

Caracterización de Enzimas Digestivas, Digestibilidad *in vitro* y Síntesis de ADNc del Gen de Tripsina en Adultos de la Pigua *Macrobrachium Carcinus*

Manríquez-Santos Teresa de Jesús^{1*}, Álvarez-González Carlos Alfonso¹,
Arias-Rodríguez Lenin¹, Guerrero-Olazarán Martha², Viader-Salvado José
María², Aguilar-Briseño José Alberto²

¹ Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas,
*E-mail: lb01303@hotmail.com

² Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas,
Instituto de Biotecnología

Resumen

El presente estudio se dividió en tres partes: la primera comprende la caracterización de enzimas digestivas de adultos de la pigua *Macrobrachium carcinus*. La segunda parte consistió en la evaluación *in vitro* de la digestibilidad alcalina de extractos multienzimáticos de *M. carcinus*. En la tercera parte se determinó la secuencia del gen de tripsina a partir de la amplificación del ADNc de adultos de *M. carcinus*. Como resultados se obtuvo que la actividad proteolítica de *M. carcinus* se da a un pH óptimo de 8 y a una temperatura óptima de 45°C, la actividad es inhibida por PMSF y por SBT1, lo que indica que la actividad proteolítica en los extractos de *M. carcinus* se da principalmente debido a la presencia de serín proteasas. Los ingredientes alimenticios utilizados, especialmente los de origen animal marino, mostraron alto ($P > 0.05$) grado de hidrólisis. Se obtuvo una secuencia nucleotídica de 816 pb la cual codifica para una proteína de 272 aminoácidos con una masa molecular de 25 kDa. El alineamiento múltiple mostró un rango de identidad de entre 18% y 24% con relación a las secuencias del gen de tripsina de otras especies de invertebrados. La combinación de estudios de caracterización enzimática con las pruebas de digestibilidad *in vitro* puede contribuir al diseño de dietas adecuadas para la reproducción y cultivo intensivo de *M. carcinus*, además de que el estudio de los genes involucrados en la digestión facilitan el entendimiento de la fisiología de la especie.

Palabras clave: Palemonidos, *macrobrachium*, enzimas digestivas, hepatopáncreas, tripsina

Maríquez-Santos, T. *et al.* 2011. Caracterización de enzimas digestivas, digestibilidad *in vitro* y síntesis de ADNc del gen de tripsina en adultos de la pigua *Macrobrachium carcinus*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 143-171.

Introducción

En acuicultura el costo del alimento balanceado puede representar más del 50% del gasto de producción (Molina & Piña, 1999), por ello es importante encontrar estrategias de alimentación que permitan disminuir los costos de operación de una granja, como la formulación de dietas específicas que satisfagan los requerimientos nutricionales en las diferentes etapas del ciclo de vida de las especies a fin de producir volúmenes altos de biomasa a mínimo costo y en menor tiempo. En este aspecto, México cuenta con una gran cantidad de especies de alta importancia comercial como el robalo, la tilapia y camarón blanco, solo por mencionar algunas, siendo este el crustáceo nativo de mayor producción para acuicultura, superando las de otros organismos acuáticos cultivados (Diario Oficial de la Federación, 2004).

En el sureste de México la especie de crustáceo con interés acuícola y que esta bajo estudio desde hace algunos años es el langostino nativo conocido como pigua, *Macrobrachium carcinus*, siendo una especie de gran potencial acuícola debido a la alta fecundidad y fertilidad en cautiverio, resistencia al manejo y condiciones de estrés, tiene un período larval relativamente corto, es omnívoro, la carne es de buena calidad y de gran aceptación local. Se considera que la especie es de importancia económica para el golfo de México y por ello ha surgido el interés por el conocer su fisiología digestiva y de esta manera encontrar las herramientas necesarias para su aprovechamiento (Manríquez-Santos, 2009).

Desde el punto de vista de la fisiología digestiva, las proteasas digestivas son proteínas que hidrolizan otras proteínas provenientes del alimento, por lo que desde hace muchos años han sido ampliamente estudiadas (Alarcón *et al.* 1997). Su conocimiento a través de la determinación de los parámetros operacionales, como el pH, la temperatura y el efecto de inhibidores específicos permiten comprender su modo de acción sobre los diferentes sustratos (Stryer, 2003).

En general, las enzimas requieren un pH y temperatura característico (óptimos), donde la actividad es máxima y sus centros activos presentan una adecuada conformación iónica para llevar a cabo la catálisis con eficiencia. Desde el punto de vista bioquímico, las enzimas en soluciones muy ácidas o alcalinas, o temperaturas fuera de intervalos adecuados se ven fuertemente afectadas, aunque pueden presentar altas resistencias por tiempos relativamente prolongados (Lehninger *et al.*, 2008). Sin embargo, desde el punto de vista fisiológico, especialmente en organismos acuáticos, las enzimas digestivas funcionan fuera de los intervalos óptimos de pH y temperatura, lo que puede afectar la conformación secundaria, terciaria y/o cuaternaria sufriendo desnaturalización reversible o irreversible disminuyendo su actividad (Ásgeirsson *et al.*, 1995).

Por otra parte, otro aspecto que puede afectar la acción de las enzimas digestivas son los ingredientes con lo que los alimentos están elaborados, p. ej. harinas de leguminosas, que pueden contener inhibidores trísicos, lo que disminuye la digestibilidad y por consecuencia el aprovechamiento del alimento (Salvensen & Nagase, 1989). De esta manera, el conocer el efecto de los inhibidores sobre la actividad de las enzimas digestivas, específicamente proteasas, es una herramienta fundamental para la adecuada formulación de alimentos y su efecto de crecimiento y producción en condiciones de cautiverio.

Por su parte, la tripsina es una endopeptidasa digestiva que tiene un peso molecular de alrededor de 24-25 kDa (Walsh 1970, Cohen & Gertler 1981), esta presente en el tracto digestivo de muchos animales y juega un papel importante en la activación de endopeptidasas digestivas. La tripsina formada a partir de tripsinógeno (zimógeno o proenzima inactiva de la tripsina) activa a otras moléculas de tripsinógeno y a otros zimógenos como el quimotripsinógeno y la proelastasa (Walsh, 1970).

En los crustáceos, el hepatopáncreas es un órgano que cumple a su vez las funciones del hígado y el páncreas y es productor de una gran cantidad de proteasas digestivas (Tsai *et al.* 1991). De esta manera, la tripsina de crustáceos fue aislada y caracterizada por primera vez de la glándula digestiva del camarón *Penaeus setiferus* (Gates & Travis 1969). En la

Maríquez-Santos, T. *et al.* 2011. Caracterización de enzimas digestivas, digestibilidad in vitro y síntesis de ADNc del gen de tripsina en adultos de la pigua *Macrobrachium carcinus*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 143-171.

glándula digestiva de *Penaeus japonicus*, la tripsina constituye el 60% de las proteínas totales solubles (Galgani *et al.* 1985). En el hepatopáncreas del langostino *M. carcinus* la actividad enzimática se lleva a cabo en su mayoría por serín proteasas donde se incluyen a la tripsina y quimotripsina.

Materiales y métodos

Selección de adultos y obtención de extracto enzimático

Para el material biológico se utilizaron 20 hembras y 20 machos adultos ($14.19 \text{ g} \pm 2.44$) de *M. carcinus*, fueron capturados en el río Usumacinta en el municipio de Tenosique, Tabasco, posteriormente fueron transportados al Laboratorio de Acuicultura Tropical de la DACBIOL-UJAT. Los reproductores se colocaron en cuatro tanques de plástico redondos de 2000 L cada uno y se mantuvieron en ayuno por 24 horas, para que se vacíe el tracto gastro-intestinal. Posteriormente, los organismos fueron pesados, medidos y sacrificados, por medio de la disección cefálica para obtener la sección de hepatopáncreas. Los hepatopáncreas fueron pesados, almacenados en tubos Eppendorf agregándoles inmediatamente una determinada cantidad RNAlater (Qiagen, Turnberry Lane, Valencia, CA) y se mantuvieron en un ultracongelador a -80°C hasta su análisis.

Determinación de la proteína soluble

Para la determinación de la concentración de proteína soluble de cada muestra, se utilizó la técnica de análisis Bradford (Bradford, 1976). Todas las medidas se realizaron por triplicado. La recta patrón se llevó a cabo con una solución estándar de albúmina bovina (1 mg ml^{-1}). La actividad del extracto problema se determinó calculando la actividad en unidades por ml: $\text{Unidad/ml} = [\Delta\text{Abs} * \text{Volumen final reacción (ml)}] / [\text{CEM} * \text{tiempo (min)} * \text{Volumen extracto (ml)}]$, siendo: ΔAbs : el incremento de absorbancia a una determinada longitud de onda. CEM: el coeficiente de extinción molar del producto obtenido calculado de la recta de regresión ($\text{ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Además de determinar la actividad en unidades/mg proteína soluble = $[\text{Unidades ml}^{-1}] / [\text{mg proteína soluble ml}^{-1}]^{-1}$ y

Maríquez-Santos, T. *et al.* 2011. Caracterización de enzimas digestivas, digestibilidad in vitro y síntesis de ADNc del gen de tripsina en adultos de la pigua *Macrobrachium carcinus*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 143-171.

finalmente, la determinación en unidades de actividad enzimática por individuo
 Unidades/individuo = [Unidades ml⁻¹][No. Adultos ml⁻¹]⁻¹

Caracterización de actividades específicas

Actividad de proteasas

La actividad de proteasas alcalinas se realizó por el método de Kunitz (1947) modificado por Walter (1984) usando como sustrato caseína al 0.5 % en tampón 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂ a pH 9, midiendo la cantidad de tirosina liberada (ABS 280 nm) mediante un espectrofotómetro UV/visible (Jenway, 6405, Oregón, USA). La unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µg de tirosina por minuto. Para determinar el coeficiente de extinción molar de la tirosina, se realizó un recta patrón con diferentes concentraciones de tirosina. El número de unidades de actividad enzimática utilizadas en cada ensayo se calculó a partir de los resultados de actividad proteolítica utilizando 1000 U mg de proteína⁻¹ para el hepatopáncreas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de proteasas alcalinas

La determinación del pH óptimo de proteasas alcalina se determinó utilizando caseína (1 %) como sustrato tamponada en solución universal (Stauffer, 1989) evaluando el pH 2 a 12. Todos estos ensayos se realizaron por triplicado. El efecto del pH sobre la estabilidad de la actividad proteasa alcalina se determinó preincubando el extracto a diferentes valores de pH (2 a 12) durante 30, 60 y 90 min a 25 °C usando como sustrato caseína. Los resultados se muestran en base a la actividad residual con respecto a un control sin preincubar.

Efecto de la temperatura sobre la Actividad y estabilidad de proteasas alcalinas

Para determinar la influencia de la temperatura sobre la actividad de la proteasa alcalina se incubaron los extractos enzimáticos de los langostinos adultos en caseína (1 %), estabilizándolos durante 10 min a temperaturas crecientes (25, 35, 45, 55 y 65 °C). La

Maríquez-Santos, T. *et al.* 2011. Caracterización de enzimas digestivas, digestibilidad in vitro y síntesis de ADNc del gen de tripsina en adultos de la pigua *Macrobrachium carcinus*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 143-171.

reacción se inició por la adición del extracto. Todos estos ensayos se realizaron por triplicado.

La influencia de la temperatura sobre la estabilidad de la actividad enzimática se determinó preincubando el extracto a temperatura creciente (25, 30, 40, 50 y 60 °C) durante 0, 30, 60 y 90 min. Después de la preincubación se determinó la actividad a intervalos de tiempo regulares, tomando muestras que fueron enfriadas en un baño de hielo a 4 °C durante 5 min. A continuación, se determinó la actividad residual frente a un control sin preincubar.

Estudios de inhibición enzimática

El efecto de los inhibidores sobre proteasas alcalinas se realizó de acuerdo con el método descrito por Dunn (1989), utilizando Fenil-metil-sufonil fluoruro (PMSF), Inhibidor trípico de la soya (SBT1), Tosil fenilalaninclorometil cetona (TPCK), Tosil-lisin-cetona (TLCK), fenantrolina y ovoalbúmina, así como el inactivador quelante Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). La actividad se expresó como el porcentaje de inhibición respecto a un control de actividad sin inhibir. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Estudios de inhibición por técnicas electroforéticas para proteasas alcalinas

El estudio de proteasas alcalinas se realizó por medio de un zimograma corriendo una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) en un sistema discontinuo de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli (1970) y adaptada por García-Carreño *et al.* (1993). La electroforesis se llevó a cabo en la cubeta Mini PROTEAN® II (Bio-Rad, Hércules, CA) con 2 placas de geles verticales de 8x10x0.075 cm con capacidad para 10 muestras por electroforesis. Cada placa estuvo compuesta por dos tipos de gel; un gel almacenador con 4 % de poliacrilamida (PAA) y un gel separador con poliacrilamida al 10 %, siendo las condiciones de corrimiento a 100 v por gel durante 1 h. Para el cálculo del peso molecular se utilizó un marcador de bajo intervalo (LRMWM, Sigma, St. Louis, MO), además del programa Quality One V. 4.6.5 (Hércules, CA, USA).

Maríquez-Santos, T. *et al.* 2011. Caracterización de enzimas digestivas, digestibilidad in vitro y síntesis de ADNc del gen de tripsina en adultos de la pigua *Macrobrachium carcinus*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 143-171.

Selección de ingredientes para la técnica de digestibilidad *in vitro*

Los ingredientes utilizados para la prueba de digestibilidad contienen las siguientes proporciones de proteína cruda: harina de pescado (Proteínas e Insumos Marinos) 72 %; gluten de trigo (Glútenes y Almidones de México), 68 %; pasta de soya (Pedregal[®]), 42 %; harina de cerdo (National Renderers Association), 62 %; harina de sangre de res (Pedregal[®]), 80 %; hidrolizado de pescado (Francia) 72 %; caseína bovina (ICN), 90 %; harina de hueso y vísceras de pollo (Pedregal[®]), 47 %; harina de jaiba (Pedregal[®]), 30 %; levadura casera (Tradi-Pan[®]), 30 %.

Determinación del grado de hidrólisis.

El grado de hidrólisis (GH) se determinó utilizando un pH-STAT (Metrohm, Titrino 718, Suiza), para ello se preparó una solución acuosa de materia prima empleando una modificación de la metodología propuesta por Saunders *et al.* (1972). Se ajustó el pH a 8 con NaOH 0.1 N y se mantuvo a 37 °C durante 15 min, después se adicionó la preparación enzimática a pH 8. La mezcla de reacción se mantuvo a 37 °C en agitación continua (500 rpm) durante 45 min. El grado de hidrólisis se calculó a partir del volumen de NaOH 0.05 N necesario para mantener el pH a 8.0. Se valoró el nivel de autohidrólisis de los diferentes ingredientes en ausencia de las proteasas digestivas. En todos los casos se determinó el GH en ausencia del extracto enzimático, que fue sustituido por un volumen equivalente de agua destilada. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. El grado de hidrólisis, se expresa como el porcentaje del número de enlaces peptídicos hidrolizados (h) con respecto al total de la proteína (h_{tot}), se calculó mediante la siguiente ecuación:

Cálculo del grado de hidrólisis de una reacción enzimática (Álvarez-González, 2003)

$$GH (\%) = \frac{h}{h_{tot}} \times 100$$

Donde:

h: Número de enlaces peptídicos hidrolizados.

h_{tot} : Número de enlaces peptídicos totales del sustrato proteico

$$H = V_b \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{MP}$$

Donde:

α MP

h: número de enlaces peptídicos hidrolizados

V_b : Consumo de base en ml

N_b : Normalidad de la base

α : Constante de disociación de los grupos α -NH₂

MP: Masa de proteína en la mezcla de reacción

Durante la determinación del grado de hidrólisis de las materias primas, al adicionar el extracto intestinal al pH Stat se tomaron muestras a 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 y 2700 segundos, las cuales fueron analizadas para cuantificación de aminoácidos totales y mediante electroforesis SDS-PAGE.

Análisis de aminoácidos totales liberados durante la hidrólisis enzimática

El análisis de aminoácidos libres totales fue determinado de acuerdo con la técnica propuesta por Church *et al.* (1983), Posteriormente, se midió la absorbancia a 340 nm, y se comparó con un estándar elaborado con L-leucina. Los resultados se expresan como μ g de equivalentes de L-leucina liberados por cada mg de proteína. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Análisis de las muestras resultantes de la hidrólisis enzimática mediante técnicas electroforéticas

La electroforesis (SDS-PAGE) se desarrollo de acuerdo con la metodología propuesta por Laemmli (1970). La electroforesis se desarrollo a voltaje constante de 100 volts por gel a 5

Maríquez-Santos, T. *et al.* 2011. Caracterización de enzimas digestivas, digestibilidad in vitro y síntesis de ADNc del gen de tripsina en adultos de la pigua *Macrobrachium carcinus*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuicola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuicola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 143-171.

°C durante 45 min.

Análisis del producto amplificado

La electroforesis de DNA se realizó en geles de agarosa al 0.8%, utilizando un buffer TBE 1X. En cada carril se cargó la cantidad adecuada de DNA disuelto en tampón de carga (Sambrook *et al.*, 1989). Las electroforesis se llevaron a cabo a un voltaje constante de 100V, el gel se tiñó en una solución de Bromuro de Etidio. La visualización del ADN se realizó mediante un transiluminador de luz ultravioleta. Los productos obtenidos de la RT-PCR-3' y 5' RACE se mandaron a secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Análisis de similitud de la secuencia del gen de tripsina de *M. carcinus*

A partir de secuencias del gen de tripsina de crustáceos y otros artrópodos obtenidos previamente en la base de datos del GeneBank se realizó el alineamiento de estas secuencias con la secuencia del gen de tripsina obtenida para *M. carcinus*. De esta manera, se calculó el porcentaje de similitud y se analizó el dendograma, todo esto utilizando los programas informáticos Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) y ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Las especies seleccionadas para este análisis fueron: *Litopenaeus vannamei* (GeneBank accesión no. **X86369.1**), *L. salmonis* (GeneBank accesión no. AJ783372.1) *Procambarus clarkii* (GeneBank accesión no. **AY596942.1**), *Portunus trituberculatus* (GeneBank accesión no. **EF530725.1**, **EF530724.1** y **EF530723.1**), *Exopalaemon carinicauda* (GeneBank accesión no. **EF530722.1**, **EF530721.1** y **EF530720.1**), *Metapenaeus ensis* (GeneBank accesión no. **EF530719.1**, **EF530718.1** y **EF530717.1**), *Fenneropenaeus chinensis* (GeneBank accesión no. **EF530716.1**, **EF530714.1**, **EF530713.1**, **EF530712.1** y **EF530711.1**), *Drosophila melanogaster* (GeneBank accesión no. **L11451.1**), *Apis mellifera* (GeneBank accesión no. **XM_001123295.2**), *Anopheles gambiae* (GeneBank accesión no. **HM070255.1**).

Maríquez-Santos, T. *et al.* 2011. Caracterización de enzimas digestivas, digestibilidad in vitro y síntesis de ADNc del gen de tripsina en adultos de la pigua *Macrobrachium carcinus*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 143-171.

Análisis estadístico

A todos los análisis se les hizo una prueba de normalidad y homocedasticidad; en los casos donde estos postulados se cumplieron, se aplicó análisis de varianza de una vía y prueba a posteriori de Tukey. En los casos donde no se cumplió el postulado, se aplicaron pruebas de Kruskal-Wallis y pruebas a posteriori de Tukey no paramétricas. Para todos los estadísticos se utilizó el programa estadístico STATISTICA v 7.0. Todos los análisis estadísticos se realizaron con un valor de significancia de 0.05.

Resultados

Caracterización de actividades específicas

No se detectaron diferencias estadísticas para la concentración de proteína soluble (U mL⁻¹) y las actividad de proteasas alcalinas entre hembras y machos ($P > 0.05$) expresadas en mU mg proteína⁻¹, mU g de hepatopáncreas (HP) ⁻¹ y mU individuo⁻¹ (Tabla 1).

pH óptimo y estabilidad de pH de proteasas alcalinas

El valor más alto estadísticamente ($p < 0.01$) de actividad específica (U mg de proteína⁻¹ \pm SD) para proteasa alcalinas fue a pH de 8 (13.8 ± 0.16), siendo estadísticamente diferente con relación al resto de los valores evaluados (Fig. 1A). Las proteasas alcalinas mostraron alta actividad a pH's de 3, 4, 5, 6, 7, 9 y 10 donde su actividad residual se mantiene por encima del 100% (Fig. 1B), es importante mencionar que el máximo valor de actividad residual se obtuvo a pH 5, estabilizandose después de 30 min de pre-incubación, mientras que la actividad de las proteasas alcalinas a pH's de 6 y 3 muestran disminución a partir de los 30 y 60 min de preincubación respectivamente.

Tabla 1. Actividad de proteasa digestivas (Promedio \pm desvest) de adultos de *Macrobrachium carcinus*

Enzima	SEXO	mU/mg proteína	mU/g de HP	mU/individuo
Proteasa alcalina	♀	3.62 \pm 0.59	0.059 \pm 0.001	0.018 \pm 0.0003
	♂	4.30 \pm 0.21	0.079 \pm 0.004	0.023 \pm 0.001
Aminopeptidasa	♀	1.03*10 ⁻⁵ \pm 1.38*10 ⁻⁶	1.69*10 ⁻⁷ \pm 2.26*10 ⁻⁸	5.06*10 ⁻⁸ \pm 6.87*10 ⁻⁹
	♂	1.63*10 ⁻⁵ \pm 4.901*10 ⁻⁷	2.67*10 ⁻⁷ \pm 8.04*10 ⁻⁹	8.13*10 ⁻⁸ \pm 2.45*10 ⁻⁹
Tripsina	♀	1.33*10 ⁻⁵ \pm 6.86*10 ⁻⁷	2.17*10 ⁻⁷ \pm 1.13*10 ⁻⁸	6.63*10 ⁻⁸ \pm 3.43*10 ⁻⁹
	♂	1.23*10 ⁻⁵ \pm 1.18*10 ⁻⁷	2.24*10 ⁻⁷ \pm 2.17*10 ⁻⁸	6.13*10 ⁻⁸ \pm 5.92*10 ⁻⁹
Quimotripsina	♀	4.78*10 ⁻³ \pm 1.47*10 ⁻⁴	7.85*10 ⁻⁵ \pm 2.41*10 ⁻⁶	2.39*10 ⁻⁵ \pm 7.35*10 ⁻⁷
	♂	7.82*10 ⁻³ \pm 3.58*10 ⁻⁴	1.28*10 ⁻⁴ \pm 5.87*10 ⁻⁶	3.91*10 ⁻⁵ \pm 1.79*10 ⁻⁶
Carboxipeptidasa A	♀	0.97 \pm 0.13	0.016 \pm 2.109*10 ⁻³	0.005 \pm 6.427*10 ⁻⁴
	♂	0.42 \pm 0.05	0.007 \pm 7.972*10 ⁻⁴	0.002 \pm 2.429*10 ⁻⁴

Superíndices diferentes entre las columnas muestran diferencias significativas ($\alpha=0.05$)

Temperatura óptima y estabilidad térmica de proteasas alcalinas

La actividad de proteasas alcalinas más alta estadísticamente ($P<0.05$) se detectó a los 45°C alcanzando un valor de 14.67 ± 0.16 U mg proteína⁻¹ (Fig. 2A). La máxima actividad se detectó a los 65 °C después de 90 min de preincubación; sin embargo a tiempos menores se muestran fluctuaciones en la actividad. A temperaturas más bajas la actividad residual se mantuvo estable a los diferentes tiempos de preincubación (Fig. 2B).

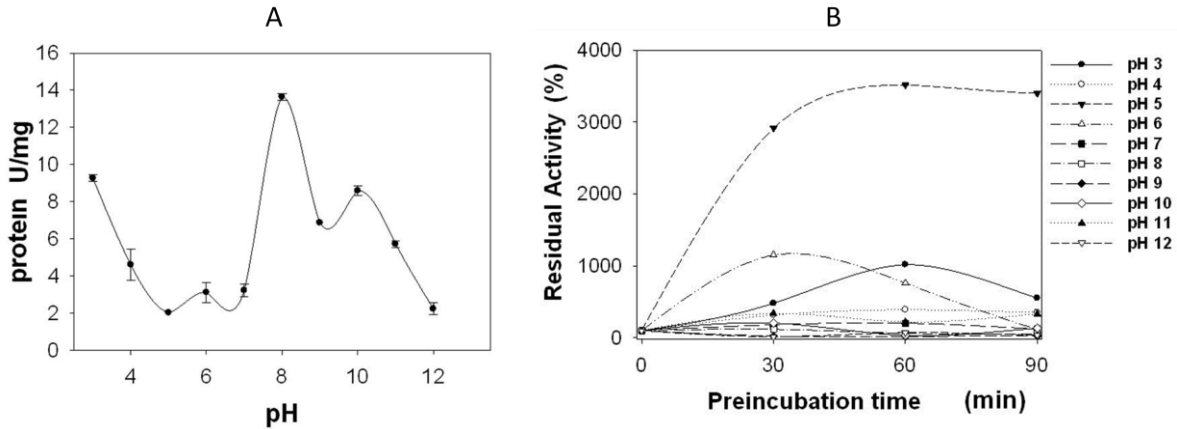


Figura 1. A, Efecto del pH sobre la actividad de proteasas alcalinas. B, efecto del pH sobre la estabilidad de proteasas alcalinas de extractos multienzimático del hepatopáncreas de adultos de la pigua *Macrobrachium carcinus*.

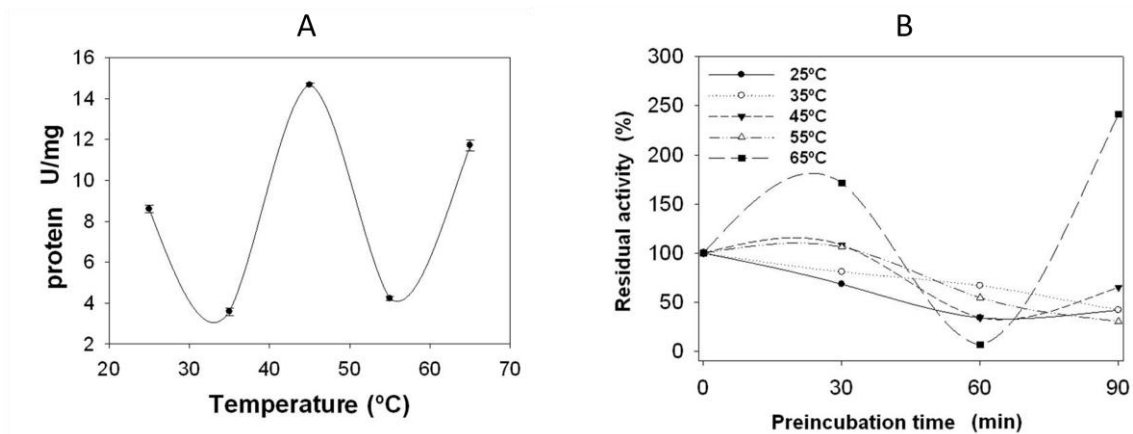


Figura 2. A, Efecto de la temperatura sobre la actividad de proteasas alcalinas. B, efecto de la temperatura sobre la estabilidad de proteasas alcalinas de extractos multienzimáticos del hepatopáncreas de adultos de la pigua *Macrobrachium carcinus*.

Efecto de inhibidores sobre la actividad de proteasas alcalinas

La inhibición de proteasas alcalinas entre sexos fue estadísticamente diferente ($P < 0.05$) con el uso de todos los inhibidores. La inhibición con TLCK fue estadísticamente mayor ($P < 0.05$) para machos con un 75 % comparada con el de hembras con un 63 %. La actividad de serín proteasas se inhibió en un 91% para hembras siendo estadísticamente mayor ($P < 0.05$) que para machos con 87 % utilizando PMSF. Con SBT1 la mayor inhibición ($P < 0.05$) fue detectada en machos (89 %) comparados con el 85 % para hembras. La actividad de quimotripsina fue mayormente inhibida ($P < 0.05$) en machos con 61% comparado con la inhibición en hembras con un 56% al utilizar TPCK. La actividad de metal proteasas se inactivó ($P < 0.05$) en un 95% para machos y fue menor para las hembras con un 85% al utilizar EDTA, mientras que con la fenantrolina la mayor inhibición ($P < 0.05$) fue de 83% para los machos y 75 % para hembras. Por último, la actividad de proteasas alcalina fue inhibida ($P < 0.05$) en un 75 % para machos y en un 62 % para hembras utilizando ovoalbúmina (Fig. 3A). El estudio de inhibición de proteasas alcalinas mediante técnicas electroforéticas (Fig. 3B) mostró, en el testigo (pozo 1), que existen 8 bandas de actividad. Al utilizar PMSF (pozo 4) la actividad de las ocho bandas se inhibió por completo; los inhibidores SBT1 (Pozo 3), TPCK (Pozo 5), fenantrolina (Pozo 6), EDTA (Pozo 7) y TLCK (Pozo 8) inhibieron la actividad de la banda d (81.0 kDa); la ovoalbumina (Pozo 8), SBT1, TPCK y fenantrolina inhibieron la actividad de la banda e (28.5 kDa); asimismo, SBT1, fenantrolina, EDTA y TLCK eliminaron la banda f (45.8 kDa). Para el resto de las bandas los inhibidores no tuvieron efecto.

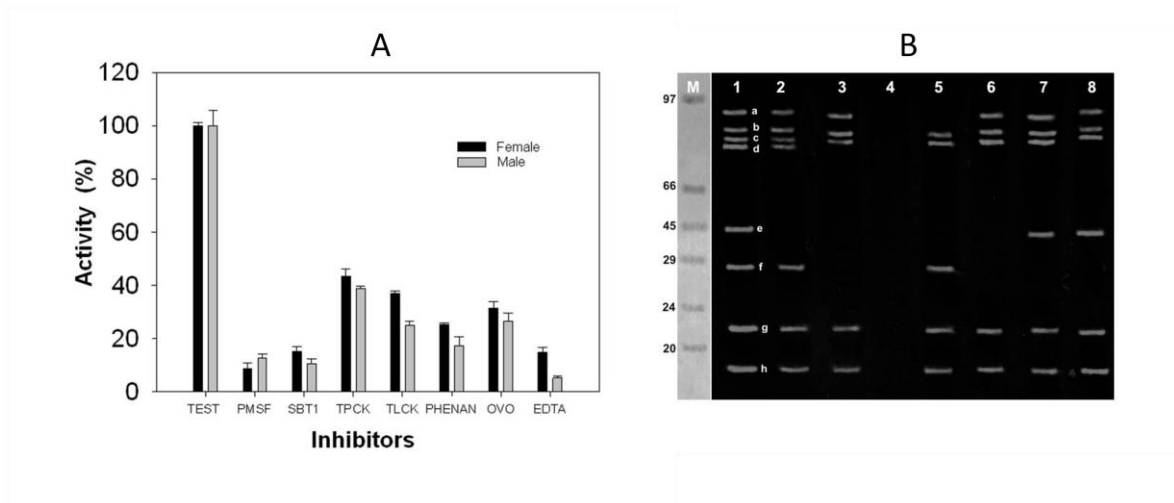


Figura 3. A, efecto de los inhibidores sobre la actividad de proteasa alcalina, *in vitro*. B, zimograma del efecto de inhibidores sobre la actividad de proteasas alcalinas en extractos multienzimáticos del hepatopáncreas de adultos de la pigua *Macrobrachium carcinus*.

Digestibilidad *in vitro*

Determinación del grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis para cada uno de los ingredientes de origen proteínico utilizados, muestra que la levadura fue el ingrediente que presentó mayor grado de hidrólisis ($P < 0.05$). La mayoría de los ingredientes presentan un grado de hidrólisis inicial alto y a partir de los 1000 segundos comienzan a estabilizarse, a excepción de la harina de jaiba que se mantiene constante a partir de los 500 segundos (Fig. 4).

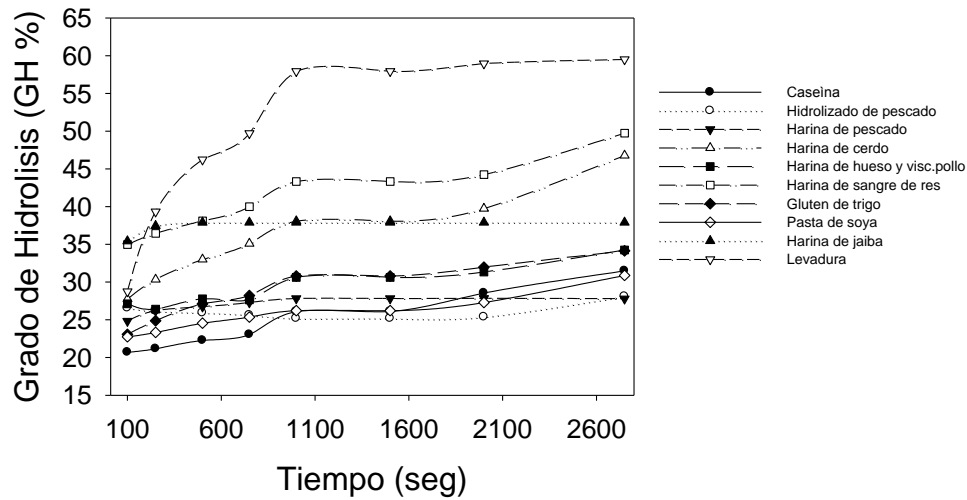


Figura 4. Grado de hidrólisis (GH) de diferentes ingredientes de origen proteico utilizando extracto multienzimático de adultos de *M. carcinus*.

Determinación del grado de hidrólisis total

El extracto multienzimático de los adultos de *M. carcinus* mostró diferencias ($P > 0.05$), importantes en la capacidad de hidrolizar las proteínas presentes en los diferentes ingredientes utilizados (Tabla 2). Para la determinación del grado de hidrólisis total se tomó como control a la caseína y se toma como referencia con el 100 % de digestibilidad. Se observó que la harina de cerdo, harina de hueso y vísceras de pollo, harina de res, gluten de trigo, harina de jaiba y levadura obtuvieron más del 100 % de digestibilidad, siendo este último el ingrediente mayormente hidrolizado con el 189 % de digestibilidad.

Tabla 2. Comparación del grado de hidrólisis (GH %) y porcentaje de digestibilidad in vitro de diversos ingredientes de origen proteínico, utilizando los extractos multienzimáticos de los adultos de *M. carcinus* (Promedio \pm desvest., n=3)

Ingrediente	GH (%)	Digestibilidad (%)
Caseína	31.5 \pm 3.4 ^{cd}	100.0 \pm 10.7
Hidrolizado de pescado	28.1 \pm 9.9 ^e	89.3 \pm 31.4
Harina de pescado	27.8 \pm 1.7 ^e	88.3 \pm 5.4
Harina de cerdo	46.8 \pm 4.4 ^b	148.6 \pm 13.9
Harina de hueso y vísceras de		
Pollo	34.3 \pm 0.4 ^{cd}	108.8 \pm 1.2
Harina de sangre de res	49.7 \pm 8.2 ^b	157.9 \pm 26.1
Gluten de trigo	34.1 \pm 2.4 ^{cd}	108.5 \pm 7.5
Pasta de soya	30.9 \pm 0.1 ^d	98.1 \pm 0.4
Harina de jaiba	37.9 \pm 1.9 ^c	120.4 \pm 6.0
Levadura de panadería	59.5 \pm 1.7 ^a	189.0 \pm 5.5

Superíndices diferentes entre las columnas muestran diferencias significativas ($\alpha=0.05$)

Análisis mediante técnicas electroforéticas

El análisis electroforético mostró que los ingredientes de origen proteínico son degradados de forma muy variable, las proteínas son hidrolizadas muy lentamente por las enzimas presentes en el hepatopáncreas de *M. carcinus* a péptidos de mediano peso molecular, aunque en general las bandas de proteína solamente bajan de intensidad a lo largo del tiempo de la hidrólisis, lo cual se constató al observar bandas de diferente tamaño a lo largo de la digestión, pero que nunca desaparecen. Para el caso de la levadura para panadería se observa que la degradación proteínica es ligeramente más rápida al principio de la hidrólisis y a partir de los 1500 segundos comienza a darse de forma gradual. La degradación proteica del hidrolizado de pescado se da de manera gradual a lo largo del tiempo de hidrólisis.

Amplificación de cDNA

Mediante la técnica RACE se obtuvo una secuencia de ADNc de 816 pb (Fig. 5A) a partir del hepatopáncreas de *M. carcinus* que codifica para el gen de tripsina, con un peso molecular de 110 kDa. El marco de lectura abierto esta compuesto de 404 nucleótidos (372-776) que corresponden a 135 aminoácidos. La secuencia aminoacídica esta compuesta de 272 aminoácidos (Fig. 5B) con una masa molecular de 28 kDa. Presenta 4 regiones de mayor hidrofobicidad, en una de ellas, de 5 aminoácidos, se encuentra el péptido señal. El sitio de activación del precursor o zimógeno se encuentra en el residuo 65. La secuencia aminoacídica posee la triada catalítica His, Asp y Ser en los residuos 196, 233 y 250 respectivamente. La secuencia no posee uniones disulfuro característicos de las serín proteasas de los invertebrados.

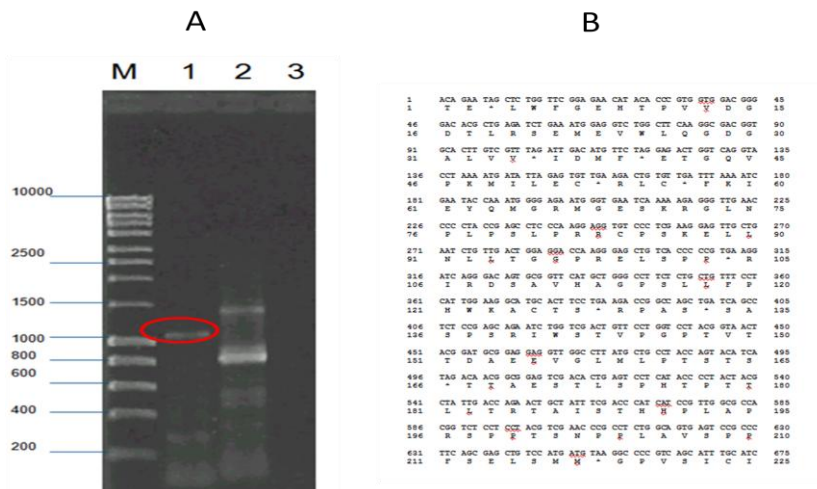


Figura 5. A) Electroforesis del fragmento amplificado, utilizando los oligos diseñados para tripsina de *M. carcinus*. B) Secuencia nucleotídica del ADNc de tripsina de *M. carcinus* y la secuencia aminoacídica obtenida

M) marcador molecular HyperLadder 1® Biolane, 1) muestra de ADNc de tripsina de *M. carcinus*, 2) muestra de ADNc de tripsina de *L. vannamei*, 3) control negativo. En la electroforesis se reveló una banda de 110 kDa de la muestra de ADNc del gen de tripsina de *M. carcinus*. (circulo rojo).

Porcentajes de similitud

El alineamiento múltiple realizado entre la secuencia de ADNc de tripsina de *M. carcinus* y las secuencias obtenidas en la base de datos para crustáceos y artrópodos mostró un rango de identidad de entre 18% y 24% (Tabla 3), el porcentaje de similitud mas alto lo tuvo con *E. carinicauda* y *M. ensis*.

Tabla 3. Porcentaje de similitud entre el gen de tripsina de *M. carcinus* y el gen de tripsina de otras especies de invertebrados obtenidos de la base de datos de GeneBank

Especie	Porcentaje
<i>P. trituberculatus</i> GeneBank accesion no. EF530725.1	23
<i>E. carinicauda</i> PC14 GeneBank accesion no. EF530722.1	23
<i>E. carinicauda</i> PC11 GeneBank accesion no. EF530721.1	22
<i>E. carinicauda</i> PC02 GeneBank accesion no. EF530720.1	24
<i>M. ensis</i> ME12 GeneBank accesion no. EF530719.1	21
<i>M. ensis</i> ME03 GeneBank accesion no. EF530718.1	22
<i>M. ensis</i> ME02 GeneBank accesion no. EF530717.1	24
<i>F. chinensis</i> FS13 GeneBank accesion no. EF530716.1	24
<i>F. chinensis</i> FS25 GeneBank accesion no. EF530714.1	24
<i>F. chinensis</i> FS15 GeneBank accesion no. EF530713.1	23
<i>F. chinensis</i> FS14 GeneBank accesion no. EF530712.1	23
<i>F. chinensis</i> FS12 GeneBank accesion no. EF530711.1	23
<i>P. clarkii</i> GeneBank accesion no. A9596942.1	22
<i>L. salmonis</i> GeneBank accesion no. AJ783372.1	22
<i>L. vannamei</i> GeneBank accesion no. X86369.1	21
<i>D. melanogaster</i> L11451.1	22
<i>A. mellifera</i> XM_001123295.2	18
<i>A. gambiae</i> HM070255.1	21

Discusión

pH óptimo y estabilidad de proteasas alcalinas

Las enzimas digestivas han sido estudiadas desde hace varios años por su importancia como auxiliares en la transformación de alimentos en crustáceos decápodos (García-Carreño & Haard, 1993; García-Carreño *et al.*, 1997; Hernández-Cortés *et al.*, 1997; Lemos *et al.*, 1999; Albuquerque *et al.*, 2002). Generalmente las proteasas de crustáceos muestran su máxima actividad en rangos de pH de 5.5 a 9 (García-Carreño, 1992; García-Carreño *et al.*, 1994; Ceccaldi, 1997); sin embargo, Hernández-Cortés (1997) demostró que la quimotripsina de *P. vannamei* puede ser activada en un rango de pH de 5 a 11. Las proteasas digestivas de lepidópteros y coleópteros muestran su máxima actividad en rango de pH de 10 a 11 y de 6 a 7 respectivamente (Purcell *et al.*, 1992; Ortego *et al.*, 1996). La langosta americana (*Homarus americanus*) y la langosta espinosa japonesa (*Panulirus japonicus*) tienen un rango de pH óptimo de 7 a 8 (Brokerfort *et al.*, 1970; Galgani & Nagayama 1987), mientras que la máxima actividad alcalina de los extractos multienzimático de *M. carcinus* se obtuvo en rango de pH de 7.5 a 10.0, lo que indica que las proteasas de este organismo actúan de manera óptima en pH neutro y alcalino similar a lo reportado para otras especies de crustáceos. Aunque se debe mencionar la presencia de una alta actividad en un pH de 3, lo cual concuerda con lo reportado en el bogavante *Homarus gammarus* y la langosta espinosa *Panulirus interruptus* (Glass & Stark, 1994; Celis-Guerrero *et al.*, 2004), indicando que existe una proteasa ácida en estas especies, aunque no se sabe a ciencia cierta el papel fundamental de esta proteasa ácida en el hepatopáncreas.

Por otra parte, la estabilidad a los cambios de pH de las proteasas alcalinas mostró alta resistencia a la mayoría de pH's evaluados y manteniendo su actividad relativa por encima del 100 %. A pesar de que la mayor estabilidad de las proteasas alcalinas se obtuvo a pH 5, se observa que a pH 6 y 3 la estabilidad de las proteasas es alta y por lo tanto el pH de 3 indica, por un lado, que estas proteasas son altamente resistentes a condiciones de pH ácido, como se observó en el caso de la determinación del pH óptimo y por otro, que en los

extractos enzimáticos de este organismo existe una proteasa ácida de la que hasta ahora no se tiene explicado su papel funcional como ya se explicó anteriormente para *P. interruptus* y *H. gammarus*.

Temperatura óptima y estabilidad de proteasas alcalinas

La temperatura óptima de la actividad de las proteasas alcalinas de adultos de *M. carcinus* fue de 45°C, que es similar a lo observado en especies de cangrejos como *C. affinis* y *Chionoecetes sp.* (Galgani & Nagayama, 1987) y la langosta espinosa *Panulirus interruptus* (Celis-Guerrero *et al.*, 2004). La estabilidad de las proteasas de *M. carcinus* se observa entre 35°C y 55°C con 30 min de incubación, se han reportado valores similares en dos especies de cangrejos, *Callinectes bellicosus* y *C. arcuatus* (Díaz-Tenorio *et al.*, 2006), el cangrejo *Pacifastacus astacus* (García-Carreño y Haard, 1993) con una actividad residual del 75% entre 30°C y 50°C durante 30 min de incubación, lo cual concuerda fuertemente con la forma en que los crustáceos tienden a alimentarse al permanecer largo tiempo triturando y digiriendo el alimento, de tal modo que les permite maximizar la capacidad de hidrolizar y asimilar los nutrientes dentro del hepatopáncreas (Ceccaldi, 1997 & Vega-Villasante *et al.*, 1999).

Caracterización mediante inhibidores y uso de SDS-PAGE

Las zonas de actividad proteolítica con extractos de *M. carcinus* presentan un rango de peso molecular entre 17.8 a 94.0 kDa, lo que coincide con estudios realizados con el cangrejo *Pacifastacus astacus*, donde se observan bandas de actividad con rangos de peso molecular entre 14 a 81 kDa, algunas de éstas bandas corresponden a tripsina y quimotripsina (García-Carreño *et al.*, 1993). El estudio de inhibidores tanto *in vitro* como por medio de zimogramas en adultos de *M. carcinus* mostraron una inhibición residual de más del 80% por PMSF y SBT1, indicando la presencia de serín proteasas (García-Carreño Haard 1993); SBT1 inhibió dos bandas (45.8 y 28.5 kDa) mientras que PMSF inhibió todas las bandas de actividad proteolítica; en estudios recientes con *Artemisa longinaris* (Fernández-

Maríquez-Santos, T. *et al.* 2011. Caracterización de enzimas digestivas, digestibilidad *in vitro* y síntesis de ADNc del gen de tripsina en adultos de la pígua *Macrobrachium carcinus*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 143-171.

Giménez, *et al.*, 2002), se encontró que la tripsina tiene peso molecular con rango de 14.79 a 17.32 kDa y la quimotripsina en rango de 21.38 a 27.54k Da. En el hepatopáncreas de *P. monodon*, *P. japonicus*, *Marsopenaeus japonicus*, *P. penicillatus*, *Fenneropenaeus penicillatus*, *P. vannamei*, *Metapenaeus conoceros* y *Macrobrachium rosenbergii* el contenido de proteinasas serínicas es muy alto (Tsai *et al.*, 1986). La inhibición de la hidrólisis por PMSF, SBT1 y TLCK indica que una gran parte de la actividad proteolítica en los extractos de *M. carcinus* se da debido a la tripsina como se ha demostrado en otros estudios con la langostilla (García-Carreño & Haard, 1993), esta enzima es una de las mas importantes en los decápodos (Gates & Travis, 1969; Zwilling & Nuerath, 1981). Por otra parte, la ovoalbumina inhibió el 75% la actividad residual de las proteasas de *M. carcinus*; resultados similares se obtuvieron en larvas de el camarón blanco *L. vannamei* (Alarcón *et al.*, 2007), lo cual se explica por que el hábito alimenticio de camarones y palemónidos en su ambiente natural es principalmente omnívoro, pero con cierta tendencia al carnivorismo (Fernández *et al.*, 1987; Wikins, 1976), por lo que el uso de inhibidores proteolíticos generales, como SBT1 (que proviene de la soya) y PMSF, así como los específicos como TLCK y ZPCK, muestran que el uso de ingredientes vegetales dentro de la dieta de este tipo de organismos podría tener un efecto negativo directo al momento de ser cultivados, ya sea en engorda o para el proceso de reproducción, disminuyendo la calidad de la semilla o larvas recién eclosionadas.

Digestibilidad *in vitro*

Las técnicas de digestibilidad *in vitro* se aplican para obtener información sobre la capacidad enzimática que tiene cada especie para degradar diferentes tipos de proteínas, para realizar el seguimiento de la hidrólisis de las distintas fracciones proteínicas durante el proceso de digestión (Oña *et al.*, 2003). La información sobre el pH óptimo se utilizó en los ensayos de digestibilidad *in vitro* por que proporcionó información sobre el rango en el cual las enzimas mantienen más del 90 % de actividad. Los ingredientes que presentaron el mayor GH y porcentaje de digestibilidad fueron la harina de cerdo, la harina de sangre de res y la levadura con respecto al resto de los ingredientes probados; estos resultados son

Maríquez-Santos, T. *et al.* 2011. Caracterización de enzimas digestivas, digestibilidad *in vitro* y síntesis de ADNc del gen de tripsina en adultos de la pigua *Macrobrachium carcinus*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 143-171.

muy altos si se compara con otros crustáceos como el camarón blanco *Penaeus vannamei* (Nieto *et al.*, 2005), en donde el grado de hidrólisis de los ingredientes estudiados mostró un rango de 36.8 a 64.16 %; o con *Penaeus monodon* (Syama *et al.*, 2003), donde el porcentaje de digestibilidad con diferentes dietas fue de 69.9 %. El porcentaje de hidrólisis de *M. carcinus* es similar a *Penaeus notialis* (Galindo *et al.*, 2001), el cual presentó un GH de 90.07 % con ingredientes que contenían 40% de proteína cruda.

En este sentido, se observó que la mayoría de los ingredientes obtuvieron una digestibilidad incluso por encima del 100 %, estos resultados muestran la alta capacidad que tiene *M. carcinus* de digerir tanto ingredientes de origen animal como ingredientes de origen vegetal. Los valores de GH altos que presenta *M. carcinus* sugieren que las proteínas de estos ingredientes son más fácilmente digeribles por esta especie en comparación con otras especies de crustáceos ya estudiados, por lo que esta especie puede ser un excelente candidato para lograr desarrollar un alimento para su reproducción, sin que haya necesidad de crear alimentos en relación a los sexos al presentar una capacidad digestiva similar entre ellos. Cabe resaltar que los ingredientes con mayor digestibilidad pueden ser los mejores candidatos para la elaboración de dietas específicas y con ello lograr la óptima reproducción de *M. carcinus*, puesto que entre mayor sea la digestibilidad mayor será la eficiencia alimenticia (Cruz-Suárez, 2002). También es importante tomar en cuenta que el uso de alimentos balanceados con un adecuado contenido de nutrientes puede mejorar la producción de esta especie e incrementar las utilidades.

La harina de pescado además de presentar una de las digestibilidades más bajas, se sabe que su uso en la fabricación de alimentos para crustáceos afecta los costos de producción puesto que es una materia prima que se debe importar y además del fuerte impacto que causa sobre la calidad de las aguas (Naylor *et al.*, 2000).

Síntesis de ADNc del gen de tripsina

En este estudio se obtuvo una secuencia de ADNc de 816 pb a partir del hepatopáncreas de *M. carcinus*, utilizando oligonucleótidos diseñados para el gen de tripsina de diversos crustáceos e invertebrados. La existencia de un precursor de tripsina de *M. carcinus*

Maríquez-Santos, T. *et al.* 2011. Caracterización de enzimas digestivas, digestibilidad in vitro y síntesis de ADNc del gen de tripsina en adultos de la pigua *Macrobrachium carcinus*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 143-171.

sostiene la idea de que las proteasas digestivas son sintetizadas como zimógenos en las células B (Gibson & Barker 1979) este mismo resultado se obtuvo al sintetizar ADNc de tripsina del hepatopáncreas de *L. vannamei* y *Pacifastacus leniusculus*. Las uniones disulfuro (Cys) son característicos de las serín proteasas de los invertebrados (Klein *et al.* 1996). La tripsina de *M. carcinus* aparentemente no presenta estos residuos, aspecto que se presenta también en el tripsinógeno de *P. leniusculus* y la tripsina de *Astacus fluviatilis* (Titani *et al.*, 1983); esto respalda lo sugerido por Rypniewski *et al.* (1994) que indican que las uniones disulfuro no son esenciales, aunque si pueden mejorar la actividad enzimática. Se realizó un alineamiento múltiple con secuencias de tripsina de otros organismos obtenidos de la base de datos del GeneBank confirmando que la secuencia de ADNc obtenida para *M. carcinus* que codifica un gen de tripsina. Posteriormente, a esta secuencia se le realizó un análisis de similitud, el cual reveló que existen valores bajos (18 a 24%) comparado con las secuencias de *P. trituberculatus*, *E. carinicauda*, *M. ensis*, *F. chinensis*, *P. clarkii*, *L. salmonis*, *L. vannamei*, *D. melanogaster*, *A. mellifera* y *A. gambiae*. Este hecho indica que el gen de tripsina es diverso entre los crustáceos y que tal diversidad esta relacionada con la variedad de las funciones biológicas (Muhlia-Almazan *et al.*, 2003) además de aparentemente ser diferente en crustáceos de la familia Palemonidae con relación a otras familias de crustáceos.

El dendograma de alineación de *M. carcinus* sugiere que existe una relación más cercana del gen de tripsina de *M. carcinus* con algunos insectos como *A. mellifera*, *D. melanogaster* y *A. gambiae* (Fig. 5) en comparación con crustáceos peneidos, indicando que el gen de tripsina de *M. carcinus* tiende a ser más ancestral como una posible respuesta a adaptaciones biológicas por el ambiente. Una de estas adaptaciones podría ser la alta estabilidad del la tripsina de *M. carcinus* a temperaturas altas y pH muy bajos (Manríquez-Santos, 2009) en relación a la tripsina de crustáceos (Muhlia-Almazan *et al.*, 2003). Estas diferencias pueden deberse a que es una especie que cubre su ciclo de vida tanto en ambientes dulceacuícolas como salobres de zonas costeras, donde se reproduce y la larva tiende a alimentarse de una gran diversidad de plancton hasta pasar a la etapa de postlarva y

cambiar su hábito alimenticio a tipo omnívoro, lo que ocasiona que provoca que sus enzimas digestivas puedan ser atípicas.

Desde el punto de vista de la fisiología digestiva en crustáceos la tripsina es una de las proteasas de mayor importancia ya que representa por si sola el 60% de la actividad proteásica del hepatopáncreas. Es de esta forma, que el conocimiento de su función en la hidrólisis de los aminoácidos esenciales durante la digestión de los crustáceos podría ayudar a resolver el problema de la calidad de las proteínas que se utilizan en la elaboración de alimentos balanceados (Cruz-Suárez *et al.*, 2007).

Conclusiones

Las proteasas digestivas de *M. carcinus* son tolerantes a pH neutro y alcalino. La alta tolerancia de las proteasas a pH ácido se debe a la presencia de una enzima ácida que aún no ha sido estudiada detalladamente en otras especies de decapados. Los altos porcentajes de inhibición por la presencia de PMSF Y SBT1 indican la presencia de serín proteasas y que una gran parte de la actividad proteolítica se da debido a la tripsina, lo cual ha sido detectado en otros crustáceos. Los estudios de caracterización enzimática pueden contribuir al diseño de dietas adecuadas para la reproducción y cultivo intensivo de *M. carcinus*, con la posibilidad de disminuir el costo al usar ingredientes adecuados en la formulación, seleccionados en base a la fisiología digestiva de esta especie.

Los mejores porcentajes de digestibilidad fueron obtenidos por las harinas de cerdo, harina de sangre de res y la levadura de panadería; sin embargo, el ingrediente que mayor cantidad de aminoácidos libres totales presentó fue el hidrolizado de pescado, por lo cual son ingredientes que pudieran ser usados como base para crear una dieta para la reproducción de esta especie, aunque su uso efectivo tendría que ser evaluado en condiciones reales de cultivo.

La obtención de una secuencia de ADNc de tripsina de 816 pb a partir del hepatopáncreas de *M. carcinus* codifica para una proteína de 272 aminoácidos, siendo diferente a las

Maríquez-Santos, T. *et al.* 2011. Caracterización de enzimas digestivas, digestibilidad in vitro y síntesis de ADNc del gen de tripsina en adultos de la pigua *Macrobrachium carcinus*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 143-171.

secuencias de otros crustáceos, lo cual puede responder a las diferencias en los hábitos alimenticios de esta especie a lo largo de su ciclo de vida y a las adaptaciones morfofisiológicas en relación a los diversos ambientes donde habita.

Agradecimientos

La autora agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México por la beca otorgada para la realización de los estudios.

Bibliografía

- Albuquerque, C., F. García-Carreño, M. Navarrete del Toro. 2002. Trypsin and trypsin inhibitors from *Penaeid shrimp*. *J. Food Biochem.* 226, 233–251.
- 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, IPN-CICIMAR. 180 p.
- Ásgeirsson, B., R. Hartemink & J. F. Chlebowski. 1995. Alkaline phosphatase from atlantic cod *Gadus morhua*. Kinetic and structural properties which indicate adaptation to low temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.* 110B, 315-329.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brockhoff, H., R. J. Hoyle & P. C. Hwang. 1970. Digestive enzymes of the American lobster *Homarus americanus*. *J. Fish Res. Board Can.* 27, 1357–1370.
- Celis-Guerrero, L. E., F. L. García-Carreño, & M. A. Navarrete del Toro. 2004. Characterization of proteases in the digestive system of spiny lobster *Panulirus interruptus*. *Mar. Biotechnol.* 6, 262–269.
- Ceccaldi, H. J. 1997. Anatomy and physiology of the digestive system. En *Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture, 1997 Vol. 6* (Ed. By D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. & Akiyama, D.M.). World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. USA. pp 261-291.
- Chace, F. A. & H. H. Hobbs. 1969. The freshwater and terrestrial decapod crustaceans of the West Indies with special reference to Dominica. *U.S. Natn. Mus. Bull.* 292, 1-258.
- Choudhury, P.C. 1971. Responses of larval *Macrobrachium carcinus* (L.) to variations in salinity and diet (Decapoda, Palaemonidae). *Crustacean.* 20, 113-120.
- Cohen T., Gertler A. (1981). Pancreatic proteolytic enzymes from *Cyprinus carpio* I. Purification and physical properties of trypsin. Chymosin, elastase and carboxypeptidase B. *Comparative Biochemistry and Physiology* 69 B, 647-653.
- Covich, A. P., T. A. Crawl, B. B. Yoshioka & M. S. Wright. 2003. Ecological factors determining the distribution of the omnivorous river shrimp *Macrobrachium carcinus*, in Puerto Rico. 08 Presented at the NABS Annual meeting, Athens, Georgia, in *Tropical Stream Ecology II*. <http://www.benthos.org/database/allnabstracts.cfm/db/Athens2003abstracts/id/1>
- Debrot, A. O. 2003. The freshwater shrimps of Curacao, West Indies (Decapoda, Caridea). *Crustaceana* 76 1, 65-76.
- Díaz-Tenorio, L. M., F. L. García-Carreño & M. A. Navarrete del Toro. 2006. Characterization and comparison of digestive proteinases of the Cortez swimming crab, *Callinectes bellicosus*, and the arched swimming crab, *Callinectes arcuatus*. *Invertebrate Biology* 125 2, 125–135.

- Dunn, B. M. 1989. Determination of protease mechanism. pp. 57-81. En: R.J. Beynon y J.S. Bond (Eds.). *Proteolytic Enzymes: A practical approach*. I.R.L. Press, Oxford, England.
- Escamilla-Treviño L. L. 2002. Producción de tripsina del camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) en *Pichia pastoris*. Tesis de Doctorado en Ciencias con especialidad en Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., Monterrey, N.L., México.
- Fernández Giménez, A. V., F. L. García-Carreño, M. A. Navarrete del Toro & J. L. Fenucci. 2002. Digestive proteinases of *artemisa longinaria* (decapoda, penaeidae) and relationship with molting. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 132, 593-598.
- Forhman, M.A., Dush, M.K. y Marti, G.R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85, 8998-9002.
- Galgani F. G., Benyamin Y., Van Wormhoudt A. (1985) Purification, properties and immunoassay of trypsin from the shrimp *Penaeus Japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 81B, 447-452.
- Gates B. J., Travis J. (1969) Isolation and comparative properties of shrimp trypsin (*Penaeus setiferus*) *Biochemistry* 8, 4483-4489.
- Gibson. R. y Barker, P.L. 1979. The decapod hepatopáncreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Annual Reviews*. 17, 285-346.
- Guerrero-Olazarán M., Viader-Salvado J. M. (2003). *Pichia pastoris* como hospedero para la producción de proteínas recombinantes. In: *Procesos Biotecnológicos*. (Ed. By Galan-Wong L. J., Elias-Santos M., Tamez-Guerra P., Quintero-Ramírez R., Quintero-Zapata I.), pp. 136-156. Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolás de los Garza.
- Guerrero-Olazarán, M. Rodríguez-Blanco, L. Viader-Salvado, JM. 2007. Producción de una Fitasa recombinante en *Pichia pastoris*. *CIENCIA UANL* 10 (4), 413-418.
- Galgani, F. & F. Nagayama. 1987. Digestive proteinases in the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B, 889-893.
- García-Carreño, F.L. 1992. Protease inhibition in theory and practice. *Biotechnol. Education* 3, 145-150.
- García-Carreño, F. L., L. E. Dimes & N. F. Haard. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214, 65-69.
- García-Carreño, F. L., M. A. Navarrete del Toro, J. M. Ezquerro. 1997. Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility in Vitro: I. The effect of protease inhibitors in protein ingredients. *J. Mar. Biotech.* In press.
- García-Carreño, F. L., M. P. Hernández-Cortes, & N. Haard. 1994. Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive system of fresh water and a marine decapod. *J Agric Food Chem* 42, 145-146.
- Gillet, C. 1984. Population of the prawn and fish in the Guadalupe River (West Indies), some dates on their distribution on biology. *Rev. Hydrobiol. Trop.* 16, 327-340.
- Maríquez-Santos, T. *et al.* 2011. Caracterización de enzimas digestivas, digestibilidad in vitro y síntesis de ADNc del gen de tripsina en adultos de la pigua *Macrobrachium carcinus*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), *Avances en Nutrición Acuicola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuicola*, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 143-171.

- Glass, H. J. & J. R. Stark. 1994. Protein digestion in the European lobster, *Homarus gammarus* (L.). *Comp. Biochem Physiol* 108b, 225-235.
- Graziani, C. A., M. de Donato & K. S. Chung. 1995. Salinidades óptimas en larvas y postlarvas de *Macrobrachium carcinus* (L.) (Decapoda: Palaemonidae). *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela* 34, 33-40.
- Graziani, C. A., K. S. Chung & M. de Donato. 1993. Comportamiento reproductivo y fertilidad de *Macrobrachium carcinus* (Decapoda: Palaemonidae) en Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* 41, 657-665.
- Hernández-Cortés, P., J. Whitaker & F. García-Carreño. 1997. Purification and characterization of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *J. Food Biochem.* 21, 497-510.
- Hernández-Cortés, P., Corenious, L. García-Carreño, L.F., Söderhäll, K. (1999) Trypsin from *Pacifastacus leniusculus* hepatopáncreas: Purification cDNA Cloning of syntetized zymogen. *Biol. Chem.* 380, 499-501.
- Klein, B., Le Mullac, G., Sellos, D., and Van Wormhoudt, A. 1996. Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Use in assessing gene expression during the moult cycle. *Int J. Cell Biol.* 28, 551-563.
- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *J. Gen. Physiol.* 30, 291-310.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lehninger, A., Nelson, D.L., Cox, M.M. 2008. Principles of Biochemistry. W.H. Freeman, E.U.A. 1119 pp.
- Manríquez-Santos, T. 2009. Caracterización de enzimas digestivas y digestibilidad in vitro de adultos de la pigua *Macrobrachium carcinus*. Tesis de Licenciatura en Biología de la Universidad del Mar, Puerto Escondido, Oax., México
- Maroux, S., Baratti, J., Desnuelle, P. 1971 *J. Biol. Chem.* 246, 5031-5039.
- Muhlia-Almazan, A. y García-Carreño, F. L. 2003. Digestion physiology and proteolytic enzymes of crustacean species of the Mexican Pacific Ocean. *Contributions to the study of East Pacific Crustaceans* 2, 77-91.
- Rudenskaya, G. N., Kislitsin, Y. A. y Rebrikov, D. 2004. Collagenolytic serine protease PC and trypsin PC from king crab *Paralithodes camtschaticus*: cDNA cloning and primary structure of the enzymes. *BMC structural Biology*, 4. <http://www.biomedcentral.com/1472-6807/4/2>
- Rypniewski W. R., Perrakis, A., Vorgias, C. E. and Wilson, K. S. Evolutionary divergence and conservation of trypsin. *Protein Engineering*, 7, 57-64.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) Gel electrophoresis of DNA en: Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (Eds.) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Salvensen, G. & H. Nagase. 1989. Inhibition of proteolytic enzymes. pp. 83-104. En: R. Beynon and J.S. Bond (Eds.). *Proteolytic enzymes*. IRL Press Oxford. UK.

- Stauffer C. 1989. Effect of pH on activity. In: Van Nostrand Reinhold, editor. Enzyme assay for food scientists. New York: AVI Press. p 61–76.
- Stryer, L., J. M. Berg & J. L. Tymoczko. 2003. Bioquímica. 5ª ed. México. P. 209.
- Sudaryono, A., E. Tsvetnenko & L. H. Evans. 1999. Evaluation of potential of lupin meal as an alternative to fish meal in juvenile *Penaeus monodon* diets. *Aquacult Nutr* 5,277–285.
- Titani, K., Sasagawa, T., Woodbury, R. G., Ericsson, L. H., Dorsam, H., Kraemer, M., Neurath, H. y Zwillig, R. 1983. Aminoacid sequence of crayfish (*Astacus fluviatilis*) trypsin I. *Biochemistry*. 22, 1459-1465.
- Tsai, I., K. Chuang & J. Chiang. 1986. Chymotripsins in digestive tracts of crustacean decapods (Shrimps). *Comp. Biochem. Physiol.* 85B, 235-239.
- Tsai I. H., Lu P., Chuang J. L., (1991) The midgut enzymes of shrimp *Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus penicillatus*. *Biochemica Biophysica* 1080, 59-67.
- Walsh K. (1970) Trypsinogens and trypsins of various species. *Methods in Enzymology* 19, 41-63.
- Vega-Villasante, F., I. Fernández, R. M. Preciado, M. Oliva, D. Tovar Ramírez & H. Nolasco. 1999. The activity of digestive enzymes during the molting stages of the arched swimming *Callinectes arcuatus* Ordway, 1863. *Bulletin of Marine Science* 65, 1-10.
- Walter, H. E. 1984. Proteinases methods with haemoglobin, casein and azocell as substrates. En: *Methods of enzymatic Analysis*. H. J. Bergmeyer (eds) V: 270-277. Verlag Chemie. Weinheim, Alemania.
- Wikins, J. F. 1976. Prawn biology and culture. En Barnes, H. (ED) Aberdeen University Press. Oceanographic. *Mar. Biol. Ann. Rev.* 1, 435-507.
- Zwillig, R. H. & Neurath, H. 1981. Invertebrate proteases. *Methods Enzymol.* 80, 633-664
- <http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3> www.cgi
- <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>
- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>