

Evaluación bioquímica de proteasas y lipasas presentes en intestino de *Balistes capriscus*

Alberto de Jesús Figueroa Castillo, Mónica Noel Sánchez González, Santiago Moisés Gallegos Tintoré*

Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Periférico Norte Kilómetro 33.5.
Tablaje Catastral 13615. Chuburná de Hidalgo Inn. Mérida, Yucatán, CP 97302.

Fecha de recepción: 25 de octubre de 2021 - Fecha de aceptación: 26 de enero de 2022

Resumen

En Yucatán existen diferentes especies acuáticas de alto valor comercial que son capturadas con fines alimenticios. Durante su procesamiento se generan grandes cantidades de residuos que actualmente son poco aprovechados, entre los que se encuentran las vísceras. Éstas contienen enzimas, como lipasas y proteasas con diversas aplicaciones a nivel industrial. En el presente trabajo se realizó una evaluación bioquímica de estas enzimas, mediante ensayos cualitativos y electroforéticos utilizando un extracto del intestino medio de *Balistes capriscus*, especie comercializada en la región. Los ensayos cualitativos fueron realizados en cajas Petri con agar leche descremada a pH 8 para la detección de proteasas y con agar aceite de oliva y rodamina b para las lipasas. Después de 24 h de incubación, se detectó un halo de claridad producido por las proteasas al actuar sobre la caseína de la leche; sin embargo, no se detectó actividad lipolítica. Mediante electroforesis SDS-PAGE se detectaron dos proteínas con pesos moleculares estimados de 21.3 y 24.9 kDa. El zimograma proteolítico mostró dos bandas de actividad con peso molecular aproximado de 25 y 35 kDa. Estas bandas de actividad mostraron relación con las bandas de proteína por lo que las proteasas detectadas son las principales proteínas presentes en el extracto del intestino. Las características de las enzimas identificadas sugieren la presencia de proteasas tipo tripsina. A partir de lo anterior, se concluye que el intestino de *Balistes capriscus* podría ser una fuente de proteasas y se requieren más estudios para determinar su potencial de aplicación a nivel industrial.

Palabras clave: *Balistes capriscus*, intestino medio, proteasas, lipasas, actividad enzimática.

Biochemical evaluation of proteases and lipases in the intestine of *Balistes capriscus*

Abstract

In Yucatan there are different aquatic species of high commercial value, captured for food purposes. During processing, high amounts of underutilized residues like viscera are generated. Viscera contains enzymes with diverse industrial applications, such as lipases and proteases. In the present work, enzymes from the middle intestine of *Balistes capriscus*, a species traded in the region, were biochemically evaluated using qualitative and

*santiago.gallegos@correo.uady.mx

electrophoretic assays. Qualitative tests were conducted in Petri dishes with skim milk agar at pH 8 for protease detection and with olive oil agar and rhodamine b for lipases. After 24h of incubation, clear zones indicative of protease activity, were observed over the casein milk agar; however, the lipolytic activity was not detected. SDS-PAGE analysis of the enzyme extract, showed only two bands with estimated molecular weight of 21.3 and 24.9 kDa. The proteolytic zymogram also showed two bands of activity with approximate molecular weights of 25 y 35 kDa. The bands of activity were related to the protein bands indicating that proteases were the main proteins present in the intestine extract. The characteristics of the enzymes detected, suggested the presence of trypsin-like proteases. Based on the results obtained, it is concluded that the intestine of *Balistes capriscus* is a potential source of proteases and further studies are required to determine the prospective industrial application.

Key words: *Balistes capriscus*, midgut, proteases, lipases, enzymatic activity

Introducción

A nivel mundial, cada año se capturan más de 91 millones de toneladas de pescados y mariscos. De este total, aproximadamente el 20% corresponden a subproductos (vísceras, exoesqueleto, escamas, piel), actualmente empleados para la producción de harina de pescado, utilizada en la fabricación de alimentos balanceados para animales monogástricos. Sin embargo, las vísceras tienen potencial biotecnológico ya que son fuente de enzimas digestivas, especialmente proteasas y lipasas. Las lipasas se encuentran en diversas especies animales, vegetales y microbianas. Poseen alta acilo-especificidad y regio-selectividad, lo cual las convierte en enzimas de amplia versatilidad al momento de llevar a cabo modificaciones de aceites y grasas. Son atractivas para la industria alimentaria, farmacéutica, biocombustibles y detergentes (Martínez, 2012). Por otro lado, las proteasas se obtienen de fuentes animales, vegetales, bacterianas o fúngicas. Poseen gran importancia biológica debido a su participación en procesos fisiológicos, así como en el recambio proteínico. Destacan por su uso en industrias tales como la de alimentos, bebidas, peletera, farmacéutica, médica, de detergentes, entre otras (Kamal et al. 2017). Otra aplicación de importancia

es en la preparación de moléculas de interés industrial tales como péptidos bioactivos, colágeno y gelatina, entre otras (García et al. 2020). Las proteasas, en el mercado mundial de enzimas representan aproximadamente el 60% de la venta total.

Balistes capriscus es una especie de pez de la familia Balistidae en el orden de los Tetraodontiformes. Es conocido también como Grey triggerfish, pez ballesta y pez puerco, entre otras denominaciones. De acuerdo con la Carta Nacional Pesquera de 2017 (CNP), *Balistes capriscus* es una especie asociada a la categoría de huachinango y pargos del Golfo de México y Mar Caribe. El alto valor comercial de este pez se debe a que la carne es muy apreciada por los consumidores locales, lo que genera un aumento en su captura. Es un pez de gran importancia económica en Yucatán debido a que su carne posee demanda media; sin embargo, los subproductos de procesos (vísceras, esqueleto, piel) se destinan a la elaboración de harina de pescado.

El presente trabajo tiene por objetivo evaluar la actividad de las proteasas y lipasas presentes en el intestino de *B. capriscus* mediante el uso de ensayos cualitativos y electroforéticos. Estas enzimas podrían ser empleadas en el futuro

a nivel industrial, generando productos de valor agregado, lo cual podría reflejarse en un beneficio para la comunidad.

Metodología

Obtención del extracto crudo enzimático

Para los ensayos se utilizó una muestra representativa del intestino medio de *Balistes capriscus*, capturado en la costa de Yucatán. Para la preparación de extractos, se pesó 1 g de intestino y se suspendió en 100 mL de buffer de extracción (25 mM Tris-HCl y 150 mM NaCl, pH 8). Posteriormente el tejido fue homogenizado durante 2 min (homogeneizador HG-15D WiseTis) a 12,500 rpm. El extracto se dividió en dos porciones, la primera se utilizó para medir actividad lipolítica, por lo que se añadieron 700 µL de un inhibidor de proteasas (isopropanol 71.25% v/v, 11.5 mL EDTA 1 mM y 491 mg PMSF 100 mM). La otra muestra sin inhibidor, fue utilizada para la determinación de actividad proteolítica. Los homogenizados con y sin inhibidor se centrifugaron a 19,319 x g. El sobrenadante de cada muestra se transfirió a tubos eppendorf y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas totales en el extracto enzimático se realizó de acuerdo con la metodología de Bradford (1976).

Ensayos cualitativos para detectar actividad proteolítica

La detección cualitativa de actividad proteolítica se realizó usando placas de agar (2.5 p/v), a pH 8 (buffer 25 mM Tris-HCl y 150 mM NaCl), suplementadas con 1% (p/v) de leche descremada (Svelty. Nestle) usando el método propuesto por Sarner et al. (1971). El ensayo se inició agregando 10 µL del extracto del intestino de *Balistes capriscus* (0.554 mg proteína) e incubando

a 37 °C por 24 h. La determinación de la actividad proteolítica se identificó por un halo de hidrólisis que modificó el color original de la mezcla de agar y leche descremada.

Ensayos cualitativos para detectar actividad lipolítica

La actividad lipolítica se determinó cualitativamente usando el método de Kouker y Jaeger. (1987). Se prepararon placas de agar con aceite de oliva y rodamina b al 0.02% (p/v) a pH 8 (buffer 25 mM Tris-HCl y 150 mM NaCl). Para el ensayo se utilizaron 10 µL del extracto enzimático de intestino de *Balistes capriscus* con inhibidor de proteasas (0.554 mg proteína) y se incubó a 37 °C por 48 h. La actividad lipolítica fue detectada con la presencia de halos fluorescentes bajo luz UV (350 nm). Como control positivo, se empleó la lipasa microbiana Amano PS (*Burkholderia cepacia*) (Sigma-Aldrich cat. 534641) MDL:MFCD02685894.

Determinación del peso molecular

El análisis electroforético SDS-PAGE se realizó mediante el método propuesto por Laemmli (1970), utilizando un gel separador al 12%. Los extractos (0.554 mg de proteína) fueron diluidos a la mitad con buffer de carga (0.125 M Tris HCl pH 6.8. 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol SIGMA 97662), y la mezcla se calentó durante 10 min a 95 °C. Se utilizó un marcador de bajo peso molecular (BIORAD®, Cat: 161-0305) para la determinación de pesos moleculares estimados. La electroforesis se desarrolló a un amperaje constante de 35 mA durante 90 min (Mini Protean III BIORAD®) a 4 °C. Los geles se tiñeron durante 30 minutos en la solución colorante (0.125% azul de coomassie R-250, 50% metanol, 10% ácido acético). Posteriormente, el gel se colocó durante 30 minutos en la solución

decolorante (10% ácido acético glacial, 40% metanol y 50% agua), se hidrató en agua y finalmente se digitalizó.

Determinación de la actividad proteolítica en zimogramas

Para la determinación por zimografía de proteasas se copolimerizó grenetina al 0.2% (p/v) en un gel de poliacrilamida al 12%. Debido a que las muestras se encontraban muy concentradas, se realizó una dilución, 1:50 (extracto enzimático: agua destilada). Se tomaron 10 μ L de muestra y se homogenizaron con 10 μ L de buffer de carga (0.125 M Tris HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercapto etanol). En el gel, se cargaron 10 μ L (1.1082×10^{-3} mg de proteína) de la muestra diluida. Las corridas se realizaron a un amperaje constante de 35 mA (Mini Protean III® BIORAD®) a 4°C y se incubó en buffer (25 Mm Tris-HCl y 150 Mm NaCl, pH 8) a 55°C por 12 horas. Los geles fueron teñidos con la solución

colorante para zimogramas proteolíticos (0.5% de azul Coomassie R-250, 25% 2-propanol, 25% metanol, 10% ácido acético) para determinar halos de claridad relacionados con actividad proteolítica.

En la determinación de la actividad lipolítica mediante zimografía, 10 μ L de muestra (0.554 mg de proteína) se diluyeron con 10 μ L de buffer de carga. El gel obtenido se colocó sobre una placa de agar con aceite de oliva y rodamin b a pH 8 durante 1 hora (Choi et al., 2009).

Resultados

Ensayo cualitativo para determinar actividad proteolítica

La actividad proteolítica fue detectada por la aparición de un halo transparente alrededor de la muestra a 24 h posteriores de la incubación, se observó un halo de 1.9 mm de diámetro (Fig. 1).



Figura 1. Detección de actividad proteolítica en el extracto enzimático de intestino de *Balistes capriscus* utilizando agar y leche descremada como sustrato (Sarner et al. 1971)

Ensayo cualitativo para determinar actividad lipolítica

En la Figura 2 se presentan los resultados del ensayo cualitativo de actividad lipolítica tanto del extracto enzimático de *B. capriscus*, como de la lipasa comercial

Amano PS. Posterior a las 24 h de incubación no se detectó actividad lipolítica el extracto enzimático (Fig. 2-A), mientras que en el control positivo se apreció la presencia de fluorescencia naranja resultado de la actividad lipolítica (Fig. 2-B).

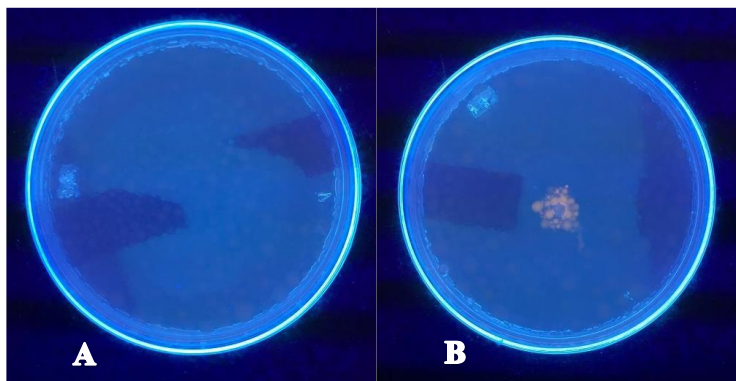


Figura 2. Detección de actividad lipolítica utilizando una placa de aceite de oliva como sustrato y rodamina b; (A): extracto enzimático de intestino de *Balistes capriscus*, (B): Lipasa comercial (Kouker y Jaeger. 1987)

Análisis electroforético de las proteínas presentes en los extractos

Se analizaron las proteínas del extracto enzimático de *B. capriscus* mediante SDS-

PAGE (Fig. 3). Se identificaron dos bandas con peso molecular estimado de 21.3 kDa y 24.9 kDa. Estas bandas fueron las más abundantes en el extracto enzimático.

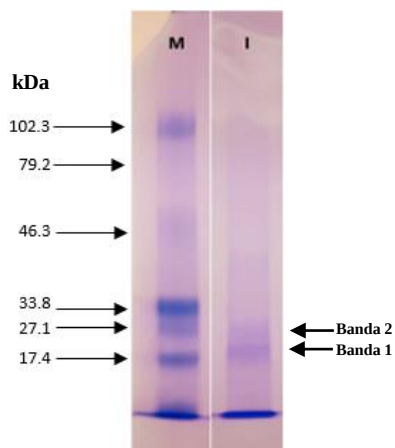


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% del extracto enzimático de *Balistes capriscus*. (M): Marcador molecular; (I): Extracto del intestino medio

Ensayo cualitativo para determinar actividad proteolítica en zimograma

Se analizó la actividad proteolítica mediante un zimograma, en el cual se observan

proteínas con actividad proteasa. Las bandas tienen una migración cercana a las bandas detectadas en el SDS-PAGE. En este caso, las bandas correspondieron a un peso molecular estimado de 25 y 35 kDa (Fig. 4).

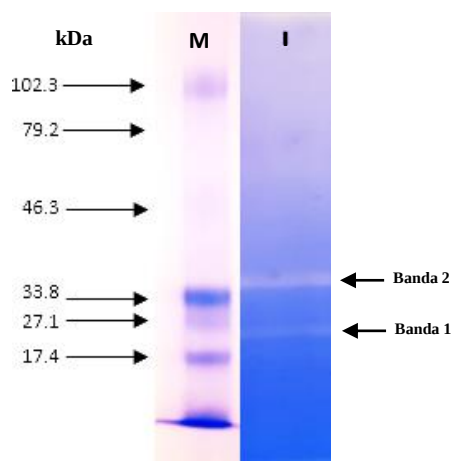


Figura 4. Zimograma de proteasas. Extracto enzimático de intestino de *Balistes capriscus*. (M): Estándar de PM, (I): Muestra de proteasa, Dilución 1:50

Discusión

Se identificó la formación de un halo de 1.9 mm de diámetro en el agar leche descremada después de 24 h de incubación con el extracto enzimático de *Balistes capriscus*, el cual está relacionado con la presencia de proteasas. La formación del halo de hidrólisis para detectar actividad proteasa en intestino ha sido reportada por diversos autores (Balaji N et al., 2012; Thankappan et al., 2015) para especies similares empleando periodos de incubación de entre 24 y 48 h, a pH 8. Balaji et al. (2012) identificaron actividad proteolítica en intestino de carpa común (*Cyprinus carpio*) después de 48 h a una temperatura entre 35 y 40 °C, no se reportó el tamaño del halo. Thankappan et al. (2015) realizaron un estudio sobre intestino medio de rohu (*Labeo rohita*) en donde se identificó una intensa actividad proteasa por la aparición de halos de entre 6 y 7 mm después de 48 h de incubación a 37 °C.

La ausencia de actividad lipolítica en el extracto de intestino medio de *Balistes capriscus* a pH 8 es comparable a lo reportado para otras especies como la

sardina (Sahnouni et al. 2012) y el yaque (Gutiérrez y Zapata 2019).

El análisis electroforético del extracto enzimático de intestino medio de *B. capriscus* mostró principalmente dos bandas con peso molecular estimado de 21.3 y 24.9 kDa, valores similares a las reportadas por Jellouli et al. (2009) en su estudio sobre una nueva tripsina alcalina del intestino de *Balistes capriscus*. En otros peces también se han reportado bandas con pesos moleculares en el mismo intervalo. González et al. (2020) en su artículo sobre la caracterización de la actividad de la tripsina y lipasa a partir del intestino de corvina del golfo (*Cynoscion othonopterus*) reportaron bandas con un peso molecular estimado de 14 y 22 kDa. Por otra parte, Merino (2018) en su análisis electroforético de proteasas alcalinas producidas en el intestino de sargo chopo (*Archosargus probatocephalus*) reportó bandas con peso molecular de 21.2, 27.8, 34.9 y 51.3 kDa. La presencia abundante de estas bandas, indica que son las principales proteínas presentes en el intestino del pez.

Los pesos moleculares estimados de las bandas detectadas en el zimograma (25 y 35

kDa), son cercanos a las bandas de proteína detectadas en SDS-PAGE. La diferencia en los pesos moleculares estimados, puede deberse a que en los zimogramas no se utilizó β -mercaptoetanol, lo cual puede modificar el PM de las proteínas que contienen puentes disulfuro (Romero, 2008).

La presencia de actividad lipolítica en intestino medio parece depender de cada especie, las dietas, lugares y tiempo de captura, debido a que en especies como Lisa dorada (*Liza aurata*) y el yaque (*Leiarius marmoratus*) se ha encontrado actividad lipolítica, aunque en bajos niveles.

Es necesario realizar más estudios para caracterizar las enzimas y determinar su potencial de aplicación en procesos industriales.

Conclusiones

El intestino medio de *Balistes capriscus* contiene proteasas activas a pH 8, estas enzimas correspondieron a las bandas más abundantes presentes en el extracto enzimático crudo por lo que los resultados obtenidos indican que las vísceras de *B. capriscus*, podrían ser una fuente de enzimas proteolíticas.

Reconocimientos

A la Facultad de Ingeniería Química de la UADY por las facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo, así como al personal del laboratorio de Microbiología y Biotecnología. A la empresa Fuentes Seafood por proporcionar las muestras.

Referencias

- Balaji N, Rajasekaran K M, Kanapandian N, Vignesh V, & Thirumurugan R. (2012). Isolation and screening of proteolytic bacteria from freshwater Fish *Cyprinus carpio*. "International Multidisciplinary Research Journal", 6, 56–59.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. "Analytical Biochemistry", 72(1–2), 248–254.
- Choi, N. S., Choi, J. H., Kim, B. H., Han, Y. J., Kim, J. S., Lee, S. G., & Song, J. J. (2009). Mixed-substrate (glycerol tributyrates and fibrin) zymography for simultaneous detection of lipolytic and proteolytic enzymes on a single gel. "Electrophoresis", 30(12), 2234–2237.
- García-Sifuentes, C. O., Scheuren-Acevedo, S. M., & Zamorano-Apodaca, J. C. (2020). Exploring different by-products considered as residues by the fishery industry in México. "Biotecnia", 22(2), 61–69.
- González-Félix, M. L., De, C., Reé-Rodríguez, L., Perez-Velazquez, M., & Donaldo Colosio, L. (2020). Partial characterization, quantification and optimum activity of trypsin and lipase from the sciaenids *Cynoscion othonopterus*, *Cynoscion parvipinnis* and *Cynoscion xanthulus*. "Arch Biol Sci", 72(1), 81–93.

- Gutiérrez Espinosa, M. C., & Zapata Berruecos, B. E. (2019). Perfil enzimático digestivo de *Leiarius marmoratus* (Siluriformes: Pimelodidae) en el medio natural. "Revista Politécnica", 15(28), 76–84.
- Jellouli, K., Bougatef, A., Daassi, D., Balti, R., Barkia, A., & Nasri, M. (2009). New alkaline trypsin from the intestine of Grey triggerfish (*Balistes capriscus*) with high activity at low temperature: Purification and characterisation. "Food Chemistry", 116(3), 644–650.
- Kamal, S., Rehman, S., & Iqbal, H. M. N. (2017). Biotechnological valorization of proteases: From hyperproduction to industrial exploitation—A review. "Environmental Progress & Sustainable Energy", 36(2), 511–522.
- Kouker, G., & Jaeger, K. E. (1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. "Applied and Environmental Microbiology", 53(1), 211–213.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. "Nature", 227(5259), 680–685.
- Martínez Pérez, R. B. (2012). "Lipasas digestiva e intracelular de *Penaeus vannamei*. Especificidad y actividad en presencia de surfactantes". Tesis de maestría, Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C. La paz, Baja California Sur, México.
- Merino Contreras, M. de la L. (2018). "Fisiología digestiva de larvas y juveniles de sargo *Archosargus probatocephalus* (perciformes: sparidae)". Tesis de doctorado, Instituto de ciencias marinas y pesquerías. Veracruz, México.
- Romero García, A. (2008). "Estudio reológico y microestructural de emulsiones y geles de concentrados proteicos de cangrejo". Tesis doctoral, Universidad de Sevilla. Sevilla, España.
- Sahnouni, F., Matallah-Boutiba, A., & Zitouni, B. (2012). Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of marine fish in the Oran Algeria coast. "African Journal of Microbiology Research", 6(13), 3125–3133.
- Sarner, N. Z., Bissell, M. J., Di Girolamo, M., & Gorini, L. (1971). Mechanism of excretion of a bacterial proteinase: demonstration of two proteolytic enzymes produced by a *Sarcina* strain (Coccus P). "Journal of Bacteriology", 105(3), 1090–1098.
- Thankappan, B., Dharmaraj, R., Ramkumar, S., Natarajaseenivasan, K., & Anbarasu, K. (2015). Characterization of *Bacillus* spp. From the Gastrointestinal Tract of *Labeo rohita*. Appl "Biochem Biotechnol", 340–353.