growing finishing pigs. *Journal of Animal Science*. 85, 1702-1711.
- Omogbenigun, F. O., Nyachoti, C. M., Slominski, B. A., 2004. Dietary supplementation with multienzyme preparations improves nutrient utilization and growth performance in weaned pigs. *Journal Animal Sciences*. 82, 1053-1061.
- Page, M. J., Craik, C. S., 2013. Brachyurins. in: Rawlings, N. D., Salvesen, G. (Eds.), *Handbook of proteolytic enzymes*. Elsevier, San Diego California, USA, pp. 3049-3052.
- Perera, E., Pons, T., Hernandez, D., Moyano, F. J., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J. M., 2010. New members of the brachyurins family in lobster include a trypsin-like enzyme with amino acid substitutions in the substrate-binding pocket. *Federation of European Biochemical Societies*. 277, 3489-3501.
- Perera, E., Moyano, F. J., Díaz, M., Perdomo-Morales, R., Montero-Alejo, V., Alonso, E., Carrillo, O., Galich, G. S., 2008. Polymorphism and partial characterization of digestive enzymes in the spiny lobster *Panulirus argus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 150, 247-254.
- Perona, J. J., Craik, C. S., 1995. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Science*. 4, 337-360.
- Pettersson, D., Aman, P., 1989. Enzyme supplementation of a poultry diet containing rye and wheat. *British Journal of Nutrition*. 62, 139-149.
- Rawlings, N. D., Barret, A. J., 2013. Introduction: Serine peptidases and their clans, pp. 2491-2495.
- Rivera-Pérez, C., García-Carreño, F. L., Saborowski, R., 2011. Purification and Biochemical Characterization of Digestive Lipase in Whiteleg Shrimp. *Marine Biotechnology*. 13, 284-295.
- Rode, L. M., Yang, W. Z., Beauchemin, K. A., 1999. Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Science*. 82, 2121-2126.
- Rojo, L., Muhlia-Almazán, A., Saborowski, R., García-Carreño, F., 2010. Aspartic cathepsin D endopeptidase contributes to extracellular digestion in clawed lobsters *Homarus americanus* and *Homarus gammarus*. *Marine Biotechnology*. 12, 696-707.
- Rudenskaya, G. N., 2003. Brachyurins, serine collagenolytic enzymes from crabs. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 29, 101-111.
- Saborowski, R., Sahling, G., Navarrete del Toro, A., Walter, I., García-Carreño, F. L., 2004. Stability and effects of organic solvents on endopeptidases from the gastric fluid of the marine crab *Cancer pagurus*. *Journal of Molecular Catalysis B*. 30, 109-118.
- Sainz, J. C., García-Carreño, F. L., Hernández-Cortés, P., 2004. *Penaeus vannamei* isotrypsins: purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 138, 155-162.

- Salas-Salvadó, J., Bonada, A., Trallero, R., Saló, E., 2000. Nutrición y dietética clínica. MASSON, S. A., Barcelona (España).
- Sirvas-Cornejo, S., Latchford, J. W., Jones, D. A., 2007. Effect of microencapsulated diets supplemented with genetically modified bacteria on the growth and survival of *Fenneropenaeus indicus* postlarvae. *Aquaculture Nutrition*. 13, 10-16.
- Smith, L. L., Lee, P. G., Lawrence, A. L., Strawn, K., 1985. Growth and digestibility by three sizes of *Penaeus vannamei* Boone: Effects of dietary protein level and protein source. *Aquaculture*. 46, 85-96.
- Srivastava, R. A. K., 1991. Studies on stabilization of amylase by covalent coupling to soluble polysaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*. 13, 164-170.
- Teijón Rivera, J. M., Garrido Pertierra, A., Blanco Gaitán, D., Villaverde Gutiérrez, C., Mendoza Oltras, C., Ramírez Rodrigo, J., 2006. Fundamentos de bioquímica metabólica, 2ª Edición ed. Tébar, Madrid (España).
- Teschke, M., Saborowski, R., 2005. Cysteine proteinases substitute for serine proteinases in the midgut glands of *Crangon crangon* and *Crangon allmani* (Decapoda: Caridea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 316, 213-229.
- Tsai, I.-H., Chuano, K.-L., Chuang, J. L., 1986a. Chymotrypsins in digestive tracts of crustacean decapods (Shrimps). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 85, 235-239.
- Tsai, I.-H., Liu, H.-C., Chuang, K.-L., 1986b. Properties of two chymotrypsins from the digestive gland of prawn *Penaeus monodon*. *Federation of European Biochemical Societies*. 203, 257-261.
- Tsai, I.-H., Lu, P.-J., Chuang, J.-L., 1991. The midgut chymotrypsins of shrimps (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus penicillatus*). *Biochimica et Biophysica Acta*. 1080, 59-67.
- Tsu, C. A., Craik, C. S., 1996. Substrate recognition by recombinant serine collagenase 1 from *Uca pugilator*. *The Journal of Biological Chemistry*. 271.
- Tsu, C. A., Perona, J. J., Schellenberger, V., Turck, C. W., Craik, C. S., 1994. The substrate specificity of *Uca pugilator* collagenolytic serine protease 1 correlates with the Bovine type I collagen cleavage sites. *The Journal of Biological Chemistry*. 269, 19565-19572.
- Twyman, R., 2002. What are model organisms?, <http://genome.wellcome.ac.uk>.
- Van Wormhoudt, A., Le Chevalier, P., Sellos, D., 1992. Purification, biochemical characterization and N-terminal sequence of a serine protease with chymotryptic and collagenolytic activities in a tropical shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 103, 675-680.
- Várallyay, É., Pál, G., Patthy, A., Szilágyi, L., Gráf, L., 1998. Two mutations in rat trypsin confer resistance against autolysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 243, 56-60.
- Viveros, A., Brenes, A., Pizarro, M., Castaño, M., 1994. Effect of enzyme supplementation of a diet based on barley, and autoclave treatment, on apparent digestibility, growth performance and gut morphology of broilers. *Animal Feed Science and Technology*. 48, 237-251.
- Wang, C., Eufemi, M., Turano, C., Giartosio, A., 1996. Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. *Biochemistry*. 35, 7299-7307.
- Wang, J. J., Garlich, J. D., Shih, J. C., 2006. Beneficial effects of Versazyme, a Keratinase feed additive, on body weight, feed conversion, and breast yield of broiler chickens. *The journal of Applied Poultry Research*. 15, 544-550.
- Webb, K. E., 1990. Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review. *Journal of Animal Science*. 68, 3011-3022.

- Xiang-He, L., Ji-Dan, Y., Jiang-Hong, K., Kun, W., An-Li, W., 2013. Apparent digestibility of 12 protein-origin ingredients for pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. North American Journal of Aquaculture. 75, 90-98.
- Yang, W. Z., Beauchemin, K. A., Rode, L. M., 1999. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. Journal of Dairy Science. 82, 391-403.
- Yilmaz, M., Ikiz, R., 2006. Effects of dietary enzymes supplement on growth of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., 1758). Journal of Fisheries & Aquatic Sciences. 23, 323-326.
- Yu, B., Tsen, H. Y., 1993. An in vitro assessment of several enzymes for the supplementation of rabbit diets. Animal Feed Science and Technology. 40, 309-320.
- Zijlstra, R. T., Li, S., Owusu-Asiedu, A., Simmins, P. H., Patience, J. F., 2004. Effect of carbohydrase supplementation of wheat- and canola-meal-based diets on growth performance and nutrient digestibility in group-housed weaned pigs. Canadian Journal of Animal Science. 84, 689-695.
- Zwilling, R., Pfeleiderer, G., Sonneborn, H.-H., Kraft, V., Stucky, I., 1969. The evolution of endopeptidases V. Common and different traits of bovine and crayfish trypsin. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. 28, 1275-1287.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

González-Zamorano, M., Navarrete del Toro, M. A. and García-Carreño, F. L., 2013. Exogenous proteinases as feed supplement for shrimp: *In vitro* evaluation. *Aquaculture nutrition*. 19: 731-740.

González-Zamorano, M., Córdova-Murueta, J., Navarrete del Toro, M. A., Saborowski, R. and García-Carreño, F. L. Digestive proteinases from decapods suitable as food supplement for *Penaeus vannamei*, compared with mammalian proteinases. *Aquaculture nutrition*.
SOMETIDO.