

Caracterización parcial de proteasas digestivas del chucumite (*Centropomus parallelus*)

Partial characterization of digestive proteases of fat snook (*Centropomus parallelus*)

Fidel Jesús-Ramírez¹, Carlos Alfonso Álvarez-González¹, Héctor Gerardo Nolasco-Soria², Emyr Peña^{1,3}, Rafael Martínez-García¹, Susana Camarillo-Coop¹, Kevin Conway⁴ y Camilo Pohlenz⁴

¹Laboratorio de Acuicultura Tropical, División Académica de Ciencias Biológicas, UJAT. 0.5 km. Carretera Villahermosa-Cárdenas, Villahermosa, 86000, Tabasco. México

²Laboratorio de Fisiología Comparada, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR). Av. Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur; La Paz, Baja California Sur, 23096. México

³CONACYT. Av. Insurgentes Sur 1582, Col. Crédito Constructor. Ciudad de México, 03940. México

⁴Department of Wildlife and Fisheries Sciences, Texas A&M University, College Station, TX, 77843, USA
e-mail: alvarez_alfonso@hotmail.com

Recibido: 21 de agosto de 2014.

Aceptado: 28 de agosto de 2017.

Jesús-Ramírez F., C. A. Álvarez-González, H. G. Nolasco-Soria, E. Peña, R. Martínez-García, S. Camarillo-Coop, K. Conway y C. Pohlenz. 2017. Caracterización parcial de proteasas digestivas del chucumite (*Centropomus parallelus*). *Hidrobiológica* 27 (3): 419-427.

RESUMEN

Antecedentes. Diversos estudios han abordado la caracterización de las diversas enzimas digestivas, lo cual es esencial para entender los tipos, modos de acción y nivel de actividad de dichas enzimas. **Objetivos.** La caracterización parcial de las proteasas digestivas se estudió en juveniles del chucumite (*Centropomus parallelus*, Poey 1869). **Métodos.** Se utilizaron técnicas bioquímicas y electroforéticas para la caracterización de proteasas. **Resultados.** La actividad de proteasas ácidas (estomacales) fue mayor a las proteasas alcalinas (intestinales). Asimismo, la actividad de la quimotripsina fue superior a la actividad de la tripsina. El pH óptimo para las proteasas estomacales fue de 2 con una alta estabilidad en el rango de pH 2-8, mientras que las proteasas intestinales mostraron dos picos con actividad a pH 8 y 10, siendo altamente estables a los pH 8 y 12. Las temperaturas óptimas se obtuvieron a 45 y 55 °C para proteasa estomacales e intestinales, respectivamente. Mediante el uso de inhibidores de proteasas se comprobó la presencia de pepsina en los extractos estomacales y de diversas serina proteasas en los extractos intestinales. Los zimogramas mostraron cinco bandas con actividad proteolítica alcalina (79.5, 48.9, 37.0, 29.0 y 22.5 kDa), las cuales fueron fuertemente inhibidas con PMSF, SBT1 y ovoalbúmina. **Conclusiones.** Por lo anterior, se considera que *C. parallelus* tiene una alta capacidad digestiva similar a otros peces marinos carnívoros estrictos.

Palabras clave: *Centropomus parallelus*, pepsina, tripsina, inhibidores.

ABSTRACT

Background. Several studies have addressed the characterization of various digestive enzymes, which is essential for understanding the types, modes of action, and level of activity of these enzymes. **Goals.** The partial characterization of the digestive proteases was studied in fat snook juveniles (*Centropomus parallelus*, Poey 1869). **Methods.** Characterization was performed using electrophoretic and biochemical techniques. **Results.** Acidic proteases activity (stomach) is higher than alkaline proteases activity (intestine); also, chymotrypsin activity was superior to the trypsin activity. The optimal pH was 2 for stomach proteases with high stability in a wide range of pH 2-8, while the intestinal proteases showed two peaks with activity at pH 8 and 10 with stability at a pH of 8-12. Optimal temperatures were obtained between 45 to 55 °C for stomach and intestine proteases, respectively. Using proteases inhibitors, the presence of an aspartic protease (pepsin) was tested from stomach extracts and diverse serine proteases from intestine extracts. The zymograms showed 5 bands with alkaline proteolytic activity (79.5, 48.9, 37.0, 29.0, and 22.5 kDa), which were highly inhibited with PMSF, SBT1, and ovalbumin. **Conclusions.** *C. parallelus* is considered to have a high digestive capacity similar to those reported for other strictly carnivorous marine fish.

Key words: *Centropomus parallelus*, inhibitors, pepsin, trypsin.

INTRODUCCIÓN

Los estudios de caracterización de proteasas en organismos acuáticos se han enfocado en identificar el tipo de enzimas digestivas presentes en el tracto digestivo de especies de interés acuícola aprovechando su naturaleza bioquímica y su función dentro de la digestión de los alimentos y asimilación de nutrientes. Por lo tanto, estudiar la caracterización de las diversas enzimas digestivas es esencial si se pretende entender los tipos y modos de acción, así como el nivel de actividad que presentan (Alarcón *et al.*, 1998). Para este fin se pueden evaluar factores como el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de las enzimas digestivas, la afinidad por sustratos específicos, los inhibidores específicos y la caracterización por técnicas electroforéticas (Cohen *et al.*, 1981). Es así como varias investigaciones han abordado aspectos que van desde la descripción de los parámetros funcionales de las principales enzimas digestivas o los tipos de enzimas presentes en el estómago (pepsina) e intestino (tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas, aminopeptidasas, entre otras), hasta la forma en que éstas pueden ser utilizadas para modelar la digestión de una especie, así como su función de indicadores de la condición nutricional durante sus diferentes etapas de desarrollo (Moyano, 2006). Bajo este precepto, aunque la mayoría de los peces sintetizan enzimas digestivas similares, la actividad proteolítica varía en cada uno, ya que presentan actividades óptimas a diferentes condiciones de pH y temperatura; por lo tanto, se necesita conocer cuáles grupos de enzimas participan en la degradación proteínica, lo cual se logra con el uso de inhibidores específicos para cada grupo o enzima en particular. Existen múltiples estudios que han caracterizado las proteasas ácidas y alcalinas en distintas especies como el pez disco (*Symphysodon aequifasciata*, Pellegrin 1904; Chong *et al.*, 2002), lenguado (*Solea senegalensis* Kaup 1858; Sáenz *et al.*, 2005), hurta (*Pagrus auriga* Valenciennes, 1843; Moyano *et al.*, 2005), atún aleta azul del Atlántico (*Thunnus thynnus* Linnaeus, 1758; Essed *et al.*, 2002), atún aleta azul del Pacífico (*Thunnus thynnus orientalis* Emminck & Schlegel, 1844; Matus de la Parra *et al.*, 2007), así como la sardina (*Sardinella aurita* Valenciennes, 1847; Ben *et al.*, 2011) y, recientemente, el robalo blanco (*Centropomus undecimalis* Bloch, 1792; Concha-Frías *et al.*, 2016); en ellos se observan valores entre 2 y 3 para la pepsina, y de 7 a 10 para las proteasas digestivas intestinales. En cuanto a la caracterización de las proteasas en relación con la temperatura, se ha detectado que son altamente termoresistentes, pues soportan temperaturas desde 45 °C hasta 65 °C para proteasas digestivas estomacales e intestinales (Essed *et al.*, 2002; Moyano *et al.*, 2005; Sáenz *et al.*, 2005; Matus de la Parra *et al.*, 2007; Ben *et al.*, 2011; Concha-Frías *et al.*, 2016). Debido a lo anterior, el objetivo en nuestro trabajo fue caracterizar las proteasas digestivas de *C. parallelus* (Poey, 1860), con la intención de sentar las bases para los estudios de requerimientos nutricionales de la especie en estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. Los juveniles de *C. parallelus* fueron capturados en la laguna Mecoacán, ubicada en el poblado El Bellote, Paraíso, Tabasco. Los ejemplares fueron clasificados e identificados taxonómicamente al momento de su captura, de acuerdo con lo que mencionan Miller *et al.* (2009), y transportados vivos al Laboratorio de Acuicultura Tropical de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco en un contenedor con capacidad de 1000 l de agua y oxigenación continua. Los organismos fueron depositados en

estanques circulares con capacidad de 1000 l para su adaptación en cautiverio; ello con la finalidad de dejarlos sin aporte de alimento por un periodo de 48 horas, antes de ser sacrificados para su disección.

Caracterización de proteasas digestivas. Para los ensayos de caracterización enzimática se utilizaron 35 robalos juveniles (40 a 65 g), los cuales fueron sacrificados por inmersión en agua hielo (1-4 °C). Los organismos fueron pesados en una balanza (OHAUS, CS2000, 2000 g x 1g), se disecaron a temperatura controlada (4 °C) y se extrajeron estómago e intestino por separado. Los tejidos fueron homogeneizados con un dispersor Ultra Turrax (modelo IKA T18 Basic) en búfer de glicina-HCl 0.1 M a pH 2 para estómagos, y búfer Tris-HCl 30 mM+CaCl₂ 12.5 mM pH 7.5 para intestinos, ambos homogenizados en relación 5:1 (peso/volumen). Las mezclas obtenidas se colocaron en tubos Eppendorf y centrifugaron a 16 000 g (Centrifuge 5810 R Eppendorf), a 4 °C durante 15 minutos. El sobrenadante se separó y el pH se ajustó a pH 2 para estómago con ácido clorhídrico (0.1 M) y a pH de 7.5 para intestino con hidróxido de sodio (0.1 M). Las alícuotas se almacenaron en tubos Eppendorf a -20 °C hasta su posterior análisis.

Cuantificación de proteína. La concentración de proteína soluble de los extractos crudos estomacales e intestinales se determinó mediante la técnica de Bradford (1976), usando albúmina bovina sérica como proteína estándar para la curva de calibración y la utilización microtécnica de acuerdo con lo descrito por el proveedor. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

Actividad proteolítica. La actividad de proteasa ácida de los extractos crudos (EC) estomacales se midió usando hemoglobina 1% como sustrato en búfer de glicina-HCl 100 mM a pH 2 por el método de Anson (1938), mientras que la actividad de proteasas alcalinas de los EC intestinales se evaluó usando caseína al 1% como sustrato en bufer Tris-HCl 100 mM + CaCl₂ 10 mM a pH 9 por el método de Kunitz (1947) modificado por Walter (1984). Se definió una unidad de actividad proteolítica como la cantidad de enzima necesaria para liberar un 1 µg de tirosina por minuto con un coeficiente de extinción molar (MEC) de 5000 cm⁻¹M⁻¹. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

La actividad de quimotripsina se determinó usando BTEE 5 mM (N-Benzoilo-L-Tirosina Etilo Ester) como sustrato de acuerdo con el método reportado por Ásgeirsson & Bjarnason (1991), donde una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 µmol de BTEE por minuto usando un MEC de 964 cm⁻¹M⁻¹. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

La actividad de tripsina se analizó por el método propuesto por Erlanger *et al.* (1961), usando BAPNA 3.5 mM (N-α-Benzoilo-DL-arginina-4-nitroanilida) como sustrato, donde una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de p-nitroanilida liberada por minuto usando un MEC de 8800 cm⁻¹M⁻¹. La actividad de las enzimas digestivas se ajustó con los miligramos de proteína soluble determinados son reportados como U mg de proteína⁻¹. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

Efecto del pH y la temperatura de proteasas digestivas. El pH óptimo de las proteasas ácidas y alcalinas se evaluó usando un búfer universal (Stauffer, 1989) con un rango de 2 a 12, siguiendo el procedimiento para determinación de actividad de proteasas descrito antes. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

La temperatura óptima de las proteasas ácidas y alcalinas se estableció usando diferentes temperaturas (25, 35, 45, 55 y 65 °C). El

efecto del pH y la temperatura en la estabilidad de las proteasas ácidas y alcalinas se determinó preincubando los extractos crudos por 0, 30, 60 y 90 min con el búfer Stauffer (1989) y la temperatura y pH a probar. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

Efecto de inhibidores sobre las proteasas digestivas. La identificación del tipo de enzimas digestivas se realizó de acuerdo con lo mencionado por Dunn (1989). En el caso de las proteasas ácidas se utilizó el Pepstatin A (33.6 kDa) 1 mM como inhibidor. Para las proteasas alcalinas se usaron como inhibidores: fluoruro de fenilmetilsulfonilo 100 mM (PMSF), N- α -tosil-L-lisina-clorometilo cetona hidrociorada 10 mM (TLCK), inhibidor tripsico de soya 250 mM (SBT1), N- α -Tosil-L-fenilalanina clorometilo cetona 10 mM (TPCK), 1,10-fenantrolina 10 mM (Fen), inhibidor tripsico tipo II-T ovoalbúmina de pavo 250 mM (Ovo) y ácido etilendiaminotetraacético 10 mM (EDTA).

Zimogramas de proteasas digestivas. Para las proteasas alcalinas, la electroforesis se realizó en condiciones desnaturizantes utilizando dodecil sulfato sódico (SDS) y un sistema discontinuo (gel almacenador al 4% y un gel resolutive al 10%), de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli (1970) y adaptada por García-Carreño *et al.* (1993). Las electroforesis se realizaron en una cámara Mini PROTEAN® III Bio-Rad con 2 placas de geles verticales de 8 x 10 x 0.075 cm con capacidad para 10 muestras cada uno. El corrimiento de la electroforesis se realizó con un búfer SDS 0.1%, Tris 25 mM y glicina 192 mM, pH 8.3 a 100 volts, 24 mA por 120 min. Para detectar la actividad de proteasa alcalina, los geles se sumergieron en caseína Hammersten al 2% en búfer Tris-HCl 100 mM + CaCl₂ 10 mM, pH 9, durante 1 h a 4 °C; luego se transfirieron a otra solución de caseína a 37°C durante dos horas, posteriormente, se lavaron con agua destilada y se fijaron en una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 12% durante 15 min.

Para la tinción se utilizó la metodología de Weber & Osborn (1969), con algunas modificaciones. Los geles permanecieron durante toda la noche a temperatura ambiente en la solución de tinción compuesta de 0.1% azul brillante de Coomassie (R- 250) en metanol-ácido acético-agua destilada (40:10:50). Para revelar los geles se utilizó una solución de metanol-ácido acético-agua (40:10:50). Las bandas de actividad proteolítica se observaron como bandas claras sobre un fondo azul intenso (caseína embebida en el gel). Para esta técnica se incluyó un marcador de bajo peso molecular Bio-Rad (LRMWM; Sigma, M-3913, fosforilasa B 97 kDa, albúmina bovina sérica 66 kDa, ovoalbúmina 45 kDa, anhidrasa carbónica 29 kDa, tripsinógeno 24 kDa e inhibidor tripsico de soya 20 kDa). Para determinar los pesos moleculares de las bandas con actividad proteolítica se utilizó el programa Quality One V 4.6.5. de Bio-Rad.

Análisis estadísticos. Se comparó el control sin inhibir contra la actividad residual con uso de inhibidores por medio de la prueba de Kruskal-Wallis. A fin de detectar diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicó la prueba *a posteriori* de Nemenyi. Todos los análisis se realizaron con un valor de significancia de 0.05. Para el análisis estadístico se utilizó el programa STATISTICA v. 7.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestra que la actividad de la pepsina fue mayor a la actividad de las proteasas alcalinas, mientras que la quimotripsina presentó mayor actividad específica que la tripsina.

Por otra parte, el pH óptimo para la actividad de proteasas ácidas fue pH 2.0 (Fig. 1a), y la estabilidad de la actividad relativa se mantuvo alrededor del 100% en los pH 2 y 4 durante 90 min de preincubación, mientras que para los pH 6 y 8 la estabilidad tiende a disminuir alrededor de un 20% desde los 60 min de preincubación. Por su parte, con pH de 10 y 12 la actividad residual cae abruptamente hasta llegar a 20% desde los 30 min de preincubación (Fig. 1b). La temperatura óptima fue a 45 °C (Fig. 1c), y su estabilidad mantuvo 100% de actividad residual a 25, 35 y 45 °C durante los 90 min de preincubación, mientras que para 55 y 65 °C se presenta una drástica caída a partir del minuto 30 de preincubación, al alcanzar solamente el 20% de actividad residual (Fig. 1d).

En otro orden de ideas, las proteasas alcalinas mostraron dos picos de mayor actividad: uno máximo, con pH 10, y otro con menor actividad con pH 8 (Fig. 2a). Mostraron una alta estabilidad con pH 6, 8, 10 y 12 durante los 90 min de preincubación, mientras que la actividad residual con los pH 2 y 4 disminuye rápidamente a partir de los 30 min de preincubación (Fig. 2b). La temperatura óptima para la actividad de proteasas alcalinas fue a 55 °C (Fig. 2c), y fue altamente estables entre los 25, 35 y 45 °C (alrededor del 100% de actividad residual) durante los 90 min de preincubación, mientras que las temperaturas de 55 y 65 °C afectan fuertemente la actividad de las enzimas, que disminuyen abruptamente para mantener solamente un 20% de actividad residual a partir de 30 min de preincubación (Fig. 2d).

Para la caracterización de las proteasas presentes en los EC estomacales e intestinales de *C. parallelus*, se utilizaron inhibidores generales y específicos (Fig. 3). La actividad de las proteasas ácidas fue inhibida en un 80% con pepstatin A. Por otro lado, la actividad de las proteasas alcalinas se redujo en 10 y 40%, con ovoalbúmina y PMSF, respectivamente; el TPCK redujo la actividad en un 50%, mientras que el TLCK y SBT1 redujeron la actividad para la tripsina en un 15 y 25%, respectivamente. Los inhibidores EDTA y fenantrolina lograron reducir la actividad en 5 y 85%, respectivamente.

El zimograma de proteasas ácidas mostró una banda de actividad con un Rf de 0.35 kDa, inhibida totalmente por el pepstatin A (Fig. 4a). Para las proteasas alcalinas se detectaron cinco bandas de actividad con un peso molecular de 79.5, 48.9, 37.0, 29.0 y 22.5 kDa respectivamente. El PMSF inhibió tres bandas: 48.9, 37.0 y 29.0 kDa; el SBT1, dos bandas: 48.9 y 29.0 kDa; los inhibidores TPCK, TLCK y fenantrolina no inhibieron ninguna banda; la ovoalbúmina inhibió tres bandas: 48.9, 29.0 y 22.5 kDa, y el EDTA, dos bandas: 29.0 y 22.5 kDa (Fig. 4b).

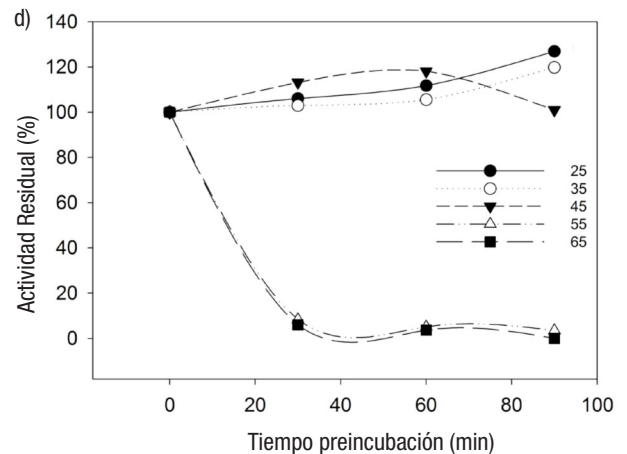
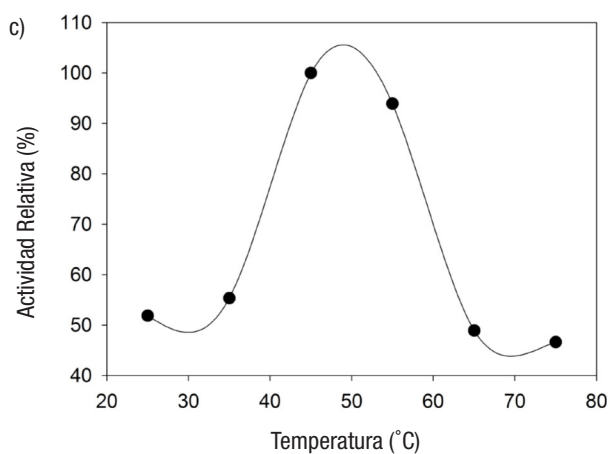
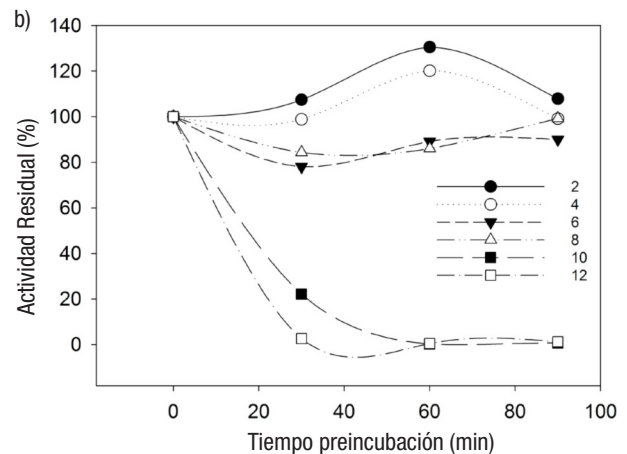
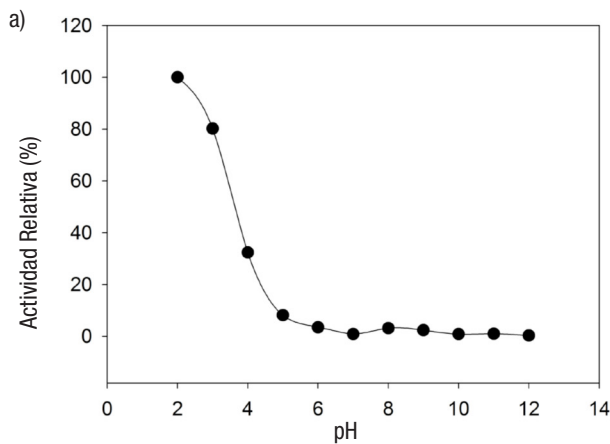
Tabla 1. Actividad proteolítica de las enzimas digestivas ácidas y alcalinas en juveniles de *Centropomus parallelus*.

Tipo	U mg de proteína ⁻¹
Proteasa ácida	64.75 ± 5.23
Proteasa alcalina	0.019 ± 0.005
Quimotripsina	0.04x10 ⁻³ ± 0.002x10 ⁻⁴
Tripsina	0.027x10 ⁻⁵ ± 0.59x10 ⁻⁶

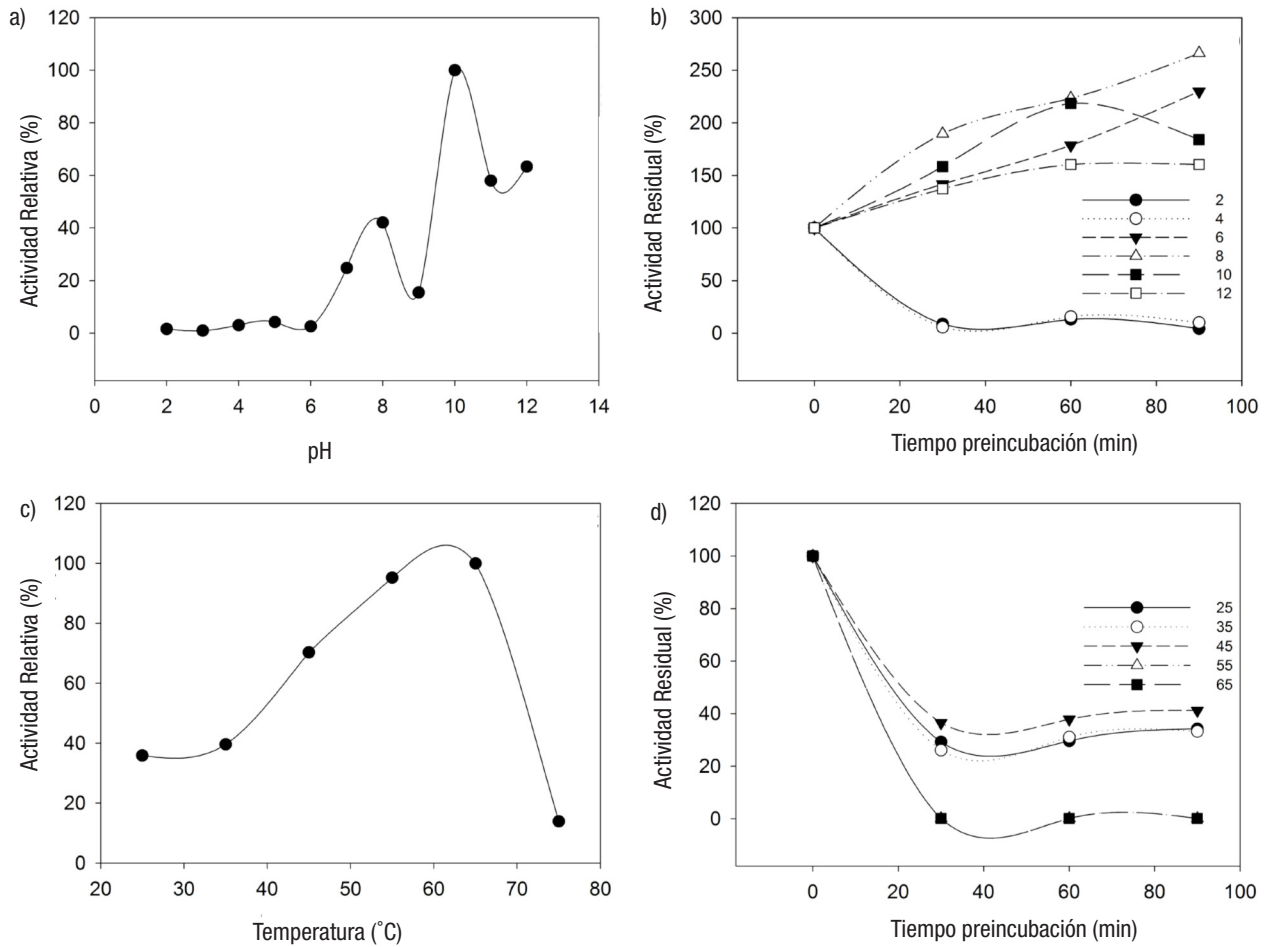
DISCUSIÓN

Desde el punto de vista bioquímico, *C. parallelus* es considerado un carnívoro estricto al estar provisto de un estómago verdadero, esto es, que la actividad de las proteasas ácidas fue mayor a la de las proteasas intestinales, lo cual comprueba que el estómago es donde se realiza la mayor parte de la hidrólisis de proteínas. A su vez, en el intestino se termina la hidrólisis hasta la liberación de aminoácidos, que posteriormente son absorbidos a través de los enterocitos (Wang et al., 2006). Este aspecto concuerda con los estudios realizados en otras especies de peces carnívoros con estómago verdadero, como el atún aleta azul (*Thunnus thynnus thynnus* Linnaeus, 1758; Essed et al., 2002), el pez disco (*Symphysodon aequifasciata* Pellegrin, 1904; Chong et al., 2002), cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus* Steindachner, 1868; Álvarez-González, 2003), pejelagarto (*Atractosteus tropicus* Gill, 1863; Guerrero-Zárate et al., 2013) y robalo blanco (*Centropomus undecimalis*; Concha-Frías et al., 2016). En ellos hallaron una clara diferencia entre la actividad de las enzimas digestivas del estómago y la del intestino. El pH óptimo para las proteasas ácidas de *C. parallelus* fue de 2, que coincide con lo reportado para la mayoría de especies carnívoras, como el rodaballo (*Scophthalmus maximus* Linnaeus, 1758; Wang et

al., 2006), el lenguado senegalés (*S. senegalensis*; Sáenz et al., 2005), la cabrilla arenera (*P. maculatofasciatus*; Álvarez-González, 2003), el atún aleta azul (*T. thynnus*; Essed et al., 2002), el pez disco azul (*S. aequifasciata*; Chong et al., 2002), el pez lengüihueso (*Scleropages formosus* Müller & Schlegel, 1844; Natalia et al., 2004) y el robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) (Concha-Frías et al., 2016), que presentan un intervalo óptimo de pH entre 2 y 4. Complementariamente, las proteasas gástricas muestran ser muy estables con el pH de 2 a 8, desde los 30 minutos de preincubación, lo que demuestra que una vez que el esfínter pilórico se abre y el bolo alimenticio pasa al intestino, la pepsina mantiene su actividad a pesar del incremento gradual del pH; con ello se sostiene la hidrólisis de las proteínas hasta el momento de la acción de las proteasas alcalinas (tripsina y quimotripsina), cuando se ha alcanzado un pH neutro o alcalino (Álvarez-González, 2003). En otro aspecto, la disminución de la actividad enzimática digestiva en función de los cambios de pH ha sido descrita para otros peces, como *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González, 2003), *T. thynnus* (Essed et al., 2002), *A. tropicus* (Guerrero-Zárate et al., 2013) y *C. undecimalis* (Concha-Frías et al., 2016), por lo que el intervalo de acción de las proteasas alcalinas de *C. parallelus* es bastante amplio en comparación con otras especies de peces carnívoros.



Figuras 1a-d. Efecto del pH y la temperatura sobre las proteasas digestivas estomacales de *Centropomus parallelus*: a) pH óptimo. b) Estabilidad a pH. c) Temperatura óptima. d) Estabilidad a la temperatura.



Figuras 2a-d. Efecto del pH y la temperatura sobre las proteasas digestivas intestinales de juveniles de *Centropomus parallelus*: a) pH óptimo. b) Estabilidad a pH. c) Temperatura óptima. d) Estabilidad a la temperatura.

Por otra parte, las proteasas intestinales mostraron dos picos de mayor actividad proteolítica, con pH de 8 y 10. Datos similares se han reportado para la dorada (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758; Munilla & Saborido, 1996), el dentón (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758; Alarcón *et al.*, 1998), *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González, 2003), *S. aequifasciata* (Chong *et al.*, 2002) y *C. undecimalis* (Concha-Frías *et al.*, 2016), así como para peces agástricos, como la sardina Monterrey (*Sardinops sagax caerulea* Jenyns, 1842; Castillo-Yañez *et al.*, 2005) y *S. aurita* (Ben *et al.*, 2011). Esto sugiere la presencia de al menos dos grupos principales de proteasas alcalinas donde la actividad máxima generalmente ha sido detectada con el pH de 8, lo que se debe principalmente a la alta actividad de la tripsina, y se ha demostrado que el pH óptimo para esta enzima se encuentra entre 7 y 9 (Das & Tripathi, 1991). En particular, la quimotripsina de *C. parallelus* parece ser la responsable del segundo pico de actividad cuando el pH es 10, similar a lo reportado por Guerrero-Zárata *et al.* (2013) en *A. tropicus*, y por Concha-Frías *et al.* (2016) en *C. undecimalis*. En esos casos consideran que inicialmente se libera la tripsina, que funciona como una enzima activadora de otras proteasas digestivas intestinales, como la quimotripsina. En este aspecto, la tripsina y la quimotripsina son de origen pancreático y pertenecen al grupo de las serinas proteasas, las cuales tienen su acción

sobre los enlaces peptídicos internos (endopeptidasas), por lo que son las principales enzimas responsables de concluir la hidrólisis fina de los péptidos previamente hidrolizados en el estómago, en conjunto con la acción de las exopeptidasas (amino- y carboxipeptidasas), principalmente de origen intestinal (Moyano *et al.*, 1996).

Es así que los resultados aquí presentados son similares a los reportados para diversas especies de peces marinos y dulceacuícolas de hábitos carnívoros estrictos, como el atún tongol (*Thunnus tonggol* Whitley, 1936; Prasertsan & Prachumratana, 2008a; 2008b), *S. senegalensis* (Sáenz *et al.*, 2005), *T. thynnus* (Essed *et al.*, 2002), *Scleropages formosus* (Natalia *et al.*, 2004) y *C. undecimalis* (Concha-Frías *et al.*, 2016), en cuanto a que presentan una baja cantidad de bandas con actividad proteolítica, generalmente una para pepsina (tipo A de aproximadamente 30 kDa), y no más de cinco bandas para la actividad digestiva intestinal, la cual está fuertemente representada por la presencia de tripsina y quimotripsina (20 y 22 kDa, respectivamente). En este mismo sentido, existen grandes diferencias con peces de hábitos omnívoros o herbívoros, como el piracanjuba (*Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850; García-Carreño *et al.*, 2002), el híbrido de carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix* Valenciennes, 1844) o la carpa

cabeza grande (*Aristichthys nobilis* Richardson, 1845; Kumar *et al.*, 2005), donde se ha detectado que las proteasas intestinales se presentan en un gran número de isoformas tipo tripsina y quimitripsina, generalmente en más de seis bandas, además de que muestran una mayor actividad digestiva en comparación con la estomacal, donde tanto la tripsina como la quimitripsina son las enzimas responsables de la hidrólisis total de las proteínas al ser afines a las cadenas polipeptídicas que contienen fenilalanina, triptófano y tirosina (Chong *et al.*, 2002).

En otro orden de ideas, la respuesta de la actividad de proteasas digestivas en función de los cambios de la temperatura para *C. parallelus* permitió determinar que el óptimo de actividad de las proteasa estomacales e intestinales se dio con 45 y 55 °C respectivamente. En este sentido, se considera que ambos tipos de proteasas son termolábiles, ya que solamente se mantienen activas entre 25 y 45°C, y su actividad disminuye a partir de los 55°C, lo que difiere de lo reportado para *C. undecimalis* (Concha-Frías *et al.*, 2016), donde se muestra una temperatura óptima a los 30 °C para proteasas estomacales, y de 75 °C para proteasas intestinales. Cabe mencionar que la determinación de la temperatura óptima y la estabilidad a los cambios térmicos no corresponden a parámetros fisiológicos de las especies, sino a la afinidad de la enzima con su sustrato a una determinada temperatura al alcanzar la máxima catálisis, por lo que la actividad enzimática digestiva, desde el punto de vista del organismo, se encuentra fuertemente disminuida a la temperatura ambiental donde habita el pez, lo que se compensa con el incremento en el tiempo de retención de los alimentos en el estómago e intestino, además de la acción conjunta de las hormonas digestivas

(colecistoquinina y gastrina), que incrementan los movimientos peristálticos y el cierre de los esfínteres cardiaco, pilórico y del recto, con lo que favorecen la hidrólisis de las proteínas alimentarias (Navarro-Guillén *et al.*, 2017).

En referencia a otro aspecto, nuestros resultados muestran que el pepstatin A inhibió las enzimas estomacales (pepsina tipo A) en más de un 80%, mientras que para las proteasas digestivas intestinales, el PMSF, SBT1 y la ovoalbúmina inhibieron fuertemente las serinas proteasas, mientras que el EDTA y la fenantrolina inactivaron a las enzimas de mayor peso molecular que generalmente pertenecen al grupo de las metalo-proteasas (carboxipeptidasas y aminopeptidasas); finalmente, los inhibidores específicos de TLCK y TPCK disminuyeron la actividad de tripsina y quimitripsina respectivamente. En este sentido, se ha identificado a la pepsina tipo A como la principal proteasa aspártica en el estómago de muchas especies de peces, la cual actúa como la primera enzima proteolítica encargada de la hidrólisis de los polipéptidos de cadena larga en el interior de las cadenas (Tengjaroenkul *et al.*, 2000; Chong *et al.*, 2002; Sáenz *et al.*, 2005). Es así que se determinó que la principal proteasa digestiva en *C. parallelus* fue la pepsina A, al ser altamente inhibida por el pepstatin A y revelarse una sola banda en el zimograma, lo que concuerda con lo reportado para *C. undecimalis*, al detectarse un solo tipo de pepsina (Concha-Frías *et al.*, 2016). Sin embargo, en otras especies de peces se ha reportado la presencia de dos isoformas de pepsina (pepsina I y pepsina II) (Castillo-Yañez *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2011).

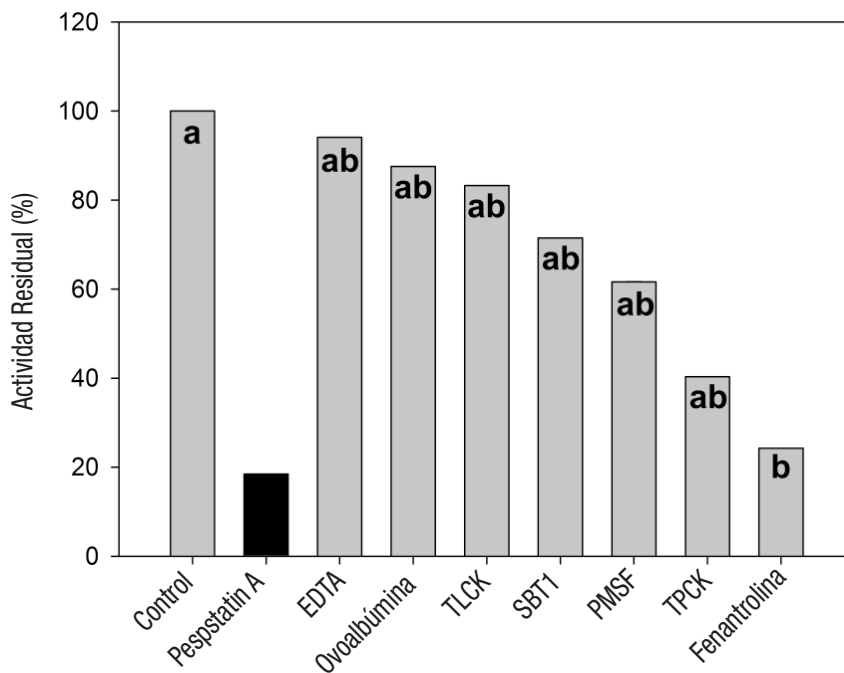
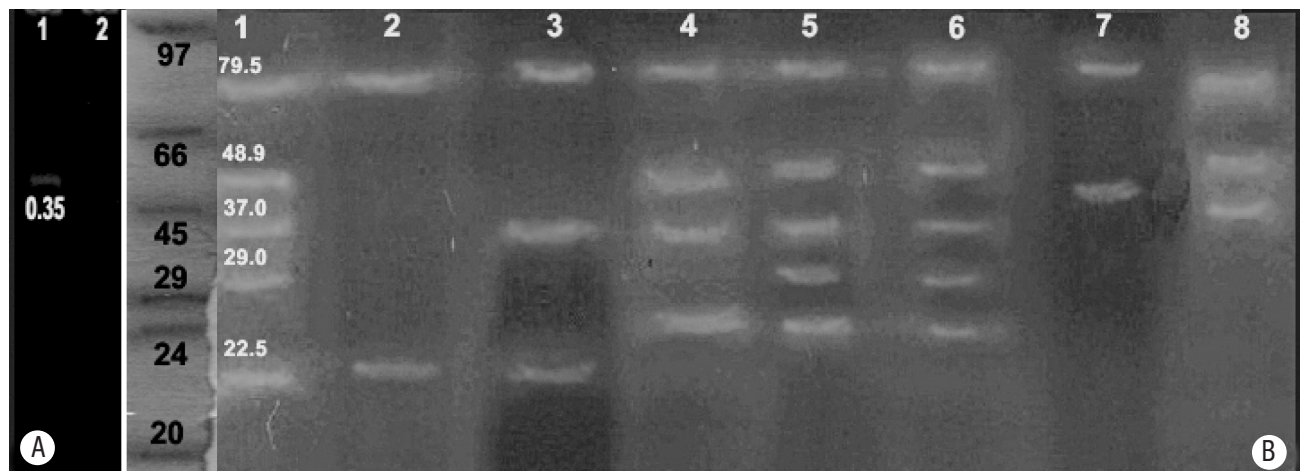


Figura 3. Actividad residual de las proteasas digestivas de los extractos multienzimáticos de juveniles de *Centropomus parallelus* resultante del uso de los inhibidores: Control (proteasas ácidas y alcalinas sin inhibidor), pepstatin A (Inhibidor de pepsina tipo A), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), ovoalbúmina, TLCK (tosil-lisina-clorometil cetona), SBT1 (inhibidor tripsico de soja), PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), TPCK (tosil-fenilalanina-clorometil cetona), fenantrolina.



Figuras 4a-b. Zimograma de actividad de las proteasas ácidas A) y alcalinas B) con diferentes inhibidores. a) pozo 1: Control ácido (proteasas ácidas sin inhibidor), pozo 2: pepstatin A (Inhibidor de pepsina tipo A 33.6 kDa). b) Marcador molecular: fosforilasa B 97 kDa, albúmina bovina sérica 66 kDa, ovoalbúmina 45 kDa, anhidrasa carbónica 29 kDa, tripsinógeno 24 kDa e inhibidor trípico de soja 20 kDa; pozo 1: (Control de proteasas alcalinas sin inhibidor), pozo 2: PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), pozo 3: SBT1 (inhibidor trípico de soja), pozo 4: TPCK (N- α -Tosil-L-fenilalanina clorometilo cetona), pozo 5: TLCK (N- α -Tosil-L-lisina-clorometilo cetona hidrocloreto), pozo 6: Fen (Fenantrolina), pozo 7: Ovo (Ovoalbúmina de pavo), pozo 8: EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).

Por otro lado, el hecho de que el estudio de inhibición enzimática de proteasas digestivas intestinales mostró altas inhibiciones, tanto de serina-proteasas como de metalo-proteasas, indica que *C. parallelus* es una especie altamente carnívora. Esto concuerda con lo encontrado por Essed *et al.* (2002), quienes señalan que la cantidad de tripsina es mayor al principio, por lo que funciona como la enzima clave activadora de otros zimógenos, como la quimotripsina en peces como la trucha o la dorada; mientras que Eshel *et al.* (1993) indican que la contribución de la tripsina a la hidrólisis de las proteasas en el intestino de peces carnívoros marinos es de 40 a 50%, como se ha reportado para *S. aequifasciata*, *S. formosus* y *S. senegalensis* (Chong *et al.*, 2002; Natalia *et al.*, 2004; Sáenz *et al.*, 2005). De acuerdo con lo anterior, el extracto enzimático de juveniles de *C. parallelus* está compuesto principalmente por proteasas alcalinas del tipo tripsina y quimotripsina, las cuales fueron inhibidas 4 y 10% al usar los inhibidores de serina proteasas PMSF y ovoalbúmina respectivamente, lo anterior ha sido reportado para diversas especies de peces por autores como Jonas *et al.* (1983), Dimes *et al.* (1994), Munilla-Morán & Saborido-Rey (1996), García-Carreño *et al.* (2002), Chong *et al.* (2002), Chakrabarti *et al.* (2006), quienes indican la presencia de serinas proteasas como las principales enzimas digestivas presentes en el intestino. En este mismo sentido, Concha-Frías *et al.* (2007) reportó en *C. undecimalis* una inhibición similar a la obtenida con *C. parallelus*, en ese caso el TPCK redujo en un 50% la actividad para quimotripsina. Asimismo, la inhibición de proteasas digestivas alcalinas usando SBT1 y TLCK (15 y 25%, respectivamente) en *C. parallelus* es similar a la de los estudios reportados por Alarcón *et al.* (1998) y Chakrabarti *et al.* (2006) en *Sparus aurata* (20%), *Dentex dentex* (26%) y *C. undecimalis* (17%) (Concha-Frías *et al.*, 2016). De esta forma, el resultado conjunto de la inhibición con SBT1 y TLCK en ensayos *in vitro* y el zimograma SDS-PAGE indican la importancia de la tripsina y la quimotripsina para llevar a cabo la última etapa de digestión en *C. parallelus*, aunque también se detectó la posible presencia de metaloproteasas relacionadas con enzimas tipo aminopeptidasas y carboxipeptidasa. De esta manera, los resultados de la actividad pro-

teolítica digestiva en juveniles de *C. parallelus* demuestran que esta especie es estrictamente carnívora, aunque es necesario profundizar en las investigaciones sobre el desarrollo de alimentos balanceados, así como la posibilidad de sustituir la harina de pescado por otros ingredientes (vegetales y animales terrestres) seleccionados con base en la capacidad fisiológica digestiva de la especie.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca otorgada para los estudios de posgrado, al Programa Institucional de Superación Académica de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por la beca otorgada, al Programa de Movilidad Estudiantil de la UJAT por el apoyo para la estancia de investigación en Baja California Sur (Cibnor), así como al proyecto de investigación "Expanding native marine fish aquaculture in the Gulf of Mexico: Unraveling the early development of *Centropomus* spp. through international collaboration" TAMU-Conacyt 2012-023

REFERENCIAS

- ALARCÓN, F., J. M. DÍAZ, F. J. MOYANO & E. ABELLÁN. 1998. Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiology and Biochemistry* 19: 257-267. DOI: 10.1023/A:1007717708491
- ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, C. A. 2003. Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: serranidae). Tesis doctoral. CICIMAR. La Paz, Baja California Sur, México. 180 p.
- ÅSGERSSON, B. & J. B. BJARNASON. 1991. Structural and kinetic properties of chymotrypsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with

- bovine chymotrypsin. *Comparative Biochemestry Physiology* 99B (2): 327-335. DOI: 10.1016/0305-0491(91)90050-N
- ANSON, M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of General Physiology* 22: 79-89.
- BEN, K. H., K. JELLOULI, N. SOUISSI, S. GHORBEL, A. BARKIA & M. NASRI. 2011. Purification and characterization of three trypsin isoforms from viscera of sardinelle (*Sardinella aurita*). *Fish Physiology and Biochemestry* 37: 123-133. DOI: 10.1007/s10695-010-9424-5
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemestry* 72: 248-254.
- CAO, M. J., W. Q. CHEN, C. H. DU, A. YOSHIDA, W. G. LAN, G. M. LIU & W. J. SU. 2011. Pepsinogens and pepsins from Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Comparative Biochemestry and Physiology- Part B* 158 (4): 259-265. DOI:10.1016/j.cbpb.2010.12.003
- CASTILLO-YAÑEZ, F. J., R. PACHECO-AGUILAR, F. L. GARCÍA-CARREÑO & M. A. NAVARRETE DEL TORO. 2004. Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagaxcaerulea*) viscera. *Food Chemestry* 85 (3): 343-350. DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.07.008
- CASTILLO-YAÑEZ, F. J., R. PACHECO-AGUILAR, F. L. GARCÍA-CARREÑO, F. L. & M. A. NAVARRETE DEL TORO. 2005. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine (*Sardinops sagaxcaerulea*). *Comparative Biochemestry and Physiology* 140B: 91-98. DOI: 10.1016/j.cbpc.2004.09.031
- CHAKRABARTI, R., R. M. RATHORE, P. MITTAL & S. KUMAR. 2006. Functional changes in digestive enzymes and characterization of proteases of silver carp (♂) and bighead carp (♀) hybrid, during early ontogeny. *Aquaculture* 253: 694-702. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.08.018
- COHEN, T., A. GERTLER & Y. BIRK. 1981. Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*): Purification and physical properties of trypsin, Chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase. *Comparative Biochemestry and Physiology* 69B: 639-646. DOI: 10.1016/0305-0491(81)90364-3
- CHONG, A., Y. NATALIA, R. HASHIM & A. ALI. 2002. Characterization of protease activity in developing discus *Symphysodon aequifasciatus* larva. *Aquaculture Research* 33: 663-672. DOI: 10.1046/j.1365-2109.2002.00702.x
- CONCHA-FRIAS, B., C. A. ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, M. G. GAXIOLA-CORTÉS, A. E. SILVA-ARANCIBIA, P. H. TOLEDO-AGÜERO, R. MARTÍNEZ-GARCÍA, S. CAMARILLO-COOP, L. D. JIMENEZ-MARTÍNEZ & J. L. ARIAS-MOSCOSO. 2016. Partial characterization of digestive proteases in the common snook *Centropomus undecimalis*. *International Journal of Biology* 8 (4): 1-11. DOI: 10.5539/ijb.v8n4p1
- DAS, K. M. & S. D. TRIPATHI. 1991. Stuidies on the digestive enzymes of grass carp, *Ctenopharygodon donidella* (Val.). *Aquaculture* 92: 21-32. DOI:10.1016/0044-8486(91)90005-R
- DIMES, L. E., N. F. HAARD, F. M. DONG, B. A. RASCO, I. P. FORSTER, W. T. FAIRGRIEVE, R. ARNDT, R. W. HARDY, F. T. BARROWS & D. T. HIGGS. 1994. Estimation of protein digestibility: In vitro assay of protein in salmonid feeds. *Comparative Biochemestry and Physiology* 108A: 363-370. DOI: 10.1016/0300-9629(94)90107-4
- DUNN, B. M. 1989. Determination of protease mechanism. In: R.J. Beynon y J.S. Bond (Eds.). *Proteolytic Enzymes: A practical approach*. I.R.L. Press. Oxford, Inglaterra. pp. 57-81.
- ESHEL, A., P. LINDNER, P. SMIRNOFF, S. NEWTON & S. HARPAZ. 1993. Comparative study of proteolytic enzymes in the digestive tracts of the European sea bass and hybrid striped bass reared in freshwater. *Comparative Biochemestry and Physiology* 106A: 627-634. DOI: 10.1016/0300-9629(93)90371-A
- ESSED, Z., I. FERNÁNDEZ, F. J. ALARCÓN & F. J. MOYANO. 2002. Caracterización de la actividad proteasa digestiva de atún rojo *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758). *Boletín Instituto Español de Oceanografía* 18 (1-4): 99-107.
- GARCÍA-CARREÑO, F. L., L. E. DIMES & N. F. HAARD. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemestry* 214: 65-69. DOI:10.1006/abio.1993.1457
- GARCÍA-CARREÑO, F. L., C. C. ALBUQUERQUE, M. A. NAVARRETE DEL TORO & F. E. ZANIBONI. 2002. Digestive proteinases of *Bryconor bignyanus* (Characidae, Teleostei): Characteristics and effects of protein quality. *Comparative Biochemestry and Physiology* 132B: 343-352. DOI: 10.1016/S1096-4959(02)00038-6
- GUERRERO-ZÁRATE, R., C. A. ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, M. A. OLVERA-NOVOA, N. PERALES-GARCÍA, C. A. FRIAS-QUINTANA, R. MARTÍNEZ-GARCÍA & W. M. CONTRERAS-SANCHEZ. 2014. Partial characterization of digestive proteases in tropical gar *Atractosteus tropicus* juveniles. *Fish Physiology Biochemestry* 40: 1021-1029. DOI: 10.1007/s10695-013-9902-7
- JONAS, E., M. RAGYANSKI, J. OLAH & L. BORROS. 1983. Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis*, L.), herbivorous (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val) and omnivorous (*Cyprinus carpio*, L.) fishes. *Aquaculture* 30: 145-154. DOI:10.1016/0044-8486(83)90158-8
- KUMAR, S., R. M. RATHORE & R. CHAKRABARTI. 2005. *Digestive enzyme study of hybrid of silver carp (Hypophthalmichthys molitrix) x Bighead (Aristichthys nobilis) during ontogeny*. Larvi'05 – Fish & Shellfish Larviculture Symposium, Belgium.
- KUNITZ, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *The Journal of General Physiology* 30: 291-310.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- MATUS DE LA PARRA, A., A. ROSAS, J. P. LAZO & M. T. VIANA. 2007. Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus thynnus orientalis* under culture conditions. *Fish Physiology and Biochemestry* 33: 223-231. DOI: 10.1007/s10695-007-9134-9
- MOYANO, F.J., M. DIAZ, F. J. ALARCON & M. C. SARASQUETE. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemestry* 15: 121-130. DOI: 10.1007/BF01875591
- MOYANO, F. J., M. A. BARROS, A. PRIEGO, J. P. CAÑAVETE & S. CÁRDENAS. 2005. Evaluación de la ontogenia de enzimas digestivas en larvas de Hurta, *Pargus auriga* (Pisces: Sparidae). *AquaTIC* 22: 39-47.
- MOYANO, F. J. 2006. Bioquímica digestiva en especies acuacultivadas: Aplicaciones en nutrición. In: Elizabeth C. (Eds.). *Avances en nutri-*

- ción acuícola*. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey. Nuevo León. México. 396 p. ISBN 970-694-333-5.
- MILLER, R. R., & W. L. S. N. NORRIS. 2009. *Peces Dulceacuícolas de México*. 4ta. Edición. Museo de Zoología, Universidad de Michigan, E.U.A. 652 p.
- MUNILLA-MORÁN, R. & F. SABORIDO-REY. 1996. Digestive enzymes in marine species. I. Proteinase activities in gut from red fish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). Comparative. *Biochemistry and Physiology* 113B: 395-402. DOI: 10.1016/0305-0491(95)02057-8
- NATALIA, Y., R. HASHIM, A. ALI & A. CHONG. 2004. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquaculture* 233: 305-320. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2003.08.012
- NAVARRO-GUILLÉN, C., I. RÖNNESTAD, A. O. JORDAL, F. J. MOYANO & M. YÚFERA. 2017. Involvement of cholecystokinin (CCK) in the daily pattern of gastrointestinal regulation of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae reared under different feeding regimes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 203A: 126-132. DOI: 10.1016/j.cbpa.2016.09.003
- PRASERTSAN, P. & T. PRACHUMRATANA. 2008a. Comparison and selection of protease and lipase sources from visceral organs of three tuna species. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 30: 73-76.
- PRASERTSAN, P. & T. PRACHUMRATANA. 2008b. Properties of protease and lipase from whole and individual organ of viscera from three tuna species. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 30: 77-86.
- SÁENZ, R. M., F. J. ALARCÓN, M. I. MARTÍNEZ, F. RUIZ, M. DÍAZ & F. J. MOYANO. 2005. Caracterización de las proteasas digestivas del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858. *Boletín Instituto Español de Oceanografía* 21 (1-4): 95-104.
- STAUFFER, C. 1989. *Enzyme Assays for Food Scientists*. Van Nostand Reinhold/AVI. Nueva York. 317 p.
- TENGJAROENKUL, B., B. B. SMITH, T. CACECI & S. A. SMITH. 2000. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 182: 317-327. DOI: 10.1016/S0044-8486(99)00270-7
- WALTER, H. E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer, H. J. (Eds). *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. V, Verlag Chemie. Weinham. pp. 270-277.
- WANG, H., Y. WANG, Q. WANG, C.XUE & M. SUN. 2006. Purification and characterization of stomach protease from the turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 32: 179-188. DOI:10.1007/s10695-006-0010-9
- WEBER, K. & M. OSBORN. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry* 244: 4406-4412.