

SECRETARIA
DE
EDUCACION PUBLICA

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE
CIENCIAS MARINAS
BIBLIOTECA
I.P.N.
DONATIVO

PROTEASAS DIGESTIVAS DE JUVENILES DE
ABULÓN AZUL *Haliotis fulgens* (Philippi, 1845)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Cecilia Picos García

LA PAZ, B.C.S., MARZO 1998.

ÍNDICE

	pág.
ÍNDICE	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABLAS	v
GLOSARIO	vi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
I.1. DESCRIPCIÓN DEL ORGANISMO	4
I.1.1. DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO <i>Haliotis</i>	4
I.1.2. ANATOMÍA DEL ABULÓN	5
A. SISTEMA DIGESTIVO	6
B. ALIMENTACIÓN	8
C. DISTRIBUCIÓN MUNDIAL	9
I.1.3. DISTRIBUCIÓN EN MÉXICO	10
I.2. PROTEASAS	11
I.2.1. CLASIFICACIÓN	12
A. SERIN PROTEASAS	13
B. PROTEASAS CISTEÍNICAS	14
C. METALOPROTEASAS	14
D. PROTEASAS ASPÁRTICAS	15
I.2.2. ENSAYOS PARA PROTEASAS	15
II. ANTECEDENTES	18
III. JUSTIFICACIÓN	21
IV. OBJETIVOS	22
V. METODOLOGÍA	23
V.1. ORGANISMOS	23
V.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS	24
V.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA	25

V.4.	ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA	25
V.5.	ACTIVIDAD TRIPSINA Y QUIMOTRIPSINA	26
V.6.	ACTIVIDAD DE CARBOXIPEPTIDASA A y CARBOXIPEPTIDASA B	27
V.7.	ACTIVIDAD FOSFATASA ÁCIDA	28
V.8.	ACTIVIDAD DE PEPSINA	29
V.9.	ELECTROFORESIS	29
	A. ZIMOGRAMAS	30
	B. PESO MOLECULAR	31
	C. ESTABILIDAD DE LAS PROTEASAS EN DIFERENTE pH	31
V.10.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
VI.	RESULTADOS	33
VI.1.	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA	33
VI.2.	ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA	34
VI.3.	ACTIVIDAD TIPO TRIPSINA Y QUIMOTRIPSINA	42
VI.4.	ACTIVIDAD DE CARBOXIPEPTIDASA A y CARBOXIPEPTIDASA B	44
VI.5.	ACTIVIDAD DE FOSFATASA ÁCIDA	44
VI.6.	ACTIVIDAD TIPO PEPSINA	45
VI.7.	COMPOSICIÓN DE PROTEÍNAS EN EXTRACTOS ENZIMÁTICOS	47
VI.8.	COMPOSICIÓN DE PROTEINASAS EN EXTRACTOS ENZIMÁTICOS	48
VI.9.	EFFECTO DEL PH SOBRE LA ESTABILIDAD DE LAS PROTEASAS	50
VII.	DISCUSIÓN	55
VIII.	CONCLUSIONES	61
IX.	PERSPECTIVAS	62
X.	BIBLIOGRAFÍA	63
XI.	ANEXO I	71
	ANEXO 2	75

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Fig. 1. Vista superior de un abulón (Hahn, 1989a)	5
Fig. 2. Anatomía del abulón (Fallu, 1991)	6
Fig. 3. Tracto alimenticio de <i>Haliotis</i> , con vísceras y concha removida (Cox, 1962)	7
Fig. 4. Tracto digestivo de <i>Haliotis rufescens</i> Swainson, superficie dorsal (McLean, 1970)	8
Fig. 5. Distribución mundial de abulón (Cox, 1962)	9
Fig. 6. Distribución de especies de Abulón en Baja California y Zonas Pesqueras con talla mínima de captura en mm (Guzmán del Proo, 1992)	10
Fig. 7. Ubicación del Laboratorio en La Bocana, B.C.S. (Salas-Garza y Searcy-Bernal, 1992)	23
Fig. 8. Efecto del pH en la actividad proteolítica de las vísceras	35
Fig. 9. Efecto del pH en la actividad proteolítica del hepatopáncreas	36
Fig.10. Cinética en vísceras (grupo I)	38
Fig.11. Cinética en hepatopáncreas (grupo II)	38
Fig.12. Actividad proteolítica del grupo I con diferentes sustancias	39
Fig. 13. Actividad proteolítica del grupo II con diferentes sustancias	40
Fig. 14. Actividad proteolítica del grupo III con diferentes sustancias	41
Fig. 15. Actividad tipo tripsina	42
Fig. 16. Actividad tipo quimotripsina	43

Fig. 17. Actividad de fosfatasa ácida	45
Fig. 18. Actividad de pepsina en vísceras	46
Fig. 19. Actividad de pepsina en hepatopáncreas	47
Fig. 20. Composición de proteínas por SDS-PAGE	48
Fig. 21. Electroforesis desnaturizante por SDS-PAGE	49
Fig. 22. Electroforesis no desnaturizante a pH neutro	49
Fig. 23. Electroforesis no desnaturizante a pH ácido	50
Fig. 24. Efecto del pH sobre la estabilidad de las proteasas de las vísceras del grupo I.	51
Fig. 25. Efecto del pH sobre la estabilidad de las proteasas de las vísceras del grupo II.	52
Fig. 26. Efecto del pH sobre la estabilidad de las proteasas de las vísceras del grupo III.	53

LISTA DE TABLAS

	pag.
Tabla 1. Clases y familias de enzimas proteolíticas (Neurath, 1989)	12
Tabla 2. Identificación de proteasas con inhibidores.	17
Tabla 3. Características de los grupos de organismos	24
Tabla 4. Concentración de proteína (mg/mL)	34
Tabla 5. Análisis químico proximales de macroalgas	73
Tabla 6. Porcentaje del análisis químico proximal de diferentes dietas de abulón	74
Tabla 7. Composición química del amortiguador universal	75

GLOSARIO

DESOLVE	Ovoposición o puesta de ovocitos de las hembras. Los ovocitos se desovan cuando el ovario está maduro y por lo tanto ha culminado el proceso de vitelogénesis y maduración.
DIATOMEAS	Algas pardo-doradas con exoesqueleto silíceo, que pueden ser unicelulares, asociadas o en cadenas y habitar cualquier ambiente acuático o semiacuático expuesto a la luz.
ELECTROFORESIS	Movimiento de moléculas cargadas en solución por aplicación de un campo eléctrico a través de la mezcla.
ELECTROFORESIS NATIVA	Electroforesis que evita el uso de detergentes (SDS) y agentes reductores.
ENZIMA	Proteína con propiedades catalíticas debido a su fuerza de activación específica. Se ha encontrado actividad catalítica en RNA.
ENZIMAS DIGESTIVAS	Enzimas propias del tracto digestivo que hidrolizan las sustancias alimenticias.
HÁBITAT	Es el lugar donde vive un organismo. Localidad o ambiente en el cual se desarrolla un animal o planta.
POSTESÓFAGO	Músculo delgado y largo que se encuentra en la parte posterior del esófago.
POSTLARVA	Estadio en el cual se adquiere la morfología de los progenitores.
PROTEASAS	Enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas.
SEMILLA	Término utilizado para nombrar a los pequeños moluscos que alcanzan una talla a la que se pueden observar, contar y transportar con mayor facilidad.
SINCRÓNICO	Conjunto de fenómenos que ocurren simultáneamente.
SUSTRATO(S)	Sustancia sobre la cual actúa una enzima activándola y es transformada a producto durante la reacción enzimática.
ZIMÓGENO	Precursor inactivo de una enzima

ABREVIATURAS

$A_{366\text{nm}}$	=	Absorbancia a 366 nanómetros
BAPNA	=	Benzoil-Arginil-p-nitroanilida
BSA	=	Albúmina de suero bovino
DMSO	=	Dimetil sulfóxido
EDTA	=	Tetra-acetato de etilendiamina
EGTA	=	Ácido etilen glicol-bis-(β -amino etil éter) N,N,N',N' tetracético
ELN	=	Extracto libre de nitrógeno
g	=	Unidad de fuerza centrífuga, $g = 1.12 r \frac{(\text{RPM})^2}{(1000)}$
		donde: r = Radio del rotor en mm. RPM = Revoluciones por minuto
HLA	=	Hipuril-L-arginina
HLPA	=	Hipuril-L-fenilalanina
IS	=	Yodoacetamida
NEM	=	n-metil-maleimida
PAGE	=	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PMSF	=	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Rf	=	Distancia de migración de la proteína entre la distancia de migración del colorante
SBTI	=	Inhibidor de soya para tripsina
SCPP	=	Sociedad Cooperativa de Productos Pesqueros
SAPFNA	=	Succinil-(Ala) ₂ -Pro-Phe-p-nitroanilida
SDS	=	Dodecil sulfato de sodio

TCA	=	Ácido tricloroacético
TLCK	=	Tosil-lisin-clorometilcetona
TPCK	=	N-tosil-L-fenilalanin clorometilcetona
TRIS	=	Tri-(hidroximetil)-aminometano

Los aminoácidos nombrados siguen la nomenclatura internacional de tres letras:

Ala	=	Alanina
Asp	=	Ácido aspártico
Cys	=	Cisteína
Gly	=	Glicina
Glu	=	Ácido glutámico
His	=	Histidina
Phe	=	Fenilalanina
Pro	=	Prolina
Ser	=	Serina
Tyr	=	Tirosina
Trp	=	Triptofano

RESUMEN

La composición de enzimas digestivas varía de manera importante entre los diferentes grupos de animales, reflejando en forma compleja los procesos de evolución y adaptación con respecto a la dieta. La información de enzimas digestivas se ha enfocado principalmente a vertebrados, siendo más reducida para invertebrados. En gastrópodos marinos se ha descrito que en el sistema digestivo existen enzimas que rompen la pared celular y otras enzimas que participan en la hidrólisis de proteínas. En abulón, se ha reportado la existencia de glucosidasas, lipasas y proteasas, pero no hay información de las especies que se distribuyen en costas mexicanas. En este trabajo se da información sobre la fisiología digestiva del abulón a partir de las enzimas que participan en la digestión de proteínas en juveniles de abulón azul *Haliotis fulgens*, alimentados con diferente dieta. Extractos de vísceras y hepatopáncreas de tres grupos de organismos: I y II) organismos alimentados con macroalgas, pero de diferente talla y III) organismos alimentados con diatomeas, fueron analizados incluyendo técnicas enzimáticas como: hidrólisis de sustratos por proteinasas, hidrólisis de sustratos sintéticos específicos y técnicas electroforéticas. El mayor contenido de proteínas para vísceras y hepatopáncreas se encontró en el grupo alimentado con diatomeas. La mayor actividad proteolítica se presentó en el grupo I, en el intervalo de pH de 2 a 5, siendo mayor en hepatopáncreas que en vísceras. Se encontró actividad de tripsina, quimotripsina, pepsina y fosfatasa ácida en todos los extractos, no detectándose actividad para carboxipeptidasa A y carboxipeptidasa B. No se reveló actividad enzimática con los métodos de electroforesis utilizados. Los resultados muestran la importancia de continuar con estudios acerca de la caracterización de las enzimas que participan en los procesos digestivos, y de la digestibilidad del alimento en especies de abulón que se distribuyen en costas mexicanas.

ABSTRACT

The composition of digestive enzymes varies widely among different groups of animals, showing in a complex way the influences of evolutionary adaptation to diet. Digestive enzyme information has been focused on vertebrates mostly, with only sparse information describing invertebrate digestive processes. In the marine gastropoda digestive system, the action of enzymes that break down cellular walls and other enzymes that participate in protein hydrolysis have been described. The existence of glucosidases, lipases, and proteases have been reported in abalone species, but no studies have been done on the Mexican species. This work provides information about digestion physiology, for the study of enzymes that participate in protein digestion of the Mexican juvenile blue abalone *Haliotis fulgens*. Were analyzed three groups: I and II) both from the same spawning, had different size, fed with macroalgae, and III) organisms fed with diatoms. These studies were done using enzymatic techniques including: proteinase substrate hydrolysis, specific synthetic substrate hydrolysis, and electrophoresis techniques in viscera and hepatopancreas extracts.. A higher protein content was found in individuals fed with diatoms and the highest enzyme activity was found in group I. The protease activity in hepatopancreas extracts was higher than in viscera and was detected between pH 2 and 5. Trypsin, chymotrypsin, pepsin, and acid phosphatase activity were found in both extracts, but carboxipeptidase A and carboxipeptidase B activity were not found. No activity was found by electrophoresis techniques used. These results shows the importance of continuing with the characterization of digestive enzymes in juvenile abalone to describe the action of enzymes in digestive processes and food digestibility of Mexican species.

I. INTRODUCCIÓN

En México, el abulón es un recurso que se ha explotado comercialmente desde hace más de 120 años. Llegó a ser el más importante del mundo hace más de una década, cuando aportaba el 34% de la captura mundial con 2000 a 3000 t anuales (Salas-Garza y Searcy-Bernal, 1990, 1992). A partir de 1976, a pesar de las medidas regulatorias impuestas por la Secretaría de Pesca para la protección del recurso, tales como veda y talla mínima de captura, la producción declinó de manera constante hasta llegar actualmente a menos de 300 t anuales (Mazón, *et al.*, 1996). Esto ha llevado a desarrollar infraestructura y tecnología orientadas al cultivo del organismo, como una de las alternativas más viables para garantizar la permanencia del recurso, aunado a la administración racional de los recursos abuloneros aún disponibles.

Las propiedades nutritivas del alimento y el crecimiento del abulón son factores críticos para obtener cultivos exitosos. La tasa de crecimiento en el abulón, es aproximadamente de 2 a 3 cm por año, por lo que se requiere de 2 a 5 años para producir organismos de talla comercial (Hahn, 1989b). Aunado a esto, el crecimiento es heterogéneo. En cultivo, el uso de alimentos inadecuados puede hacer al animal susceptible a trauma y estrés, causando problemas durante el cultivo, haciéndolo más caro y prolongado. El alimento debe proveer los requerimientos nutricionales y ser suministrado en cantidades suficientes. Los estudios de nutrición para el abulón han consistido en: ganancia en peso y talla del organismo, y en algunos casos en la tasa de alimentación y conversión alimenticia, producida con alimento natural (macroalgas y diatomeas) y con dietas artificiales (Hahn, 1989b). El desarrollo de alimentos artificiales para abulón implica conocer los niveles óptimos de proteínas, lípidos y otros nutrientes (Hahn, 1989b). Además, es importante conocer también si la presentación del alimento suministrado es susceptible de ser degradado y asimilado por el animal, con la participación de enzimas digestivas.

Las enzimas digestivas desempeñan una acción intermedia entre la ingestión del alimento y su asimilación. Son controladas por el suministro de comida y las condiciones ambientales, además de la genética del organismo (Reid, 1978). Diferentes estrategias de vida, relacionadas estrechamente con la posición de la especie en la red trófica y los procesos evolutivos de adaptación, inducen patrones de enzimas específicos (Dittrich, 1992).

El estudio de enzimas proteolíticas ha sido mayor en vertebrados que en invertebrados, y dentro del grupo de los invertebrados, algunos moluscos bivalvos. Sin embargo, poco se conoce sobre aspectos bioquímicos de hidrolasas digestivas de abulón.

En el presente trabajo, se describe la actividad proteolítica y las proteasas digestivas en juveniles de abulón azul *Haliotis fulgens*. Se considera que un mejor conocimiento del proceso digestivo del abulón azul, podría mejorar las condiciones de cultivo en cuanto a la elección de dietas que sean mejor aprovechadas y que repercuta en un incremento en la tasa de crecimiento del organismo.

I.1. DESCRIPCIÓN DEL ORGANISMO

El abulón es un gastrópodo marino herbívoro del género *Haliotis*. Es desde 1918 un recurso pesquero de gran demanda en el mercado internacional y muy importante para la Península de Baja California, México, donde se encuentran siete de las especies comercialmente explotadas: abulón pinto (*Haliotis kamtschatkana*), abulón plano (*H. walallensis*), abulón rojo (*H. rufescens*), abulón negro (*H. cracherodii*), abulón azul (*H. fulgens*), abulón amarillo (*H. corrugata*) y abulón chino (*H. sorenseni*). El abulón azul es la especie más importante (Mazón *et al.*, 1996).

I.1.1. DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO *Haliotis*

Haliotis midae Linné (1758), es considerada la especie típica y que reúne las características de la familia: concha univalva de forma uniforme y oval circular, dorsalmente muy convexa, notablemente aplanada, con una hilera de poros respiratorios adyacentes a la cavidad branquial. Las estructuras sensoriales epipodales están generalmente bien desarrolladas y la masa visceral confinada hacia la última espira. El interior de la concha es típicamente nacarado y el animal posee un par de ctenidios bipectinados, tentáculos epipodales bien desarrollados y rádula ripidoglosada (Lindberg, 1992) (Fig. 1). Su clasificación sistemática es la siguiente (Cox, 1962; Hahn, 1989a):

Reino:	Animal
Phylum:	Mollusca
Clase:	Gastropoda
Subclase:	Prosobranchia
Orden:	Arqueogastropoda
Suborden:	Zygobranchia
Superfamilia:	Pleurotomariacea
Familia:	Haliotidae
Género:	<i>Haliotis</i>

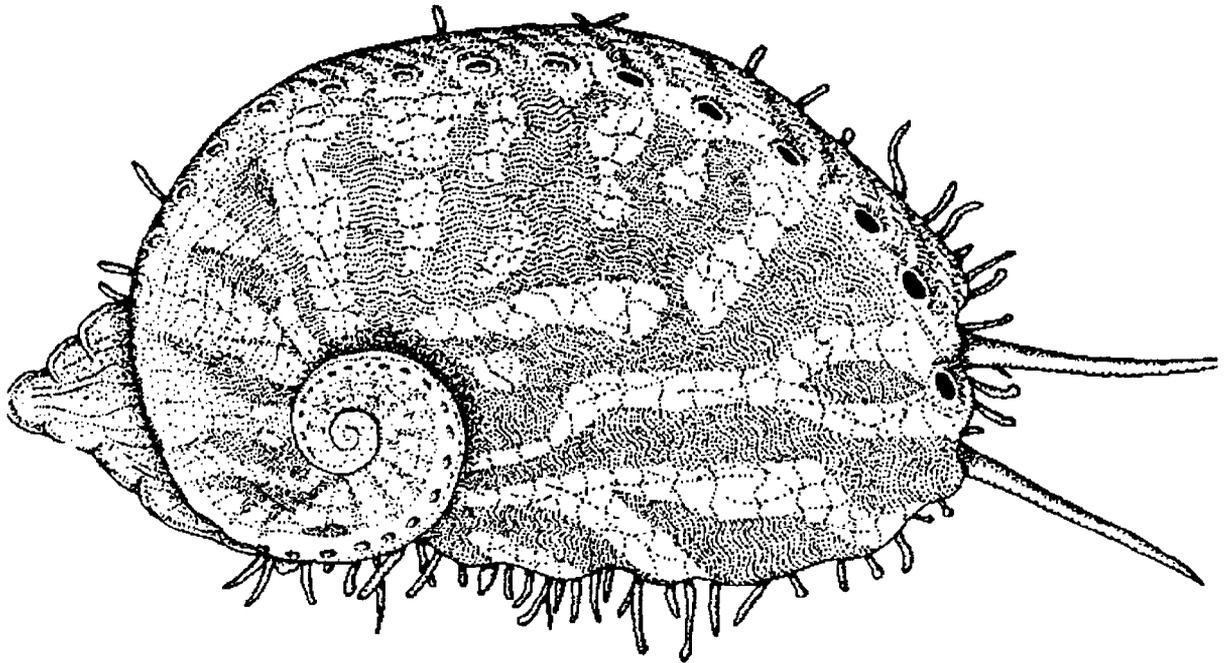


Fig. 1. Vista superior de un abulón (Hahn, 1989a).

I.1.2. ANATOMÍA DEL ABULÓN

Anatómicamente el género *Haliotis* está conformado por: el pie, el cual no está completamente cubierto por la concha, similar a un par de labios y en cuyo derredor están una serie de tentáculos que presumiblemente detectan depredadores y alimento; la cabeza, localizada al frente del pie, y en cuya base está la boca, donde no hay dientes, pero sí una rádula que utiliza para raspar el alimento; un par de branquias localizadas en la cavidad del manto, bajo una serie de poros en la concha; el intestino está escondido abajo del pie; el tracto digestivo entero y las vísceras están anexos al músculo y consisten en boca, esófago, estómago e intestino como se observa en la Fig. 2 (Fallu, 1991).

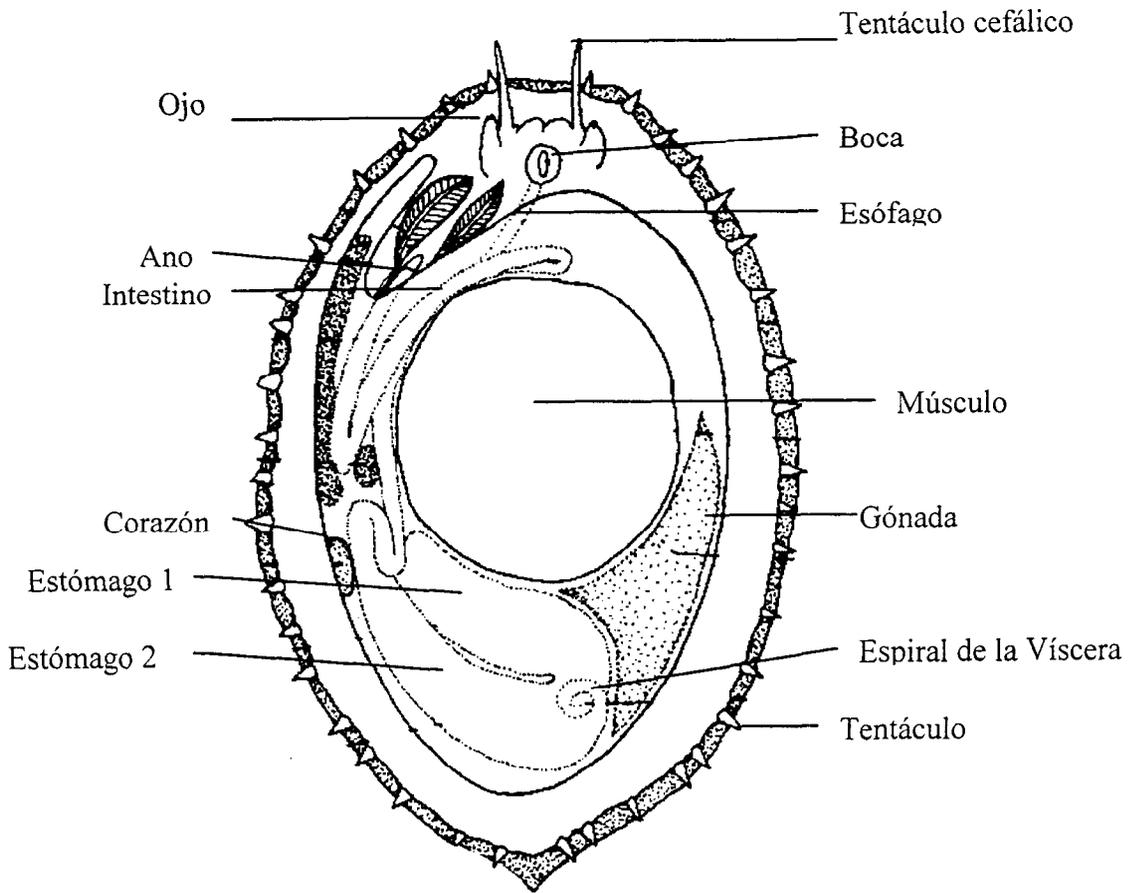


Fig. 2. Anatomía del abulón (Fallu, 1991).

A. SISTEMA DIGESTIVO

El tracto alimenticio se encuentra sobre el lado izquierdo del cuerpo, entre el músculo y el borde del epipodio (Fig. 3), excepto la porción del esófago que pasa a través del músculo del pie en la región de la cabeza. El tracto digestivo entero y la víscera están fuera de la gran masa muscular y están sostenidos en su lugar por los músculos ventral y dorsal (Cox, 1962). Este tracto consiste sucesivamente de boca, esófago, el estómago en tres o cuatro partes y el intestino que pasa por el corazón antes de terminar en el ano. El hepatopáncreas o glándula digestiva es rico en una emulsión de enzimas como catalasas, lipasas, maltasas, proteasas, invertasas, ureasas y amilasas (Albrecht, 1921; Mc Lean, 1970; Gómez-Pinchetti y García-Reyna, 1993; Erasmus, 1996; Fleming *et al.*, 1996; Knauer *et al.*, 1996).

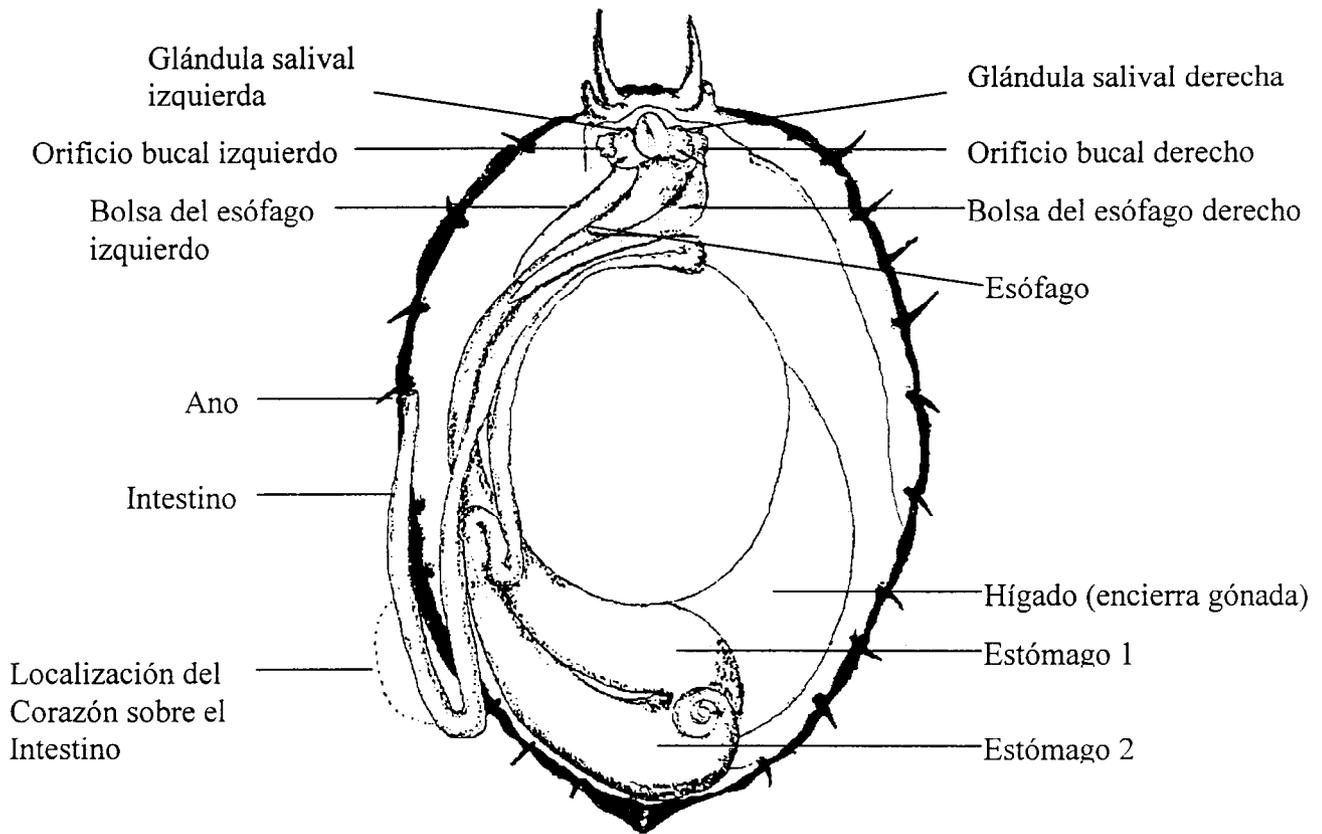


Fig. 3. Tracto alimenticio de *Haliotis*, con vísceras y concha removida (Cox, 1962).

Siguiendo la morfología y el movimiento del alimento a través del intestino, Mc Lean (1970), describe que el material ingerido pasa al ducto de la glándula salival abierta y es llevado al esófago por fuertes corrientes ciliares. Del esófago, el material es llevado a un largo y delgado músculo llamado postesófago. Después de que el animal se alimenta, esta cámara empaqueta el alimento con fluidos digestivos. Estudios *in vitro* mostraron que el epitelio del postesófago es permeable a pequeños materiales orgánicos. La glucosa y fenilalanina, fueron encontradas en el epitelio del postesófago en considerables cantidades, pero muy poca proporción es pasada a través del epitelio y transferida a la sangre. Sin embargo, el postesófago es una importante región de absorción, y la digestión del alimento continúa a medida que el mismo pasa a través del intestino.

En *Haliotis* el estómago es pequeño. Por debajo del postesófago y separado del estómago por un pliegue, se encuentran varios ductos largos de la glándula digestiva y algunos más pequeños que se comunican dorsalmente con el estómago. En el estómago se encuentra un elongado protostilo mucoso compuesto de alimento y material derivado de la glándula digestiva. Cerca del

estómago se encuentra un segmento intestinal corto con una gran cantidad de hilos entre lomas y surcos, de tal manera que el mayor contenido del intestino es una masa de estos hilos con algunos fragmentos de algas entremezcladas. Del estómago el intestino se extiende anteriormente a la región de la cabeza y posteriormente a la del corazón y luego de nuevo al ano en la cavidad del manto.

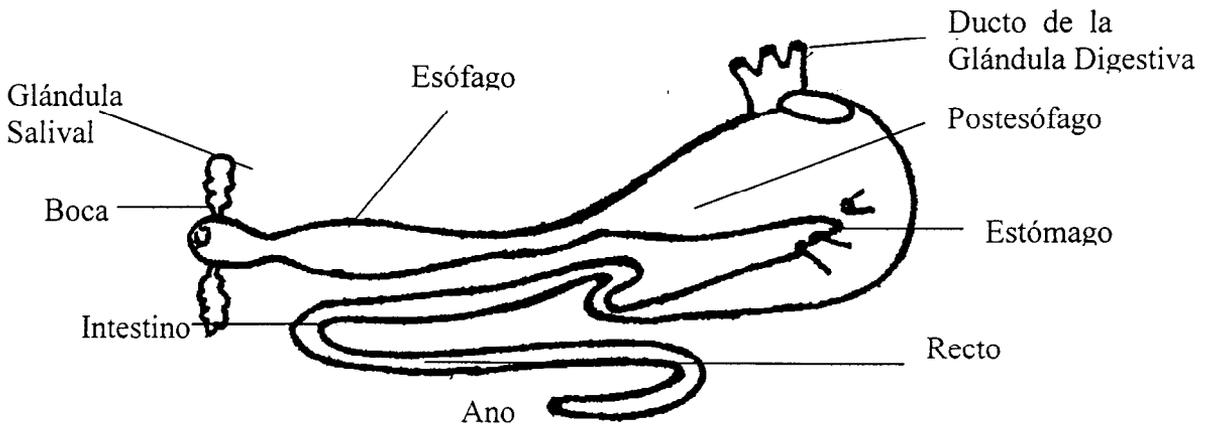


Fig. 4. Tracto digestivo de *H. rufescens* Swainson, superficie dorsal (McLean, 1970).

B. ALIMENTACIÓN

Durante la etapa larval, las reservas vitelinas son suficientes para cubrir los requerimientos energéticos (McShane, 1992). Durante el estado de vida libre y hasta que comienzan una existencia bentónica, su dieta consiste de plancton. Las postlarvas y juveniles hasta de 5 mm se alimentan de algas rojas incrustantes y diatomeas que raspan con la rádula. El color de la concha cambia con la alimentación, de blanca cuando se alimentan de diatomeas a rojizas cuando ingieren pigmentos de las algas coralinas. A medida que crecen dependen principalmente de macroalgas como alimento, iniciando su consumo cuando alcanzan una longitud de 10 mm; posteriormente la concha se torna color verde oscura (Ino, 1966).

Estudios de campo y de laboratorio de algunas especies de *Haliotis* muestran una variabilidad en la tasa de crecimiento. Tanto la calidad como la cantidad del alimento algal propician variaciones de talla, así como las estaciones, los lugares y los años, lo que se relaciona, en parte, con la disponibilidad de las algas (Day y Fleming, 1992).

C. DISTRIBUCIÓN MUNDIAL

Hay cerca de cien especies de *Haliotis* en el mundo. Se encuentran localizadas en ambos hemisferios con las especies más grandes distribuidas en regiones templadas y las más pequeñas en regiones tropicales y árticas. Un gran número de especies se encuentran en el centro y sur del Pacífico, y partes del Océano Índico, pero ninguna de estas es de gran talla. El abulón se encuentra a lo largo de la mayoría de las costas templadas y tropicales, excepto Sudamérica y el este de Norteamérica (Fig. 5). Se presenta a lo largo de la costa oeste de Norteamérica (Alaska a la costa occidental de la península de Baja California); oeste y costa sur de Asia (Rusia, Korea, Japón, China, Taiwan, Indonesia, Borneo, Malasia, Camboya, Tailandia, India y SriLanka); islas del Océano Pacífico; Australia; Nueva Zelanda; África (Egipto, Tanzania, Mozambique, Natal, Madagascar, Cabo de la Buena Esperanza, Costa de Oro y las islas de Madeira y Azores); y Europa (Francia, España, Italia, Yugoslavia y Grecia) (Cox, 1962). Si existen haliótidos en otras áreas aún no han sido registrados.

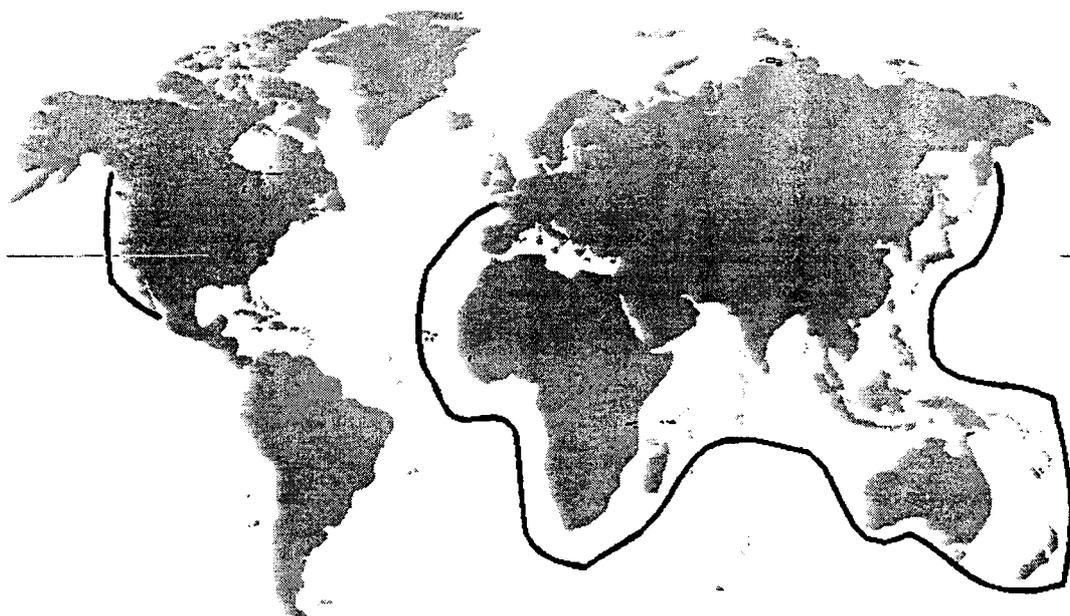


Fig. 5. Distribución mundial de Abulón (Cox, 1962).

I.1.3. DISTRIBUCIÓN EN MÉXICO

En México, las especies de abulón son identificadas por las características específicas del animal. Los nombres científicos y comunes con que se conocen las especies de abulón mexicano, y que son las más conspicuas de la Península (Fig. 6), son los siguientes (Guzmán del Proo, 1992, 1994):

Haliotis corrugata Gray 1828
H. fulgens Philippi 1845
H. cracherodii Leach 1817
H. rufescens Swainson 1822
H. sorenseni Bartsch 1940
H. assimilis Dall 1878.

Abulón amarillo
 Abulón azul
 Abulón negro
 Abulón rojo
 Abulón chino
 Abulón rayado

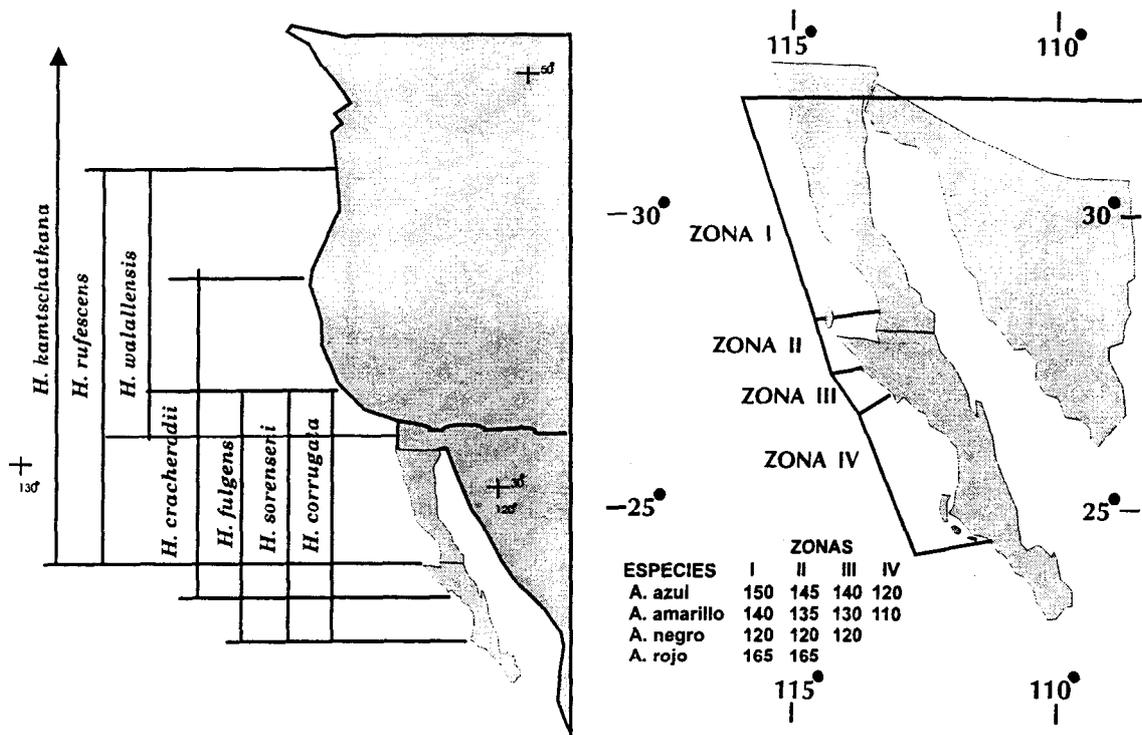


Fig. 6. Distribución de especies de Abulón en Baja California y Zonas Pesqueras con talla mínima de captura en mm (Guzmán del Proo, 1992).

De estas especies, *Haliotis fulgens* es una de las especies más importantes, ya que junto con *H. corrugata*, contribuye con el 90 al 95% de la captura total en la costa del Pacífico de Baja California. Esta especie se presenta desde las Islas Coronado, B.C., hasta la punta sur de la Isla de Santa Margarita en Bahía Magdalena B.C.S. (Guzmán del Proo, 1992) (Fig.6). El intervalo de tallas más frecuente oscila entre 12.5 y 20 cm, y las tallas mínimas de captura por zona pueden observarse en la Fig. 6. Se distribuye desde la zona intermareal baja, hasta los 18 m. Las mayores densidades se presentan entre 1.5 y 8 m de profundidad. Vive adherido a fondos rocosos donde la diversidad y abundancia de la flora y fauna asociada a los bancos juega un papel importante en el ciclo de vida, que en combinación con la variación de los factores ambientales, determinan las diferencias entre los patrones de distribución y abundancia del recurso. Su concha es ovalada, gruesa, con un gran número de bordes en la superficie, de color café rojizo a verde olivo en el exterior. En el interior tiene patrones cobrizos, azules y verdes, sus conchas son apreciadas por su belleza (Hahn, 1989a).

I.2. PROTEASAS

Las proteasas, son hidrolasas específicas para enlaces peptídicos formando la estructura primaria de las proteínas (Dixon y Webb, 1979). El rompimiento de cadenas polipeptídicas es una de las más frecuentes e importantes modificaciones enzimáticas de las proteínas (Beynon y Bond, 1989; García-Carreño, 1992). Las podemos encontrar en animales, plantas y microorganismos. En general se encuentran involucradas en el metabolismo de todos los organismos, incluyendo la digestión, activación de proenzimas y hormonas (Beynon y Bond, 1989; García-Carreño, 1992; García-Carreño, 1996). Las proteasas es el grupo de enzimas más empleado en la industria, constituyendo el 50% del total; casi todas ellas de origen microbiano (García-Carreño, 1991).

La digestión de las proteínas ha captado la atención de fisiólogos y bioquímicos. Las proteasas digestivas de secreciones pancreáticas y gástricas son las enzimas mejor caracterizadas. Mucho del conocimiento de la estructura de las proteínas y función enzimática ha sido derivado del estudio de estas proteasas. Investigaciones de la cinética, especificidad e inhibición, junto con el análisis detallado de la secuencia de aminoácidos y su estructura, han permitido identificar los componentes y la geometría de los sitios activos, y de estos, se ha deducido el mecanismo de catálisis de las proteasas digestivas. Como consecuencia, las proteasas han sido clasificadas en clases (García-Carreño, 1992; García-Carreño y Navarrete del Toro, 1997). Las enzimas proteolíticas son también la mejor herramienta en la identificación y aislamiento de dominios de proteínas con funciones complejas (Neurath, 1989).

I.2.1. CLASIFICACIÓN

Las proteasas se subdividen en dos grupos principales: 1) aquellas que hidrolizan enlaces peptídicos entre el grupo amino o carboxilo terminal, conocidas como exopeptidasas o peptidasas y 2) las que hidrolizan enlaces peptídicos internos, conocidas como endopeptidasas o proteinasas. Las proteasas fueron clasificadas inicialmente de acuerdo al tamaño molecular, carga o especificidad por el sustrato. Un sistema más racional para su clasificación se basa en la comparación de los sitios activos, mecanismos de acción y estructura tridimensional. Cuatro clases y seis familias de proteasas son reconocidas por la Unión Internacional de Bioquímica (Tabla 1). Cada clase tiene un grupo catalítico o residuos aminoácidos característicos organizados en una configuración particular para formar el sitio activo (Neurath, 1989; García-Carreño, 1992).

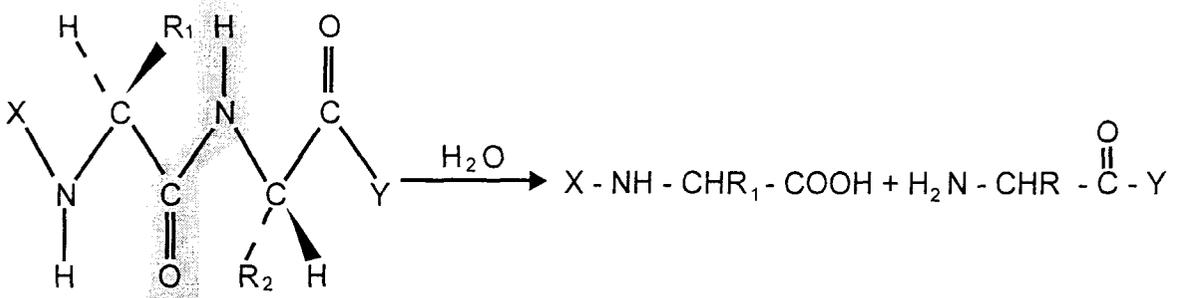
Tabla 1. Clases y familias de enzimas proteolíticas (Neurath, 1989).

CLASE	FAMILIA	PROTEASA REPRESENTATIVA	RESIDUOS CARACTERÍSTICOS DEL SITIO ACTIVO *
Serino (3.4.21.X)	Serin Proteasas I	Quimotripsina Tripsina Elastasa Kallicreína pancreática	Asp ¹⁰² , Ser ¹⁹⁵ , His ⁵⁷
	Serin Proteasas II (microbianas)	Subtilisina	Asp ³² , Ser ²²¹ , His ⁶⁴
Cisteíno (3.4.22.X)	Cisteín Proteasas	Papaína Actinidina Catepsina B y H de hígado de rata	Cys ²⁵ , His ¹⁵⁹ , Asp ¹⁵⁸
Aspárticas (3.4.23.X)	Proteasas Aspárticas	Penicilopepsina Proteasas ácidas Renina	Asp ³³ , Asp ²¹³
Metaloproteasas (3.4.24.X)	Metaloproteasas I	Carboxipeptidasa A de bovino	Zn, Glu ²⁷⁰ , Try ²⁴⁸
	Metaloproteasas II	Termolisina	Zn, Glu ¹⁴³ , His ²³¹

* El número de residuos corresponden a la secuencia de aminoácidos de la enzima escrita en negritas.

Las serin proteinasas tienen un residuo serino en el sitio activo, así como His y Asp. Las cisteínicas (sulfhidril o tiol proteasas) se caracterizan por tener un residuo Cys en su centro catalítico, además de His y Asp. Las aspárticas (proteasas ácidas) se distinguen por tener un residuo de Asp en el sitio activo, y presentan mayor actividad a pH ácido. El grupo de las metaloproteasas, poseen un residuo de Glu en el sitio activo y requieren de un catión bivalente como zinc, calcio o magnesio para catalizar la hidrólisis del enlace peptídico (García-Carreño, 1992). El nombre da una idea del aminoácido principal localizado en el sitio activo.

Según su mecanismo de acción, las proteinasas se pueden agrupar en las que forman complejos covalentes entre el sitio activo de la enzima y el sitio de hidrólisis del sustrato (proteasas tipo serino y cisteíno) y las que no los forman (proteasas tipo aspártico y metalo). La reacción común catalizada por enzimas proteolíticas, es la hidrólisis de los enlaces peptídicos de una proteína (Ecuación 1):



Ecuación 1.

La naturaleza química del grupo R_1 y R_2 es el factor que da la especificidad a las enzimas proteolíticas. Por ejemplo, α -quimotripsina hidroliza la cadena peptídica cuando R_1 es un residuo tirosil, fenilalanil o triptofanil; tripsina hidroliza la cadena cuando R_1 es un residuo de arginil o lisil. Por otro lado, la pepsina y las carboxipeptidasas, tienen especificidad por R_2 en la cadena. Ambas hidrolizan la cadena peptídica solo si R_2 es un residuo fenilalanil. En las carboxipeptidasas, el constituyente Y debe ser un grupo hidroxilo (Whitaker, 1994).

A. SERIN PROTEASAS

La clase de las serin proteasas es la mejor caracterizada y fisiológicamente la más versátil. Está ejemplificada por tripsina, quimotripsina, elastasa (pancreoelastasa), trombina, subtilisina y proteasas α -líticas de *Sorangium sp.* Los residuos aminoácidos presentes en los sitios activos de estas enzimas se presentan en la

Tabla 1. El mecanismo catalítico se lleva a cabo por un estado de transición tetraédrico intermedio en la acilación y desacilación (Neurath, 1989). Este mecanismo es similar con todas las proteasas serínicas. La conformación global de las serin proteasas pancreáticas, es prácticamente la misma: dos dominios compactos, plegados similarmente, dispuestos simétricamente a través de dos pliegues del eje de simetría. Todas estas enzimas tienen en común que pueden ser inhibidas por el diisopropilfosforogluoridato (DFP), el cual reacciona con los grupos hidroxilo de un residuo seril específico en el sitio activo de la enzima y son endopeptidasas. En la secuencia de aminoácidos los residuos seril e histidil son similares para varias enzimas. Los factores generales del mecanismo de catálisis para estos grupos de enzimas son idénticos; solamente los residuos de aminoácidos específicos involucrados en el enlace con el sustrato son diferentes, por ello difieren en su especificidad.

B. PROTEASAS CISTEÍNICAS

Estas proteasas incluyen varias catepsinas de mamíferos, proteasas citosólicas activadas por calcio (calpaínas) y proteasas de plantas. El residuo catalítico principal es la Cys, que actúa como la serina en la quimotripsina. El mecanismo catalítico se lleva a cabo vía tiol-éster intermediario y es facilitado por la cadena adyacente de histidina y del ácido aspártico (Neurath, 1989).

El grupo de enzimas incluye las de plantas superiores como papaína (de la papaya) y bromelina (de la piña), y enzimas microbianas como proteasas de *Streptococcus* (cisteín proteínasa estreptocócica), que con excepción de la proteasa microbiana, tienen un común y amplio pH óptimo de 6 a 7.5 de actividad (Whitaker, 1994).

C. METALO PROTEASAS

Casi todas las enzimas proteolíticas de este grupo son exopeptidasas. Son ejemplos la carboxipeptidasa A y B, que tienen estructura y sitios activos similares. La carboxipeptidasa A (peptidil-L-amino-ácido hidrolasa), la carboxipeptidasa B (peptidil-L-lisin hidrolasa), la glicil-glicin dipeptidasa (dipéptido hidrolasa) proveniente de músculo de rata y la carnosinasa requieren de zinc, mientras que la prolidasa y la iminodipeptidasa requieren de magnesio. Estos son algunos ejemplos de la gran cantidad de exopeptidasas encontradas en tejido animal. Todas estas enzimas, son inhibidas por agentes quelantes de metales (Whitaker, 1994). La termolisina es una metaloendopeptidasa con un sitio activo, especificidad y mecanismo similar a la carboxipeptidasa A. Otras metaloendopeptidasas incluyen a la colagenasa microbiana y la proteinasa hemorrágica del veneno de serpiente.

Las carboxipeptidasas A y B, son muy similares en su mecanismo de acción. La carboxipeptidasa A prefiere los extremos C-terminal aromáticos y alifáticos de naturaleza hidrofóbica, mientras que la carboxipeptidasa B requiere que el residuo aminoácido del C-terminal sea arginina o lisina. La carboxipeptidasa A es una de las proteasas más investigadas por medio de análisis espectroscópicos y cristalográficos.

Para lograr la acción de la enzima sobre el grupo carbonilo del enlace por hidrolizar, estas enzimas utilizan la coordinación con un ión metálico, que por lo general es el Zinc, aunque puede ser sustituido por otros metales. El ión metálico provee una fuerte atracción electrofílica para facilitar la acción del agua. Los componentes del sitio activo incluyen, además del zinc, tres ligandos: dos de Glu y uno de His. Otro Glu de la cadena (270), actúa como nucleófilo, directamente o con participación de una molécula de agua. Dentro de las metaloendopeptidasas, la termolisina bacteriana es la única de estructura y mecanismo de acción conocido (Neurath, 1989).

D. PROTEASAS ASPÁRTICAS

Residuos de ácido aspártico constituyen los grupos catalíticos del sitio activo. A este grupo también se le conoce como proteasas ácidas, con un pH óptimo entre 2 y 4 debido al pK del residuo aminoácido del sitio activo. Incluyen la penicilopepsina bacteriana, la pepsina de mamíferos, la renina y ciertas proteasas fúngicas. La característica de los residuos del sitio activo son los Asp 33 y 213 (de la penicilopepsina), que se encuentran geoméricamente próximos. En el rango de pH activo, uno de ellos está ionizado y el otro no. Un potente inhibidor de estas proteasas es la pepstatina, un hexapéptido que en estado de transición asemeja un sustrato normal (Whitaker, 1994).

La pepsina, es estable a pH de 2 a 5, arriba de pH 5, pierde rápidamente la actividad por desnaturalización. Tiene un pH de actividad óptimo de 2 y especificidad sobre Phe, Tyr o Trp (Whitaker, 1994).

I.2.2. ENSAYOS PARA PROTEASAS

Existen diferentes métodos para determinar la actividad de las enzimas proteolíticas, que utilizan proteínas y compuestos sintéticos como sustratos. Las proteinasas tienen la capacidad de hidrolizar pequeñas moléculas sintéticas; este hecho es importante para los estudios de especificidad por el sustrato y para las propiedades cinéticas (Lehninger, 1984). Un método ampliamente utilizado se

basa en el cambio en la solubilidad de una proteína en ácido tricloroacético (TCA) cuando se somete a la acción de una enzima proteolítica. Dos proteínas usadas comúnmente son: la caseína y la hemoglobina desnaturalizada. Cuando una enzima proteolítica actúa sobre la proteína, el promedio de péptidos solubles producidos está en proporción a la cantidad de enzima y el tiempo de acción (Whitaker, 1994).

Pueden utilizarse también, derivados de proteínas, como azocaseína y azoalbúmina. Con sustratos cromogénicos, la determinación de la actividad de proteasas se basa en la solubilidad de péptidos coloreados de bajo peso molecular en un sobrenadante, después de la precipitación de fragmentos grandes de azoproteínas (Sarath *et al.*, 1989). Los sustratos sintéticos usados en la cuantificación de la actividad de proteinasas, están formados por un aminoácido cromogénico que simula el enlace peptídico. Cuando la enzima rompe este enlace, el compuesto que se desprende puede medirse directa o indirectamente espectrofotométricamente, por métodos electroquímicos o fluorométricos (Hernández-Cortés, 1993).

El uso de sustratos sintéticos sirve para elucidar la especificidad y mecanismo de acción de una enzima. Se requiere de varios ensayos para caracterizar los mecanismos de catálisis de las proteasas, incluyendo: respuesta de la actividad enzimática, respuesta ante inhibidores, modificaciones del sitio activo, dependencia de la actividad de acuerdo al pH y especificidad por el sustrato. Uno de los métodos principales para determinar la clase de proteinasa a la que pertenece una enzima, es a través de la reducción de la actividad usando inhibidores específicos. Un inhibidor enzimático es aquel compuesto que disminuye la tasa de hidrólisis de una enzima sobre un sustrato (Neurath, 1989; García-Carreño, 1992, 1993, 1996; García-Carreño y Navarrete del Toro, 1997)).

Para evaluar el mecanismo de catálisis, determinar los grupos localizados en el sitio activo de la enzima, e incluso establecer la secuencia de rutas metabólicas, se utilizan inhibidores específicos. El tipo de enlace en la unión enzima-sustrato, es determinante para su utilización. Los inhibidores pueden ser de dos tipos de acuerdo a su naturaleza: 1) Inhibidores de bajo peso molecular, los cuales bloquean irreversiblemente un aminoácido catalítico en el sitio activo o quelan el catión requerido; y 2) Inhibidores naturales que se comportan como pseudosustratos y trabajan en forma reversible (García-Carreño, 1992, 1996). Algunos inhibidores utilizados para caracterizar las clases de proteasas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Identificación de proteasas con inhibidores.

CLASE	INHIBIDOR RECOMENDADO Y ENZIMA CONTROL
Serino	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) Inhibidor de soya para tripsina (SBTI) Tosil lisil clorometil cetona (TLCK) Tosil fenilalanil clorometilcetona (TPCK) Control: tripsina y quimotripsina (bovina o porcina)
Cisteíno	Yodoacetamida (IA) Ácido p-hidroximercurico benzoico (PHMB) N-etil-maleimida (NEM) Trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidin butano) Control: Papaína
Aspárticas	Pepstatina A, en DMSO o Metanol. Control: catepsina D, pepsina
Metalo	EDTA, EGTA, 1, 10-fenantrolina in DMSO o metanol Control: termolisina, carboxipeptidasa A

(García-Carreño, 1993)

II. ANTECEDENTES

En general, la mayoría de los estudios sobre enzimas proteolíticas está relacionada a proteasas serínicas, que por sus propiedades características fueron ubicadas entre las enzimas digestivas producidas a nivel pancreático en mamíferos. Posteriormente, han sido encontradas en todas las especies de vertebrados investigadas, observando que su función no se encuentra restringida a funciones digestivas en la región intestinal, sino también están involucradas en la fisiología del organismo, como en el caso de la coagulación por activación de la protrombina y el plasminógeno (Neurath, 1989; Whitaker, 1994).

Muchos estudios sobre la estructura molecular y la actividad catalítica de la quimotripsina de páncreas de mamíferos, incluyendo el mecanismo de activación de zimógenos como el quimotripsinógeno han sido llevados a cabo. En contraste, estudios de enzimas como quimotripsina y sus zimógenos en invertebrados ha estado limitada. Sin embargo, actividad como la de la tripsina, ha sido detectada en algunos invertebrados; serin proteasas con especificidad tipo quimotripsina han sido purificadas de tejidos de invertebrados para determinar su estructura primaria (Groppe y Morse, 1993; Hernández-Cortés, 1993). La Quimotripsina, una serin proteasa, ha sido aislada y caracterizada de decápodos marinos y de agua dulce (García-Carreño *et al.*, 1994).

En crustáceos, el crecimiento y sobrevivencia con diferentes alimentos como fitoplancton o zooplancton implica un alto grado de flexibilidad en la fisiología digestiva con base a las necesidades nutricionales. En *Penaeus monodon*, una de las especies de camarón ampliamente cultivadas en el mundo, se ha observado una variación ontogénica de las enzimas digestivas y cambios en la actividad enzimática con respecto a la dieta, la etapa de desarrollo del organismo y otros factores (Lee-Shing y Bon-Ning, 1992).

La distribución de las enzimas digestivas en animales, se cree que es adaptativa y se relaciona con los constituyentes de la dieta (Yonge, 1937). En bivalvos, que tienen una dieta baja en proteínas, los niveles de proteólisis es también baja, lo cual ha reflejado el poco interés en el estudio de la digestión proteica de estos moluscos. Se ha encontrado que el estómago y divertículo digestivo son los mayores sitios para la digestión proteica. Reid (1978), asevera que todos los bivalvos son capaces de digerir proteínas, y que el mayor contenido de enzimas proteolíticas gástricas son tripsina, catepsina B, exopeptidasas, estearasas y fosfatasas, que son secretadas en respuesta a la ingestión del alimento y fueron encontradas en pequeñas cantidades en el estómago de bivalvos de las familias Ostreidae, Mitilidae y Pectinidae. El complemento de enzimas digestivas en cada

bivalvo puede variar con el hábitat y el tipo de alimento que ingiere, y su distribución en el mismo puede tener una significancia adaptativa y estar relacionada con el tipo de dieta (Selvarani *et al.*, 1989).

En haliótidos, los estudios sobre actividad enzimática son escasos, y se han orientado a enzimas que rompen polisacáridos estructurales y proteínas como: celulasas, laminarasas, alginasas, carragenasas y agarasas. Erasmus (1996), encontró en el hepatopáncreas de *Haliotis rufescens*, enzimas producidas por bacterias de tipo entérico como *Vibrio*, *Alcaligenes*, *Flavobacteria*, *Pseudomonas* y *Aeromonas*, que participan en la hidrólisis de polisacáridos algales como: carboximetilcelulosa, laminarasa, alginasa, carragenasa y agarasa. En *H. coccinea canariensis*, *H. midae* y *H. rufescens* (Albrecht, 1921; Mc Lean, 1970; Gómez-Pinchetti y García-Reyna, 1993; Knauer *et al.*, 1996; Serviere *et al.*, 1997), los jugos digestivos del estómago e intestino llevan a cabo reacciones a pH ácido y son notablemente ricos en enzimas como: catalasas, lactasas, lipasas, proteasas. Cho *et al.* (1983), encontraron que la actividad proteolítica de extractos enzimáticos crudos de tracto digestivo de *H. discus hannai*, es mayor a pH ácido (3.2) o débilmente ácido (5.4).

En *Haliotis rufescens* (abulón rojo), se estudió la estructura primaria de una enzima tipo quimotripsina, determinada por un análisis de la secuencia de nucleótidos del RNA mensajero. Esta enzima fue localizada específicamente y en altas concentraciones en el lumen del cuarto distal del segmento intestinal (Groppe y Morse, 1993).

La presencia de algunas de las enzimas antes mencionadas está relacionada con la dieta suministrada al abulón. Knauer *et al.* (1996), encontraron que en juveniles de *H. midae* alimentados con una dieta artificial, había un gran contenido de proteasas y bajos niveles de amilasa en el intestino, al compararlos con animales que fueron alimentados con diatomeas, sugiriendo la existencia de una relación directa entre la concentración de proteína y la presencia de proteasas. Existen además, algunas evidencias de que la actividad digestiva del abulón se especializa con la edad. Uki y Watanabe (1992), observaron que juveniles de *H. discus hannai* (13 mm) podían digerir más eficientemente carne de pescado tratada térmicamente que organismos de 52 mm, proponiendo que esto puede deberse a una especialización y decremento de la actividad de las proteasas con la edad.

En países con historia en el cultivo de abulón como Japón, se han probado dietas artificiales elaboradas con diferentes fuentes de proteína, encontrando un mayor crecimiento que al utilizar dietas naturales (Wee *et al.*, 1992; Knauer *et al.*, 1996).

Esto se explica por la calidad de la proteína utilizada, observando diferencias en su digestibilidad al ser proporcionadas a abulones juveniles. Las algas tienen un limitado contenido de proteína, lo cual redundo en la baja tasa de crecimiento del abulón (Fleming *et al.*, 1995). En México, poco se conoce sobre los requerimientos nutricionales específicos del abulón. Los estudios nutricionales que se han hecho, han consistido en la medida de la talla producida por alimentación natural como macroalgas, diatomeas y algunas dietas artificiales preferentemente de bajo costo (Viana *et al.* 1993; Viana, 1994; López y Viana 1995).

La mayoría de los estudios en moluscos gastrópodos, específicamente *Haliotis*, de costas mexicanas, están enfocados a su biología, siembra, engorda, dinámica poblacional, fecundidad y madurez gonádica (Guzmán del Proo, 1992, 1994), pero muy pocos de ellos se han enfocado a aspectos bioquímicos, razón por la cual es importante realizar estudios sobre dietas, procesos digestivos y digestibilidad, que pueden tener aplicación en el desarrollo de cultivos de abulón exitosos.

III. JUSTIFICACIÓN

En México se ha consolidado una pesquería de abulón, en torno a la cual gira gran parte de la actividad económica de la región Pacífico de la Península de Baja California. Su cultivo es considerado como una alternativa de producción del recurso. Sin embargo, aún existe desconocimiento en aspectos biológicos como reproducción, digestión del alimento, cultivo de larvas y juveniles, para el desarrollo de cultivos extensivos.

En el cultivo del abulón, existen dos principales problemas relacionados a la construcción de tejidos para el crecimiento: 1) El tiempo y energía que involucra el organismo en alimentarse y procesar una gran cantidad de alimento, debido al contenido de proteínas que tienen las algas y 2) El desconocimiento de la digestión de las proteínas del alimento (Serviere *et al.*, 1997). Esto podría explicar el gran gasto de tiempo y energía que invierte el organismo durante el proceso alimenticio, reflejado en su lento crecimiento, y por otro lado, la necesidad de entender los mecanismos bioquímicos involucrados para la asimilación de aminoácidos y la construcción de tejidos.

En México, se están haciendo intentos para formular dietas artificiales utilizando diferentes fuentes de proteína (Viana *et al.*, 1993; López y Viana, 1995). Sin embargo, es conveniente investigar dietas de origen natural para los diferentes estadios de vida del organismo, así como conocer ampliamente los procesos digestivos que se llevan a cabo, evaluando la participación de las proteasas en la hidrólisis de las proteínas ingeridas con la dieta. El conocimiento de la nutrición del abulón, es esencial para una acuicultura rentable, y la composición del alimento dependerá de cómo el organismo utiliza los componentes de la dieta, es decir, de la bioquímica nutricional y fisiológica de las especies en cultivo.

El planteamiento de esta propuesta de investigación, se sustenta en observaciones preliminares que evidencian la necesidad e importancia de realizar estudios de caracterización de las proteasas en el sistema digestivo del abulón, como la mejor manera de entender cómo estos organismos herbívoros utilizan las proteínas de las macroalgas que consumen. El presente trabajo tiene como finalidad la realización de un estudio descriptivo de las enzimas que participan en la digestión del alimento, en juveniles de abulón azul.

IV. OBJETIVOS

General

Determinar la presencia de proteasas digestivas, su actividad, clasificación y localización en juveniles de abulón azul (*Haliotis fulgens*).

Particulares

1. Adecuar las técnicas para la detección de proteasas digestivas en organismos juveniles de abulón azul (*H. fulgens*).
2. Detectar la presencia de proteasas digestivas en vísceras y hepatopáncreas en juveniles de abulón azul (*H. fulgens*).
3. Describir y clasificar el grupo de proteasas responsables de la actividad proteolítica en vísceras y hepatopáncreas de *H. fulgens*, en la fase juvenil de su desarrollo.
4. Aportar conocimiento de la fisiología digestiva de juveniles de abulón a partir de la identificación de las enzimas que participan en el proceso digestivo.

V. METODOLOGÍA

V.1. ORGANISMOS

Los abulones (*Haliotis fulgens*) fueron proporcionados por el Laboratorio de producción de semilla de la S.C.P.P. "Progreso", ubicado en la Bocana, B. C. S. (Fig. 7). Los organismos fueron alimentados con macroalgas (*Macrocystis pyrifera* y *Eisenia arborea*) o diatomeas, mantenidos en tinas y piletas de concreto, con flujo de agua continuo del medio natural, aireación y a temperatura de 20-25 °C.

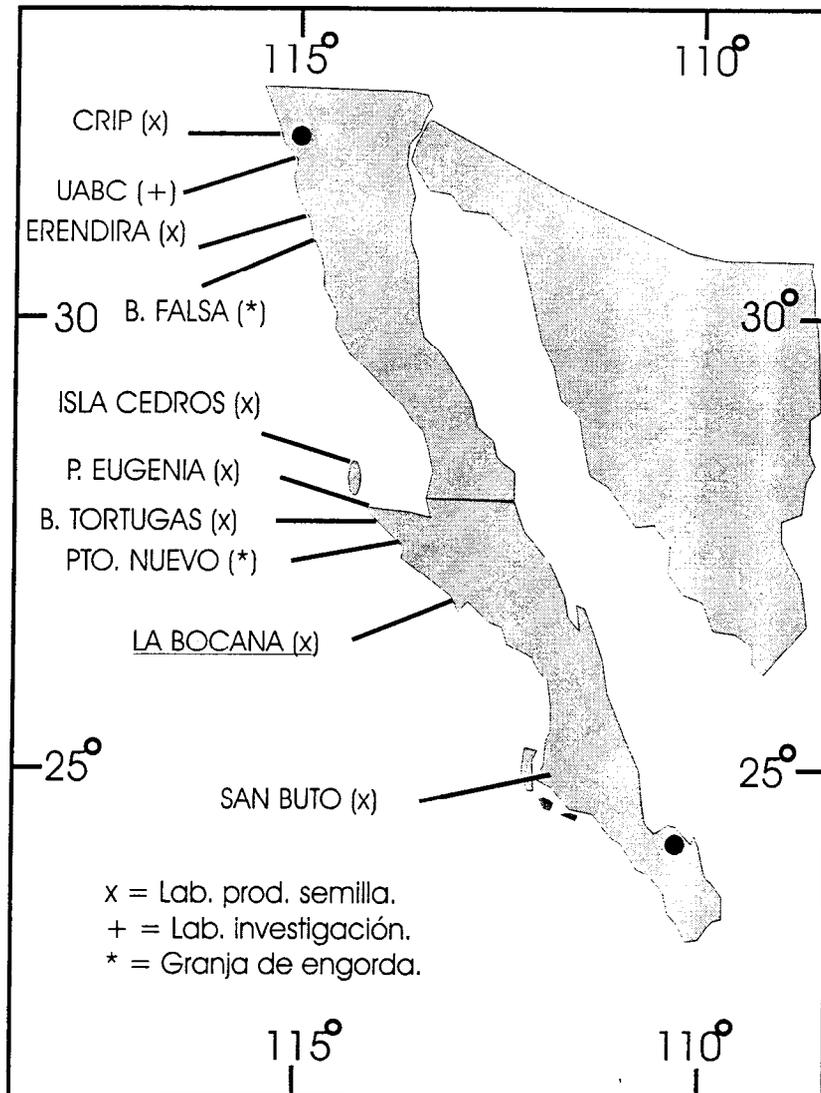


Fig. 7. Ubicación del Laboratorio en La Bocana, B.C.S.
(Salas-Garza y Searcy-Bernal, 1992)

Se seleccionaron organismos juveniles de abulón azul, que se clasificaron en tres grupos de acuerdo a la talla y alimento (Tabla 3).

Tabla 3. Características de los grupos de organismos.

GRUPO y No. DE ORG.	TALLA (mm)	PESO (g)	DESOVE	ALIMENTACIÓN
I. 152	27.95 ± 2.10	2.92 ± 0.70	Nov. 1994	Macroalgas
II. 75	45.00 ± 5.30	10.86 ± 3.06	Nov. 1994	Macroalgas
III.155	27.61 ± 4.73	2.43 ± 0.71	Dic. 1995	Diatomeas

Se sacrificó el número de organismos necesario para efectuar los ensayos programados, lo cual estuvo relacionado con la cantidad de extracto enzimático obtenido por grupo. Se realizó un análisis químico proximal de las macroalgas con las cuales fueron alimentados estos organismos (Anexo 1).

V. 2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Los organismos fueron desconchados y eviscerados sobre hielo. Se hizo la disección del sistema digestivo y se separaron vísceras y hepatopáncreas de cada grupo de organismos. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en hieleras. Los extractos se prepararon por separado: grupo de organismo y tipo de extracto (vísceras o hepatopáncreas), mezclando 1:1 peso/volumen con agua destilada. Las muestras de vísceras y hepatopáncreas fueron homogeneizadas en un Polytron, sobre hielo para evitar desnaturalización y autohidrólisis. Para eliminar residuos alimenticios, material sólido y lípidos, las muestras se centrifugaron por 15 min a 10,500 g a 4 °C en una centrifuga Eppendorff modelo 5403. Los sobrenadantes acuosos fueron recuperados, separados y almacenados en alícuotas de 1 mL y mantenidos en congelación a -30 °C hasta su utilización.

V. 3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

La cuantificación de proteína se hizo de acuerdo al método de Bradford (1976). A 10 μ L de homogeneizado se adicionó 1 mL de reactivo de Bradford. La mezcla se mantuvo por 2 min a 25 °C. La absorbancia fue determinada con un espectrofotómetro Beckman DU 640 a 595 nm contra blanco de reactivo. La concentración de proteína se calculó por interpolación de absorbancias con una curva de calibración preparada con albúmina bovina como estándar, a diferentes concentraciones. Si la concentración de la muestra problema supera 18 mg de proteína, se hacen diluciones de la muestra con agua destilada y se repite el ensayo, multiplicando el resultado por el factor de dilución utilizado.

Las pruebas se hicieron por triplicado para seis diferentes alícuotas de extractos. El análisis estadístico de los datos se hizo por un análisis de variancia anidado de dos niveles (Sokal y Rohlf, 1981), con el objeto de comparar 1) los homogenizados dentro del mismo grupo, 2) los extractos del grupo I contra el grupo II, 3) evaluar los subgrupos (constituidos por el número de réplicas).

V.4. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

La actividad proteolítica de las muestras fue determinada por el método de García-Carreño y Haard (1993), utilizando azocaseína al 1% en amortiguador universal (Stauffer, 1989), a diferente pH (anexo 2). Para determinar las condiciones óptimas de ensayo, se hicieron las siguientes determinaciones:

1°. Con la técnica de García-Carreño y Haard (1993), fueron evaluados concentraciones de 10, 20, 50 y 100 μ g de proteína. Vísceras y hepatopáncreas fueron probados por separado, haciendo una preparación de 0.5 mL de amortiguador universal a 25 °C, en el rango de pH de 2.0 a 12.0 (ajustado con HCl), 0.020 mL del homogeneizado y 0.5 mL de azocaseína al 1%. Esta reacción fue detenida después de 60 min agregando 0.5 mL de una solución de ácido tricloro acético (TCA) al 20%. La mezcla de reacción fue centrifugada en tubos Eppendorff por 5 min a 14,500 g, donde los péptidos solubles en TCA fueron separados del resto del sustrato no digerido, registrando la absorbancia a 366 nm. En los controles, el TCA fue agregado antes que el sustrato. Las unidades de actividad fueron definidas como el cambio de absorbancia (366 nm) por mg de proteína en el ensayo. Se elige la mínima concentración de proteína que pueda detectarse espectrofotométricamente y de resultados reproducibles.

2°. Se determinó el comportamiento del extracto crudo en los diferentes valores de pH.

3°. Escogiendo el pH ácido y alcalino donde se observó la máxima actividad en hepatopáncreas y en vísceras, se hizo una cinética durante 90 min, registrando la actividad a intervalos de 10 min, para conocer el tiempo en el cual la reacción es lineal.

4°. Se observó el efecto en la actividad enzimática al incorporar al amortiguador las siguientes sustancias: 40 milimolar (mM) de CaCl₂, 4 mM de L-Cys con 2 mM de EDTA y NaCl a concentraciones de 0.513, 0.598 y 0.684 M (30, 35 y 40 partes por millón respectivamente).

Los ensayos fueron hechos por triplicado, utilizando dos alícuotas de cada extracto. Para evaluar las diferencias significativas entre los extractos del mismo grupo y del grupo I contra el grupo II, se hizo un análisis discriminante validado con una prueba de Tukey, con el objeto de evaluar el comportamiento de la actividad enzimática en: 1) cada pH probado dentro del mismo grupo, 2) entre cada uno de los grupos y 3) entre los homogeneizados del mismo grupo. En términos de tiempo, el método gráfico es preferido para seleccionar con mayor precisión y demostrar claramente la linealidad de los datos. El efecto de las sustancias incorporadas al ensayo, fueron comparadas con respecto al control dentro de cada grupo, por un análisis de varianza simple (Sokal y Rohlf, 1981).

V.5. ACTIVIDAD TRIPSINA Y QUIMOTRIPSINA

La actividad tipo tripsina fue ensayada utilizando benzoil-Arg-p-nitroanilida (BAPNA) como sustrato, con la técnica de punto final de García-Carreño y Haard (1993). El sustrato fue preparado a una concentración 1 mM, disuelto en 2 mL de DMSO a 37 °C , y aforado a 100 mL con una solución de TRIS-HCl 50 mM con 20 mM de CaCl₂, pH 7.5. La mezcla de reacción fue mantenida a 25 °C durante el periodo de ensayo. A 1.25 mL de sustrato fresco se agregan 0.025 mL de la preparación enzimática. Después de 10 min, fue detenida la reacción con 0.25 mL de CH₃COOH al 30%, y se registraron las lecturas a 410 nm contra blanco de agua. La hidrólisis de BAPNA fue evaluada de acuerdo a Dimes *et al.* (1994), y obtenida con la fórmula:

$$\mu\text{Mol de } p\text{-nitroanilina} = (\Delta A_{410\text{nm}}/\text{min} \times 1000 \times \text{mL mezcla}) / (8800 \times \text{mg de prot.})$$
 liberada/min/mg prot.

donde 8800 es el coeficiente de extinción de la p-nitroanilina (Erlanger, 1961).

Adicional al ensayo de punto final, para determinar actividad tipo tripsina, puede optarse por una cinética a 25 °C registrando durante 5 min el incremento de absorbancia a 410 nm, mezclando 0.010 mL de la preparación enzimática con 1 mL de sustrato y los cálculos se hacen con la fórmula anterior.

La actividad quimotripsina fue ensayada utilizando succinil-(Ala)₂-Pro-Phe-p-nitroanilida (SAPFNA) como sustrato. El ensayo se hizo a 25°C, y la hidrólisis de SAPFNA fue continuamente registrada, como el incremento en la absorbancia a 410 nm. A 0.010 mL de la preparación enzimática fueron agregados 0.690 mL de una solución 0.1 mM de SAPFNA en TRIS-HCl 50 mM con 20 mM de CaCl₂ a pH 7.5. La absorbancia fue registrada durante 5 min. La hidrólisis de SAPFNA fue obtenida por:

$$\mu\text{Mol de } p\text{-nitroanilina} = (\Delta A_{410\text{nm}}/\text{min} \times 1000 \times \text{mL mezcla}) / (8800 \times \text{mg de prot.}) \\ \text{liberada/min/mg prot.}$$

donde 8800 corresponde al coeficiente de extinción de la p-nitroanilina (Erlanger, 1961).

Los ensayos se hicieron por triplicado, tomando de cada uno de los grupos dos alícuotas por homogeneizado utilizado. Para comparar entre la actividad de tripsina y quimotripsina entre los extractos dentro de un mismo grupo, y entre los grupos I y II, se hizo un análisis de varianza anidado de dos niveles (Sokal y Rohlf, 1981).

V.6. ACTIVIDAD DE CARBOXIPEPTIDASA A y CARBOXIPEPTIDASA B

La actividad de carboxipeptidasa A, fue evaluada utilizando el método de Folk y Schirmer (1963). De una solución 1 mM de Hipuril-L-Phe (HLPa) en 25 mM de TRIS-HCl, pH de 7.5, conteniendo 500 mM de cloruro de sodio, fue tomado 1 mL y mezclado con 0.050 mL de la preparación enzimática en LiCl al 10%. El incremento de absorbancia a 254 nm debido a la hidrólisis del sustrato a 25 °C fue registrado durante 3 a 4 min. Las unidades de actividad fueron obtenidas de la relación:

$$\text{U/mg} = (\Delta A_{254\text{nm}} / \text{min}) / (0.36 \times \text{mg enzima} / \text{mL mezcla})$$

Donde 0.36 es el coeficiente de extinción del ácido hipúrico liberado en la reacción (Folk y Schirmer, 1963).

La actividad de Carboxipeptidasa B fue determinada utilizando el método espectrofotométrico de Folk *et al.* (1960). De una solución 1 mM de Hipuril-L-Arg (HLA), en 25 mM de TRIS-HCl, a pH 7.65 con 100 mM de NaCl, se tomaron 1.45 mL y se mezclaron con 0.050 mL de la preparación enzimática. Fue registrado el incremento de absorbancia a 254 nm debido a la hidrólisis del sustrato durante 3 a 4 min, a 25 °C. Una unidad de actividad fue obtenida de la relación:

$$U/mg = (\Delta A_{254nm} / \text{min}) / (0.349 \times \text{mg enzima} / \text{mL de la mezcla}).$$

Donde, 0.349 es el coeficiente de extinción del ácido hipúrico liberado durante la reacción (Folk *et al.*, 1960).

Los ensayos se hicieron por triplicado utilizando dos alícuotas de cada uno de los extractos.

V. 7. ACTIVIDAD FOSFATASA ÁCIDA

La actividad de fosfatasa ácida fue analizada utilizando una solución de fosfato de p-nitrofenilo a pH 4.8, en una solución amortiguadora de citratos. Un volumen de 0.250 mL del sustrato fue incubado en un baño de agua por 5 min a 37 °C. Posteriormente se le agregaron 0.050 mL de la muestra problema, incubando nuevamente por 30 min a 37 °C. La reacción fue detenida con 2.5 mL de NaOH 0.02 N. En el blanco, la incorporación de la muestra problema se hizo hasta el final del ensayo. Se registró la absorbancia a 405 nm ajustando contra blanco de reactivo, considerando que el color es estable 20 min. La actividad de fosfatasa ácida se determinó por interpolación de resultados contra dos curvas de calibración preparadas con una solución estándar de p-nitrofenol 2.7 mM en NaOH 0.02 N, a diferentes concentraciones: en la primera curva se incluyó a la solución estándar, extracto de vísceras, y en la segunda se incorporó extracto de hepatopáncreas. Para hacer el cálculo de actividad de fosfatasa ácida se seleccionó la curva estándar según el extracto a evaluar. Esto se hizo con el objeto de obtener resultados confiables, eliminando el efecto de la turbidez y el color de los extractos. Si la concentración del problema es mayor de 50 mU/mL, se diluye la muestra con agua destilada, se repite la determinación y el resultado se multiplica por el factor de dilución utilizado.

Los ensayos fueron hechos por triplicado utilizando dos alícuotas de extracto. Las diferencias significativas fueron evidenciadas por un análisis de varianza anidado (Sokal y Rohlf, 1981), comparando entre los extractos del mismo grupo y entre los extractos del grupo I contra los del grupo II.

V.8. ACTIVIDAD DE PEPSINA

Fue determinada utilizando hemoglobina al 2% desnaturalizada con urea, siguiendo el método de Anson y Mirsky (1932). La digestión de la hemoglobina es estimada por el color azul que da con el reactivo de fenol, el cual reacciona con la Tyr, Trp y grupos Cys (la Tyr puede utilizarse como estándar). El sustrato fue disuelto en 16 mL de NaOH 1 N, 20 mL de agua y 36 g de urea. Esta mezcla fue mantenida en agitación 1 hr a 25°C, posteriormente se añadieron 4 g de urea y se aforó a 100 mL con agua destilada. El sustrato fue ajustado a pH 2, 3, 4, 5, 6 y 7 con H₃PO₄ 1 M. El ensayo consistió en añadir a 0.25 mL del sustrato incubado a 37°C durante 10 min, 0.050 mL de la mezcla enzimática, incubando la mezcla 10 min mas. La reacción fue detenida con 0.5 mL de TCA al 5%. Los tubos fueron agitados en Vortex Genie-2 y centrifugados por 5 min a 21,600 g. Se extrajeron 0.5 mL del sobrenadante, al que se adicionaron 1 mL de NaOH 1N y 0.3 mL de reactivo de folin 1:3 para desarrollo de color. En los tubos controles, el TCA se agregó antes de la muestra problema. Las lecturas de absorbancia fueron registradas a los 30 min, a 650 nm contra blanco de agua y calculadas en $\mu\text{mol tyr / min / mg}$ contra una curva de calibración de Tyr.

Los ensayos fueron hechos por triplicado utilizando dos alícuotas de muestra. Las diferencias significativas se establecieron por un análisis de varianza de tres vías, donde se interactuó simultáneamente: talla del organismo, tipo de homogenado y pH. Se hizo una comparación entre los extractos del mismo grupo y entre los extractos del grupo I contra los del grupo II.

V.9. ELECTROFORESIS

La separación de proteínas por electroforesis en las preparaciones enzimáticas, se hicieron de acuerdo a:

Una modificación del método de Laemmli (1970), utilizando geles de acrilamida al 12.5 % en un sistema vertical (Hoeffer, San Francisco, Ca). Los extractos enzimáticos fueron diluidos 1:4 en amortiguador TRIS-glicerol-SDS, pH 6.8. Muestras con una concentración de 5 μg de proteína fueron aplicados en cada pozo. En uno de los carriles se colocó 5 μL de marcadores de peso molecular

(Sigma Chem Co, San Louis Missouri, U.S.A.) como referencia. La electroforesis fue realizada a corriente constante de 15 mA, durante 2 hrs y a 4 °C para cada gel, utilizando TRIS-Gly-SDS de pH 8.3 como amortiguador de corrimiento. Para la tinción de proteínas los geles fueron incubados en una solución de tinte preparada con azul de coomassie R 250 0.1 %, 40% de metanol y 10% de CH₃COOH durante 30 min en agitación constante. Posteriormente los geles se colocan en una solución de destintado preparada con 40% de metanol y 10% de CH₃COOH, hasta observar las bandas.

b) En condiciones no desnaturizantes, se hizo una electroforesis ácida siguiendo el método de Reisfeld *et al* (1962). La muestra fue diluida 1:2 en amortiguador preparado con CH₃COOH 0.127 M, KOH 0.12 M a pH 6.8, con 0.01% de azul de metileno. Muestras con 10 µg de proteína fueron colocados en cada pozo. La electroforesis fue realizada a 35 mA (100V) durante 5 hr, utilizando 0.14 M de CH₃COOH y 0.35 M β-Ala a pH 4.5 como amortiguador de corrimiento.

c) En condiciones no desnaturizantes se realizó una electroforesis neutra, donde el gel y los amortiguadores fueron preparados de acuerdo a Williams y Reisfeld (1964). La muestra fue diluida 1:2 en amortiguador de 0.1M TRIS-fosfato pH 5.5, con 20% de glicerol y 0.02% de azul de metileno. La electroforesis fue realizada a 25 mA (100 V) durante 6 hr, utilizando 5 mM de TRIS y 0.62 M Gly a pH 7.0, como amortiguador de corrida.

A. ZIMOGRAMAS

Para observar las zonas de actividad enzimática se siguieron dos métodos:

a) En condiciones desnaturizantes, se siguió el método de García-Carreño *et al* (1993). Después de la electroforesis los geles fueron inmersos en amortiguador universal a pH de 7.5 por 10 min y posteriormente sumergidos en 50 mL de caseína al 2% en el mismo amortiguador, a 5 °C por 30 min, para difundir el sustrato en el gel y reduciendo la actividad enzimática. Con sustrato fresco, los geles fueron incubados a 25 °C por 90 min para la digestión de la proteína del sustrato por las fracciones enzimáticamente activas. Los geles fueron lavados con agua destilada e inmediatamente colocados en la solución de tinte detallada previamente, durante 2 hr. Posteriormente los geles fueron colocados en la solución de destintado descrita anteriormente para contrastar las zonas. Las zonas claras sobre un fondo azul, indican actividad de proteasas y las de un color azul intenso son causadas por el colorante y el sustrato de caseína no digerido.

b) En condiciones no desnaturizantes, independientemente del pH, los geles fueron colocados en una solución de HCl 0.1 M pH 2, durante 15 min. Después fueron inmersos en hemoglobina al 0.25 % en 0.1M de Gly-HCl pH 2.0, durante 30 min a 4 °C. Posteriormente los geles fueron colocados en hemoglobina fresca por 90 min a 37 °C. Los geles se lavaron con agua destilada y fueron fijados durante 30 min en una solución de TCA al 12 % y teñidos utilizando una solución de 0.1 % de azul de coomassie brillante R-250 en 42 % de metanol, 16 % de CH₃COOH y desteñido en una solución de metanol al 40 %, y CH₃COOH al 10 %. Las zonas claras corresponden a la actividad de la enzima .

Los geles fueron secados utilizando un secador Bio-Rad (Modelo 583). Todos los ensayos fueron hechos por triplicado.

B. PESO MOLECULAR

El peso molecular relativo de las proteínas y las proteasas, se determina utilizando marcadores de peso molecular conocidos, haciendo una regresión lineal de los Rf. Los Rf para cada proteína son calculados dividiendo la distancia de la migración de la proteína entre la distancia de migración del colorante. Las proteínas marcadoras utilizadas y sus pesos moleculares (kDa) son: albúmina de suero bovino (66.0), ovalbúmina de huevo de pollo (45.0), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de músculo de conejo (36.0), anhidrasa carbónica de eritrocitos de bovino (29.0), tripsinógeno de páncreas de bovino (24.0), inhibidor de frijol de soya para tripsina (20.0) y α -lactoalbúmina de leche bovina (14.2), todos los marcadores de Sigma Chem. Co.

C. ESTABILIDAD DE LAS PROTEASAS EN DIFERENTE pH

Utilizando una concentración de proteína de 100 μ g del homogeneizado y con el método de García-Carreño y Haard (1993) previamente descrito, se hizo una evaluación del comportamiento de las proteasas de las vísceras en las soluciones amortiguadoras utilizadas en las electroforesis. Se utilizó amortiguador universal y sustrato de azocaseína al 1% a pH 3 como control. Un volumen conocido de cada extracto se incubó en las soluciones amortiguadoras utilizadas para la preparación de los geles y los geles concentradores en las electroforesis: desnaturizante, ácida y neutra. Los amortiguadores probados fueron:

1) Amortiguador universal, pH 3.0

2) 0.5 M de TRIS-HCl a pH 6.8

- 3) 1.5 M de TRIS-HCl a pH 8.8
- 4) 0.376 M de CH₃COOH y 0.06 M de KOH a pH 4.0
- 5) 0.127 M de CH₃COOH y 0.12 M de KOH a pH 6.8
- 6) 0.1 M de TRIS-H₃PO₄ a pH 5.5 y
- 7) 0.07 M de TRIS-HCl a pH 7.5

Los tubos con las soluciones amortiguadoras, fueron mantenidos durante 10 min para adecuar las soluciones a una temperatura entre 20 a 25 °C. A cada tubo se agregó el volumen de vísceras ajustado a las condiciones seleccionadas. A intervalos de 15 minutos, fueron removidas alícuotas de 100 µg de proteína. Las alícuotas se usaron en los ensayos previamente descritos. Los resultados se calcularon en por ciento de actividad residual en el tiempo (Whitaker, 1994) para cada amortiguador.

V.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para hacer el análisis estadístico, se utilizaron los paquetes: Statistica para PCs (Microsoft Co., Tulsa, OK), Quattro Pro para Windows V. 5.0, y el procesador de gráficos Jandel Scientific SigmaPlot.

El análisis estadístico se hizo: 1) entre los extractos de vísceras y hepatopáncreas dentro de cada grupo y 2) entre los grupos I y II por extracto (organismos de diferente talla, provenientes del mismo desove y alimentados con la misma dieta). El grupo III, por tener parámetros no controlados como: distinto desove, diferente alimentación y talla, solo se describe. Para determinar la significancia, y comparar la actividad de proteinasas entre homogeneizados del mismo grupo, y entre homogeneizados del grupo I contra el grupo II, se hizo un análisis discriminante y se aplicó la prueba de Tukey HSD. Se hizo un análisis de varianza anidado para proteína, tripsina, quimotripsina y fosfatasa ácida y un análisis de varianza de tres vías para pepsina (Sokal y Rohlf, 1981). Se realizó un análisis de varianza monofactorial (ANOVA), para validar estadísticamente el efecto de las diferentes sustancias en la actividad proteolítica y un análisis de regresión para las curvas de calibración y las cinéticas. Las pruebas fueron hechas con un 95 % de confianza ($p < 0.05$).

VI. RESULTADOS

Los datos de los análisis químico proximales de las macroalgas con las que fueron alimentados los organismos pueden observarse en el Anexo I.

VI.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

La preparación de los homogeneizados de vísceras y hepatopáncreas de abulón, así como la cuantificación de proteínas fue el primer paso para realizar las determinaciones de actividad proteolítica, las pruebas con sustrato específico y electroforesis.

La absorbancia de las muestras fueron interpolados en una curva de calibración de albúmina, cuya r^2 fue de 0.9968. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

Tabla No. 4. Concentración de proteína (mg/mL).

GRUPOS	ALIMENTO	VISCERAS	HEPATOPANCREAS
I.	MACROALGAS	9.89 ± 0.89	12.12 ± 2.13
II.	MACROALGAS	9.80 ± 0.97	13.30 ± 1.75
III.	DIATOMEAS	10.48 ± 1.72	14.32 ± 0.92

Los valores representan la media de 6 alícuotas hechas por triplicado, y leídas a 595 nm. La desviación estándar va precedida del signo \pm .

La proteína soluble fue menor en vísceras que en hepatopáncreas en todos los grupos. La mayor concentración de proteína fue observada en el grupo III, tanto en vísceras como en hepatopáncreas. En todos los casos, la mayor concentración de proteína se observó en el hepatopáncreas.

Se encontraron diferencias significativas al comparar vísceras contra hepatopáncreas dentro de cada uno de los grupos. Al comparar vísceras del grupo I contra vísceras del grupo II, no hubo diferencia ($p > 0.05$). Tampoco se observó diferencia al comparar hepatopáncreas del grupo I contra el del grupo II.

VI.2. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Se hicieron ensayos de actividad proteolítica utilizando diferentes concentraciones de proteína soluble de extracto enzimático (vísceras y hepatopáncreas), encontrando que la mínima concentración de proteína con la que fue posible detectar actividad enzimática en el espectrofotómetro y con la que se obtuvieron resultados reproducibles, fue con 100 μg de proteína.

a) Efecto del pH

Se determinó la actividad proteolítica a diferentes valores de pH. Los resultados de actividad en vísceras se presentan en la Fig. 8. En el grupo I y III, la mayor actividad se observa en el rango de pH de 2 a 4, y en el grupo II, a pH de 3. Se observa una tendencia a disminuir la actividad proteolítica conforme es aumentado el pH. Un declinamiento en la actividad se presenta en el rango de pH de 5 a 6, manteniéndose relativamente constante en el intervalo de pH de 6 a 12. Más del 75% de la actividad de proteasas se detectó a pH ácido (2 a 4) en los tres grupos, lo que sugiere que la actividad enzimática disminuye al aumentar el pH.

En el grupo I y en el grupo III, no se encontró diferencia significativa en el intervalo de pH de 2 a 4 ($p > 0.05$). En el grupo II, donde la mayor actividad se detectó a pH 3, se hizo una comparación estadística contra la actividad proteolítica obtenida a pH 2 y pH 4 del grupo I, sin registrar diferencia significativa. Analizando estadísticamente la actividad enzimática obtenida en el intervalo de pH de 6 a 12 en los grupos, no se observó diferencia significativa.

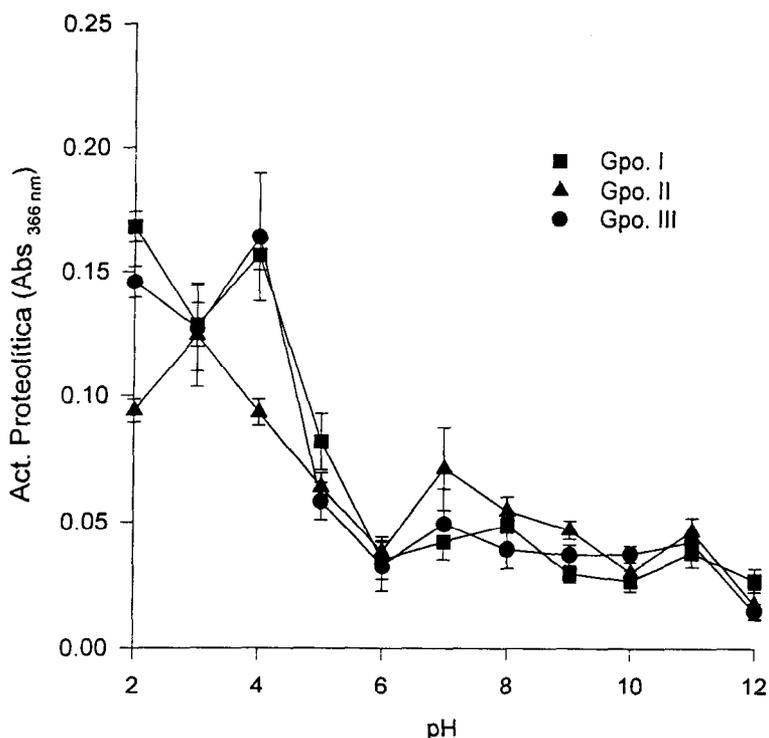


Fig. 8. Efecto del pH en la actividad proteolítica de vísceras.

La actividad proteolítica en el hepatopáncreas a diferente pH, puede ser observado en la Fig. 9. La máxima actividad de los grupos I y II fue encontrada a pH 5, mientras que para el grupo III fue a pH 3. Más del 85% de la actividad se detectó en el rango de pH de 4 a 5 para los grupos I y II, y en el rango de pH de 2 a 4 para el grupo III.

Los hepatopáncreas del grupo I y II tuvieron un comportamiento muy similar, aunque fue detectada mayor actividad de proteasas en el grupo I que en el grupo II, resultando estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). Al analizar la actividad en el intervalo de pH de 2 a 4 del grupo III, no se observó diferencia significativa. En el intervalo de pH de 6 a 10 para cada uno de los grupos, tampoco se observó diferencia.

Al comparar los resultados obtenidos en vísceras con los obtenidos en hepatopáncreas, de cada grupo, se observó diferencia significativa en todos los casos. En los tres grupos, la mayor actividad proteolítica se observó en el pH de 2 a 5, siendo mayor en hepatopáncreas.

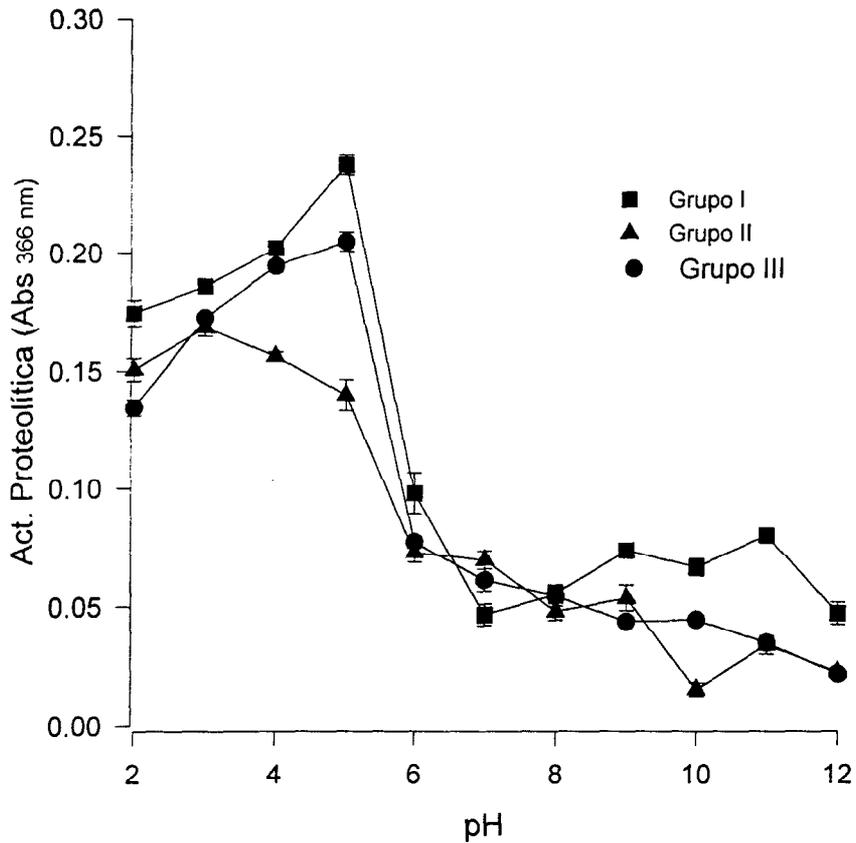


Fig. 9. Efecto del pH en la actividad proteolítica de hepatopáncreas.

Al analizar el comportamiento de los grupos I y II, se observó que siguen una tendencia muy similar en actividad proteolítica a diferente pH. Por lo que se obtuvieron las ecuaciones que describen el comportamiento de cada extracto en ambos grupos, encontrando que la ecuación que lo describe resulta de una regresión de cuarto orden. Para vísceras del grupo I y 2 las ecuaciones son (2 y 3 respectivamente):

$$\text{Act. Visc. I} = -0.00064 x^4 + 0.00443 x^3 - 0.0399 x^2 + 0.114 x + 0.06204;$$

$$r^2 = 0.89$$

Ec. 2

$$\text{Act. Visc. II} = -0.00014x^4 + 0.00369x^3 - 0.0339x^2 + 0.112x + 0.0143 ; \\ r^2 = 0.76$$

Ec. 3

De las ecuaciones 2 y 3 se determinaron los valores máximos y mínimos de actividad, que corresponden matemáticamente al valor del pH donde se observa la mayor o menor actividad proteolítica. En el caso de las vísceras, se encontró que la máxima actividad ocurre en el intervalo de pH de 2.1 a 2.7 y la mínima en el pH de 8 a 8.3. Para hepatopáncreas del grupo I y 2 las ecuaciones son (4 y 5 respectivamente):

$$\text{Act. Hp. I} = -0.00032x^4 + 0.0098x^3 - 0.105x^2 + 0.415x - 0.3256; \\ r^2 = 0.82$$

Ec. 4

$$\text{Act. Hp. II} = -0.000174x^4 + 0.00523x^3 - 0.054x^2 + 0.2002x - 0.0734; \\ r^2 = 0.95$$

Ec. 5

Donde x corresponde al intervalo de pH de 2 a 12.

De las ecuaciones 4 y 5 se determinaron los valores máximos y mínimos de actividad. Para hepatopáncreas se encontró la máxima actividad en el intervalo de pH de 3 a 3.4 y la mínima a pH de 8.5. Estos datos, coinciden con los descritos en la Fig. 8 y 9.

b) Cinética

De acuerdo con los resultados de actividad enzimática obtenidos a diferente pH, se eligió el pH donde se detectó la mayor actividad a pH ácido: pH 2 y 4 para vísceras, pH 5 para hepatopáncreas, y donde se encontró la máxima actividad a pH alcalino: pH 8 y 11 para vísceras y pH 11 para hepatopáncreas, para realizar una cinética de actividad de cada grupo. Con los datos obtenidos se hizo una regresión lineal y se seleccionó el periodo (20 min) en el que la actividad sigue siendo lineal con el tiempo. Los resultados de cada grupo fueron similares, por lo que se ejemplifica con la cinética de actividad para vísceras del grupo I (Fig. 10) y con la cinética obtenida para hepatopáncreas del grupo II (Fig. 11).

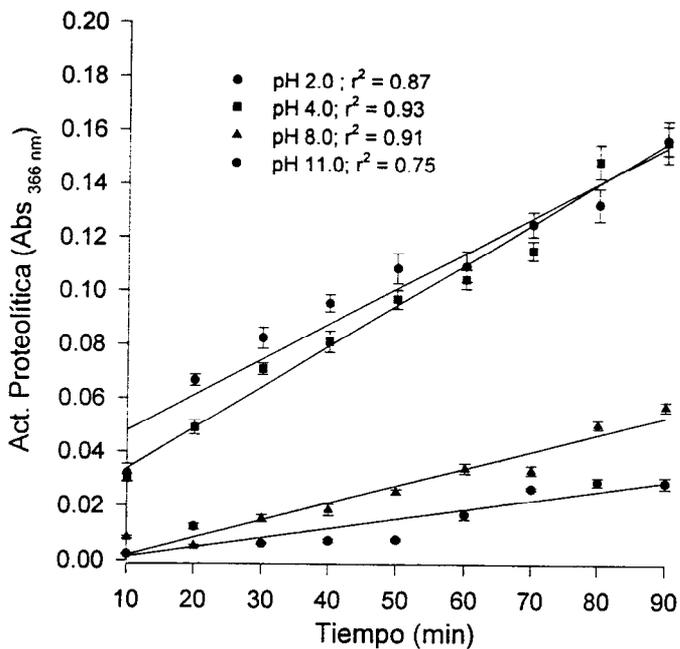


Fig. 10. Cinética en vísceras (grupo I).

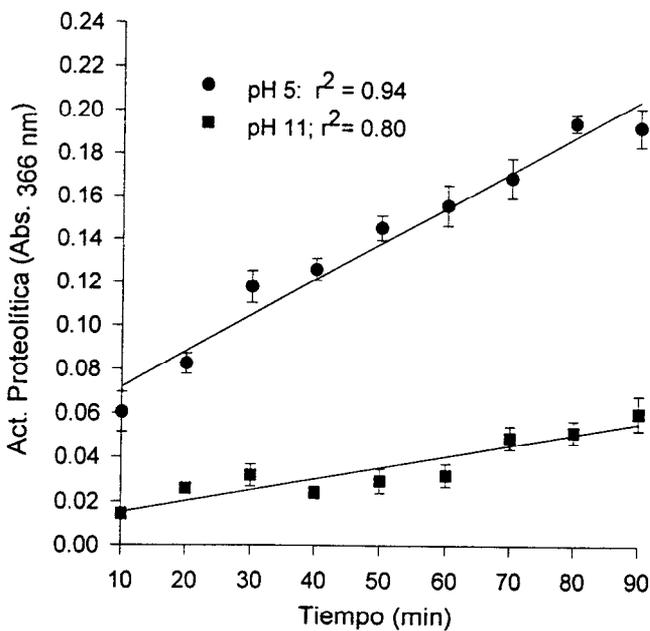
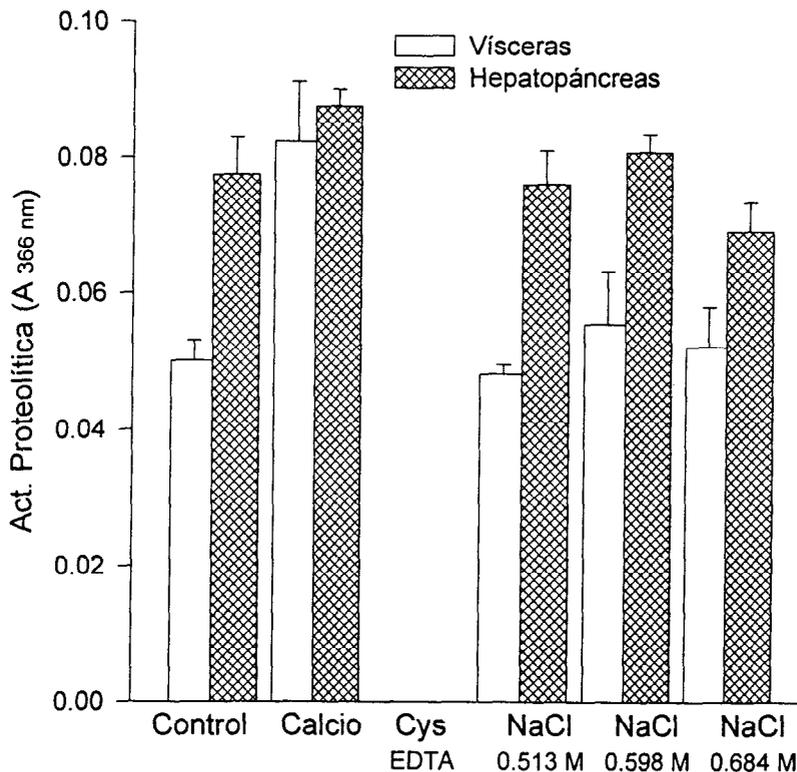


Fig. 11. Cinética en hepatopáncreas (grupo II)

Se observa que tanto en vísceras como en hepatopáncreas, la reacción es lineal hasta los 90 min. Se seleccionó un tiempo de 60 min para los ensayos enzimáticos, con una concentración de proteína de 100 μg , de acuerdo con la experiencia adquirida al realizar actividad enzimática en muestras de organismos adultos de abulón azul, donde el tiempo de ensayo fue de 60 min. Sin embargo, se considera que 20 min serían suficientes para llevar a cabo este ensayo, donde el comportamiento sigue siendo lineal.

c) Caracterización de actividades

De acuerdo con las cinéticas utilizando un tiempo de 20 min, una concentración de proteína de 100 $\mu\text{g/mL}$ y pH de 3, siguiendo la técnica de García-Carreño y Haard (1993), se hizo un ensayo de actividad proteolítica agregando al amortiguador universal, diferentes sustancias para observar su efecto en la actividad enzimática de vísceras y hepatopáncreas. Los resultados obtenidos en los extractos del grupo I se observan en la Fig. 12.



CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE
 CIENCIAS MARINAS
BIBLIOTECA
 I.P.N.
 DONATIVO

Fig. 12. Actividad proteolítica del grupo I con diferentes sustancias.

En el grupo I, en el control se detectó mayor actividad en hepatopáncreas que en vísceras. En las vísceras se observó un incremento del 60% en la actividad al adicionar calcio y en el hepatopáncreas del 10%. Se comparó el efecto del NaCl a las diferentes concentraciones con respecto al control, no encontrando diferencia significativa ($p>0.05$). Con calcio, solo se encontró diferencia en vísceras al comparar con el control. Al utilizar cisteína-EDTA, se inhibe la actividad.

En el grupo II, al igual que en el grupo I, en el control se detecta mayor actividad en hepatopáncreas que en vísceras. Cuando se adicionó calcio, la actividad en vísceras se incrementó hasta en un 200% con respecto al control. El NaCl incrementó la actividad en las vísceras de un 80 a 100%. En el hepatopáncreas, la actividad enzimática disminuyó un 20% con respecto al control, tanto al agregar calcio como con las diferentes concentraciones de NaCl (Fig. 13), observándose incremento en la actividad a medida que se aumentaba la concentración de NaCl. Tanto en vísceras como en hepatopáncreas se inhibe la actividad por acción de la Cys-EDTA.

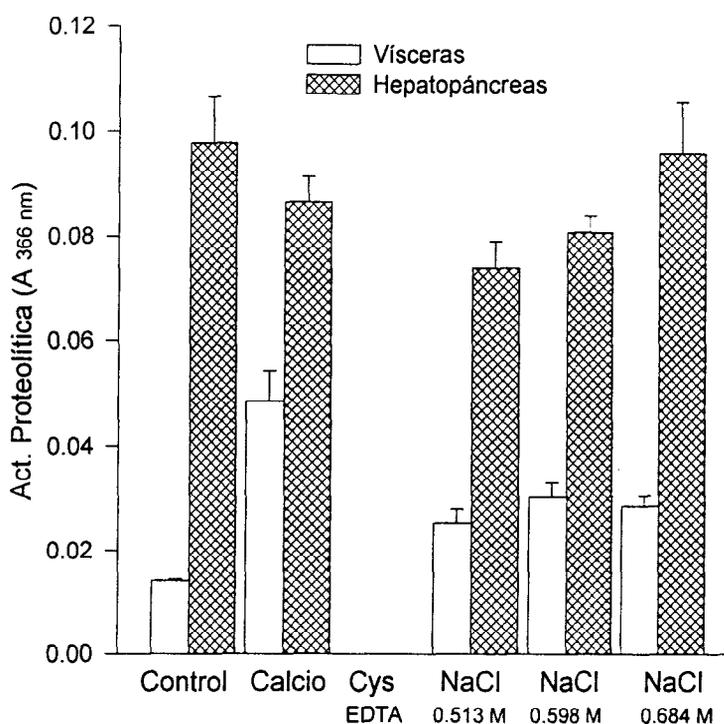


Fig. 13. Actividad proteolítica del grupo II con diferentes sustancias.

En vísceras del grupo II, se registraron diferencias significativas al comparar el control con las diferentes sustancias de prueba ($p<0.05$), observando que la

actividad aumenta con adición de NaCl, siendo máxima a 0.598 M. En el hepatopáncreas, no hubo diferencia estadística por efecto de las sustancias probadas ($p>0.05$), excepto en el caso del NaCl 0.5998 y 0.684 M por el decremento en la actividad.

En el grupo III, la actividad del control en vísceras resultó significativamente menor que la actividad del control en hepatopáncreas. La actividad enzimática en vísceras se incrementó ligeramente por efecto del calcio (15 %) y a medida que se fueron incrementando las concentraciones de NaCl la actividad disminuyó. En el hepatopáncreas, el calcio incrementó la actividad enzimática en un 7 % con respecto al control y con NaCl 0.598 M se observó la mayor actividad. La Cys-EDTA, al igual que en los grupos I y II, inhibió la actividad (Fig. 14).

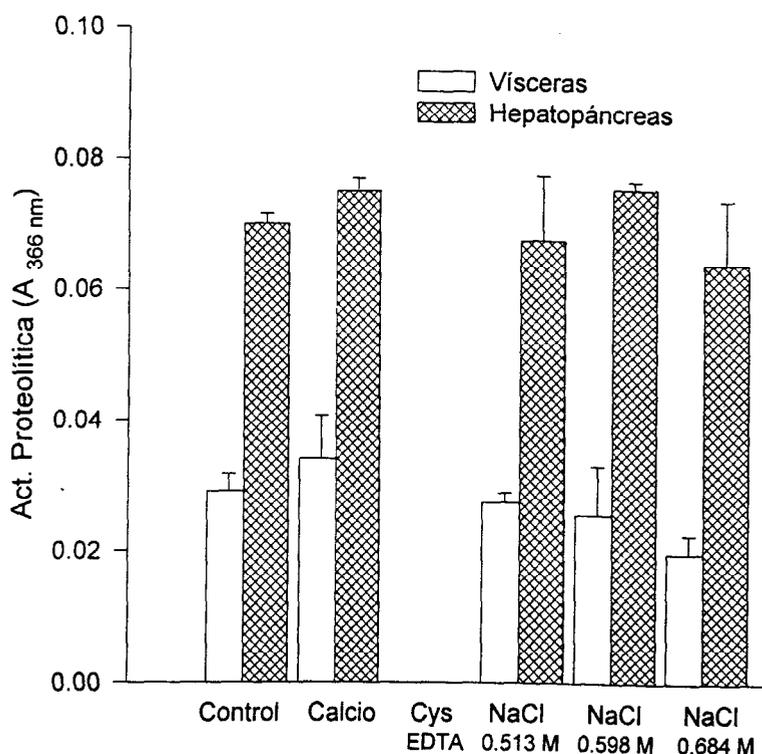


Fig. 14. Actividad proteolítica del grupo III con diferentes sustancias.

Al analizar el control con respecto a las sustancias probadas en vísceras, no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$), a excepción de la adición de NaCl 0.684 M. En el hepatopáncreas estadísticamente no se encontraron diferencias.

VI.3. ACTIVIDAD TIPO TRIPSINA Y QUIMOTRIPSINA.

Se registró actividad tipo tripsina en los grupos ensayados. En el grupo I y II se observa mayor actividad en hepatopáncreas que en vísceras y en el grupo III, el efecto se invierte, encontrándose mayor actividad tipo tripsina en vísceras que en hepatopáncreas (Fig. 15). En el grupo I se observa la mayor actividad tanto en vísceras como en hepatopáncreas, y en el grupo III se registra la menor actividad para el hepatopáncreas.

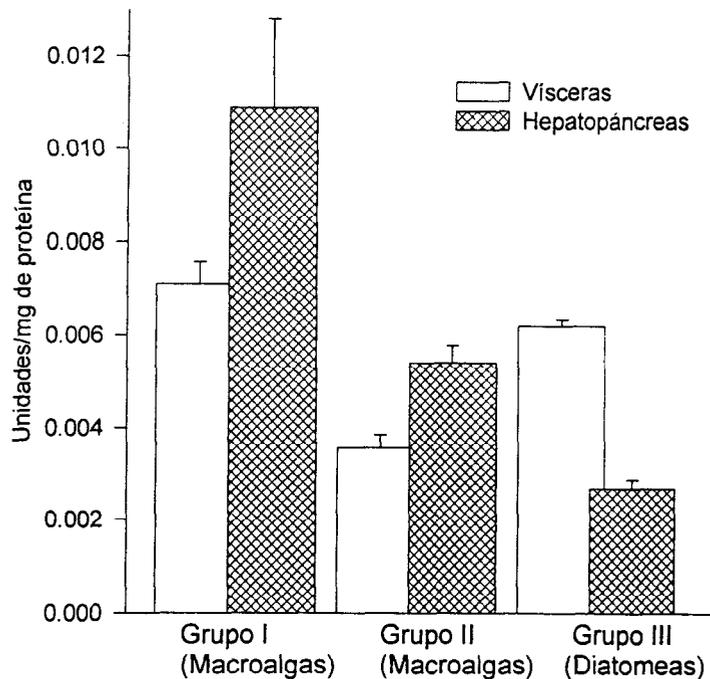


Fig. 15. Actividad tipo tripsina

Al comparar los extractos dentro de cada grupo, se observa que en todos los casos hay diferencia significativa entre vísceras y hepatopáncreas ($p < 0.05$). Al analizar vísceras del grupo I contra las del grupo II, y hepatopáncreas del grupo I contra el del grupo II, resultaron estadísticamente diferentes. Al interior del ensayo, al evaluar el resultado de las repeticiones dentro de cada grupo y para cada extracto no se registró diferencia estadística ($p > 0.05$), lo que indica precisión en el ensayo. En los tres grupos la mayor actividad tanto en vísceras como en hepatopáncreas fue registrada en el grupo I.

Se detectó actividad tipo quimotripsina, observando que en el grupo I y en el grupo II, hay mayor actividad en hepatopáncreas que en vísceras. En el grupo III, el efecto se invierte, encontrándose mayor actividad tipo quimotripsina en vísceras que en hepatopáncreas (Fig. 16), similar al resultado obtenido para tripsina. La mayor actividad tipo quimotripsina en vísceras, se registró en el grupo III y en hepatopáncreas del grupo I.

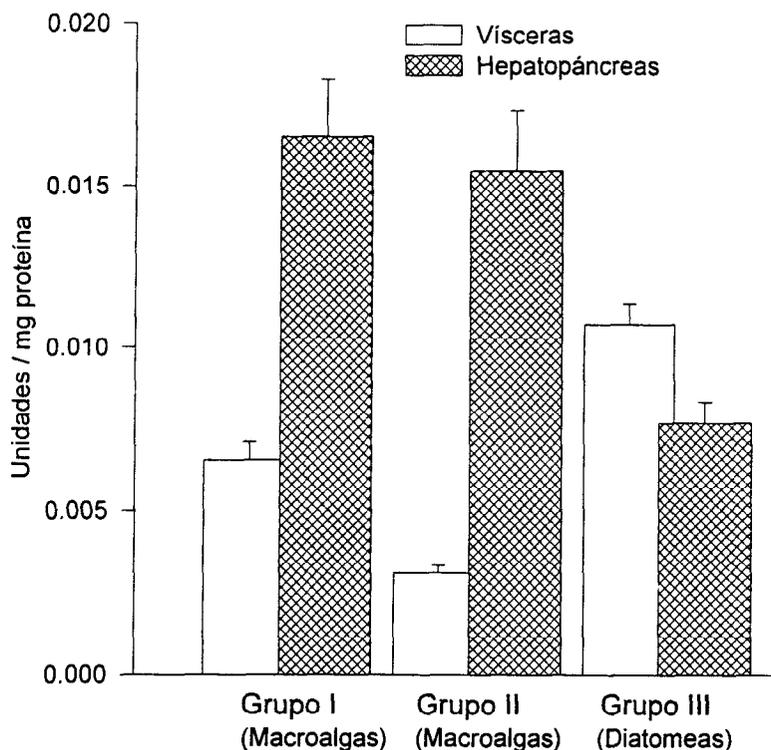


Fig. 16. Actividad tipo quimotripsina

Al comparar vísceras del grupo I contra las del grupo II, resultaron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). En el hepatopáncreas del grupo I contra grupo II no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$). Al interior del ensayo, al evaluar el resultado de las repeticiones dentro de cada grupo y para cada extracto, no se registró diferencia estadística lo que indica precisión en el ensayo. En los tres grupos la mayor actividad en vísceras fue registrada para los organismos del grupo III, y para hepatopáncreas (al igual que en tripsina), fue observada en el grupo I.

VI. 4. ACTIVIDAD DE CARBOXIPEPTIDASA A Y CARBOXIPEPTIDASA B

No se encontró actividad de este tipo de enzimas para ninguno de los extractos evaluados.

VI. 5. ACTIVIDAD DE FOSFATASA ÁCIDA

En la determinación de actividad de fosfatasa ácida para vísceras y hepatopáncreas, se hicieron tres curvas de calibración: 1) utilizando una solución de p-nitrofenol 2.7 mM como control, 2) incorporando al ensayo anterior, una alícuota del extracto de vísceras y 3) agregando extracto de hepatopáncreas. Al hacer el análisis estadístico, se observa que hay diferencias significativas de la curva 1, con la curva 2 y 3, por lo que para realizar los cálculos correspondientes, se utiliza la ecuación obtenida para vísceras y para hepatopáncreas.

Al hacer la regresión lineal con los datos generados, la r^2 de la primera curva fue de 0.9997. Se obtuvieron las ecuaciones de las curvas donde fue incorporado el extracto de vísceras y hepatopáncreas, que sirvieron para calcular la actividad de fosfatasa ácida. Las ecuaciones calculadas son:

a) Vísceras

$$\text{Act. de fosfatasa ácida} = 0.008764 * x + 0.004735, \quad r^2 = 0.9935$$

b) Hepatopáncreas

$$\text{Act. de fosfatasa ácida} = 0.006714 * x + 0.035393, \quad r^2 = 0.9988.$$

Los resultados obtenidos pueden apreciarse en la Fig. 17. En todos los grupos, se observa una mayor actividad de fosfatasa ácida en hepatopáncreas que en vísceras. La mayor actividad de fosfatasa ácida para vísceras se observó en los grupos I y II, y para el hepatopáncreas en el grupo I.

Al analizar vísceras contra hepatopáncreas dentro de cada uno de los grupos, se observaron diferencias significativas entre los extractos ($p < 0.05$), pero no entre las repeticiones de los ensayos. Al comparar vísceras del grupo I contra vísceras del grupo II, no se observaron diferencias, pero sí entre los hepatopáncreas del grupo I contra el grupo II.

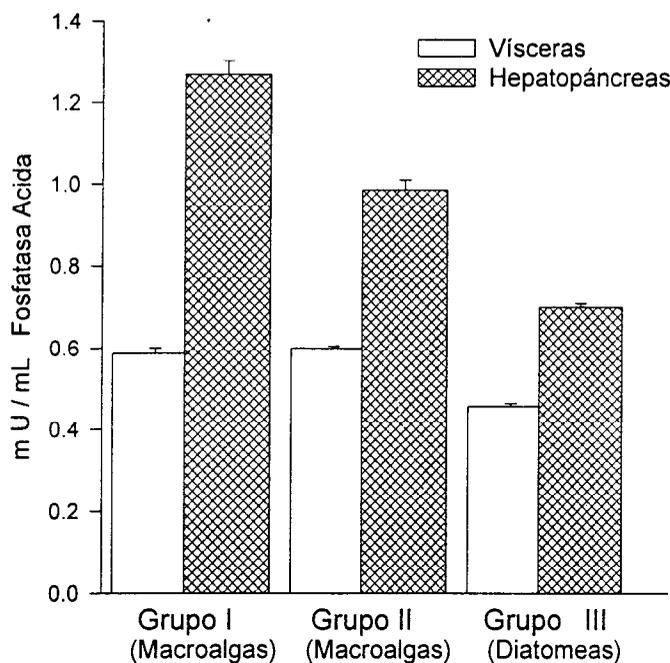


Fig. 17. Actividad de fosfatasa ácida

VI.6. ACTIVIDAD TIPO PEPSINA

Utilizando hemoglobina desnaturalizada al 2% como sustrato, se observó el comportamiento de las vísceras en los grupos (Fig. 18). La mayor actividad de pepsina se observa en el grupo I y la menor en el grupo II. En el grupo I la mayor actividad se observa a pH de 3; en el grupo II, en el rango de pH de 2 a 4 y en el grupo III, la mayor actividad se detecta a pH 4. En esta figura se observa que la mayor actividad de pepsina se encuentra en el intervalo de pH de 2 a 4 para todos los grupos, experimentando una declinación en la actividad a pH 5.

No se encontraron diferencias significativas en la actividad de pepsina en el intervalo de pH 2 a 4 en los grupos II y III. Al comparar estadísticamente vísceras del grupo I y contra las del grupo II, se encontraron diferencias.

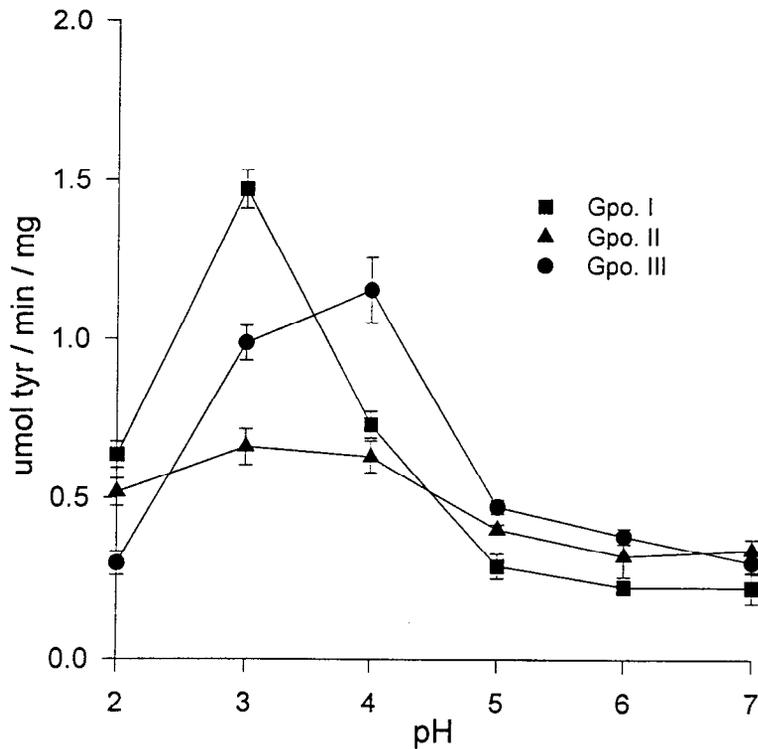


Fig. 18. Actividad de pepsina en vísceras.

La actividad tipo pepsina determinada en el hepatopáncreas para todos los grupos, se presenta en la Fig.19. En el grupo I, se presenta una mayor actividad a pH 4. En el grupo II y III, la mayor actividad se observó en el pH de 3 a 4. La mayor actividad de pepsina en hepatopáncreas se registró en el grupo III. En todos los casos, la actividad disminuyó a pH de 5.0.

En los grupos II y III, al comparar la actividad obtenida a pH 3 con la de pH 4, no se encontró diferencia significativa. Al comparar estadísticamente el grupo I y el II, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$). Independientemente de la actividad de pepsina detectada, el comportamiento en los grupos tiene una tendencia similar.

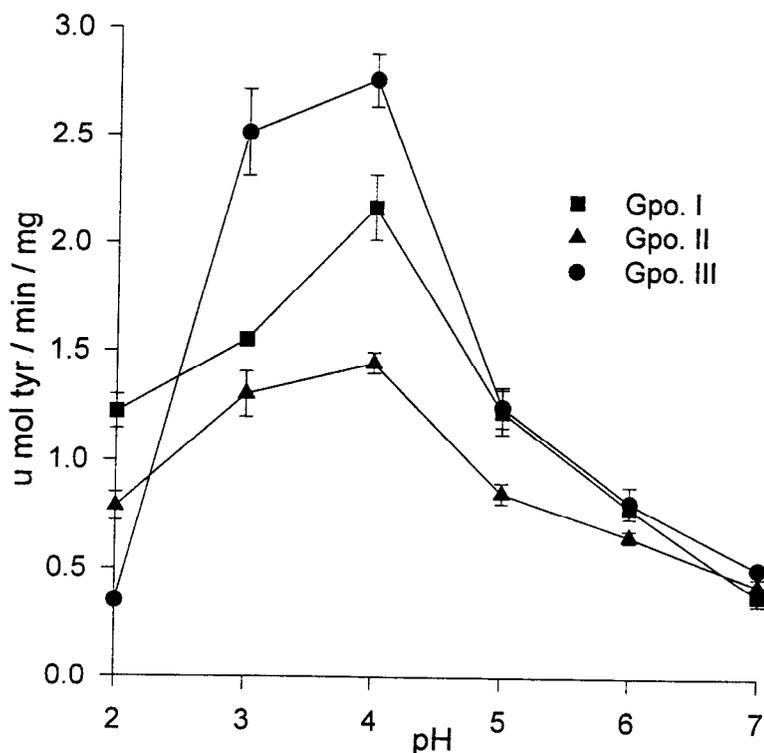


Fig. 19. Actividad de pepsina en hepatopáncreas.

VI.7. COMPOSICIÓN DE PROTEÍNAS EN EXTRACTOS ENZIMÁTICOS

La composición de proteínas en los extractos de *H. fulgens*, fue determinada utilizando el método SDS-PAGE. Los resultados pueden observarse en la Fig. 20.

En las vísceras de los tres grupos, se detectó una banda de 46 a 48 KDa y en el hepatopáncreas de los tres grupos una banda de 72 a 77 KDa. En los extractos de las vísceras del grupo I y II, se detectaron bandas de 70 a 72, y de 76 a 77 KDa.. En el hepatopáncreas, tanto en el grupo I como en el II, se detectó una banda de 47.5 KDa.. Tanto en vísceras como hepatopáncreas de los tres grupos, se detectaron bandas, a 75, 30 a 38 y de 21 a 22 KDa.

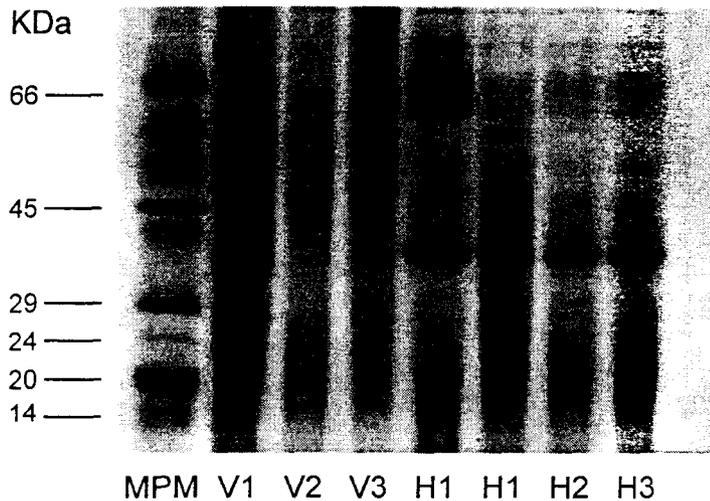


Fig. 20. Composición de proteínas por SDS-PAGE. MPM, marcadores de peso molecular; V1, vísceras del grupo I; V2, vísceras del grupo II; V3, vísceras del grupo III; H1, hepatopáncreas del grupo I; H2, hepatopáncreas del grupo II y H3, hepatopáncreas del grupo III. Los volúmenes fueron ajustados a 5 μg de proteína, para vísceras y hepatopáncreas.

VI.8. COMPOSICIÓN DE PROTEINASAS EN EXTRACTOS ENZIMÁTICOS

Los zimogramas no revelaron bandas de actividad de proteasas en los extractos de ninguno de los grupos, por lo que la composición de proteasas utilizando el método de SDS-PAGE en estas condiciones, no pudo ser detectada (Fig. 21). Se hicieron pruebas incrementando la concentración de proteína de 5, 10 y hasta 50 μg , sin obtener mejores resultados.

Posteriormente, se procedió a realizar una electroforesis no desnaturante a pH neutro, sin lograr obtener bandas que indicaran la actividad de las proteinasas por hidrólisis del sustrato de hemoglobina utilizado, como se observa en la Fig. 22. Las corridas electroforéticas fueron hechas utilizando 5 y 10 μg de proteína. En este ensayo, se observó una lenta migración del colorante utilizado, por lo que la corrida electroforética se prolongó por 6 horas.

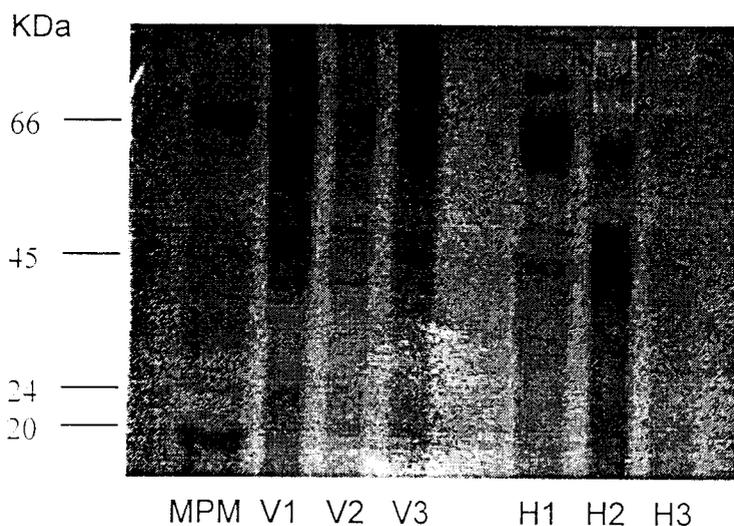


Fig. 21. Electroforesis desnaturizante por SDS-PAGE. MPM, marcadores de peso molecular; V1, vísceras del grupo I; V2, vísceras del grupo II; V3, vísceras del grupo III; H1, hepatopáncreas del grupo I; H2, hepatopáncreas del grupo II y H3, hepatopáncreas del grupo III. Los volúmenes fueron ajustados a 10. μ g de proteína, en vísceras y hepatopáncreas.

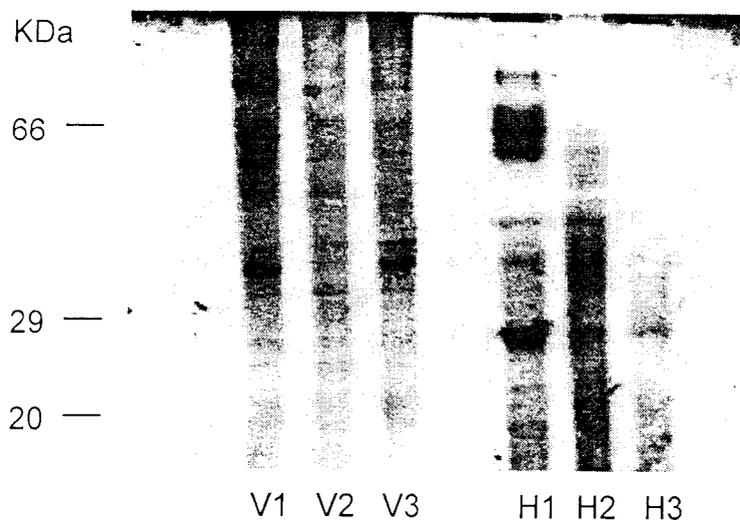


Fig. 22. Electroforesis no desnaturizante a pH neutro. Vísceras del grupo I; V2, vísceras del grupo II; V3, vísceras del grupo III; H1, hepatopáncreas del grupo I; H2, hepatopáncreas del grupo II y H3, hepatopáncreas del grupo III. Los volúmenes fueron ajustados a 10 μ g de proteína, en vísceras y hepatopáncreas.

Se probó un sistema de electroforesis ácida, para revelar actividad de proteasas, obteniendo el mismo resultado que en la electroforesis a pH neutro, tanto en vísceras como en hepatopáncreas. La hidrólisis del sustrato de hemoglobina no pudo observarse (Fig. 23). El tiempo de corrida electroforética fue de 5 hrs.

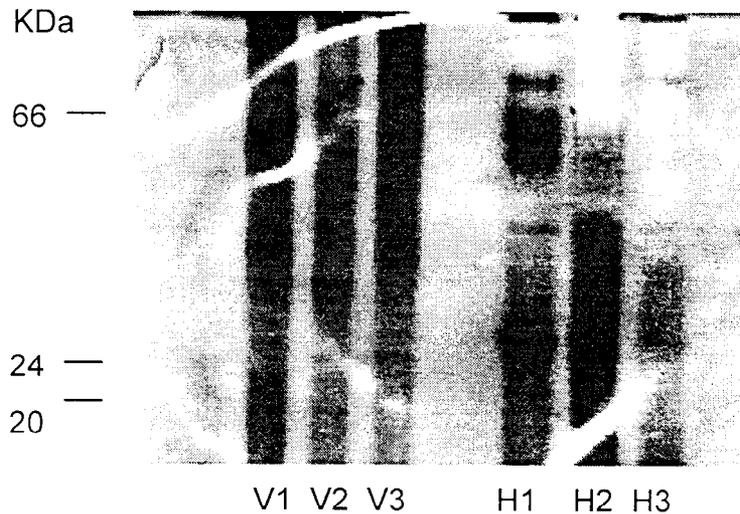


Fig. 23. Electroforesis no desnaturalizante a pH ácido. V1, vísceras del grupo I; V2, vísceras del grupo II; V3, vísceras del grupo III; H1, hepatopáncreas del grupo I; H2, hepatopáncreas del grupo II y H3, hepatopáncreas del grupo III. Los volúmenes fueron ajustados a 10 μ g de proteína, en vísceras y hepatopáncreas.

VI.9. EFECTO DEL pH SOBRE LA ESTABILIDAD DE LAS PROTEASAS

Los extractos enzimáticos fueron probados utilizando los amortiguadores empleados en cada uno de los métodos electroforéticos. Para las vísceras del grupo I, los resultados pueden apreciarse en la Fig. 24. El ensayo se hizo durante 1 hora, observando que en el control, el porcentaje de actividad residual fue disminuyendo paulatinamente hasta reducir un 10 % su actividad al término del ensayo. Sin embargo, el comportamiento de las proteasas de las vísceras del grupo I con los amortiguadores utilizados en la electroforesis desnaturalizante, redujeron su actividad durante los primeros 15 min hasta un 24 %, perdiéndola totalmente a los 30 min con el amortiguador de pH 8.8. Con el amortiguador del gel concentrador de pH 6.8, la actividad residual disminuyó el 35 % al final del ensayo. En los amortiguadores de la electroforesis no desnaturalizante a pH ácido (pH 4.0 y 6.8), la actividad registrada a los 60 min fue del 36 al 40 % con

respecto al control. En los amortiguadores de la electroforesis no desnaturizante pH neutro, con pH de 5.5 y de 7.5, la actividad disminuyó a un 40 y 55 % respectivamente con respecto a la actividad inicial. Considerando los tiempos de ensayo tan prolongados mantenidos durante la electroforesis ácida, como en la electroforesis neutra, se puede inferir que la actividad de las enzimas contenidas en el extracto haya disminuido aún más.

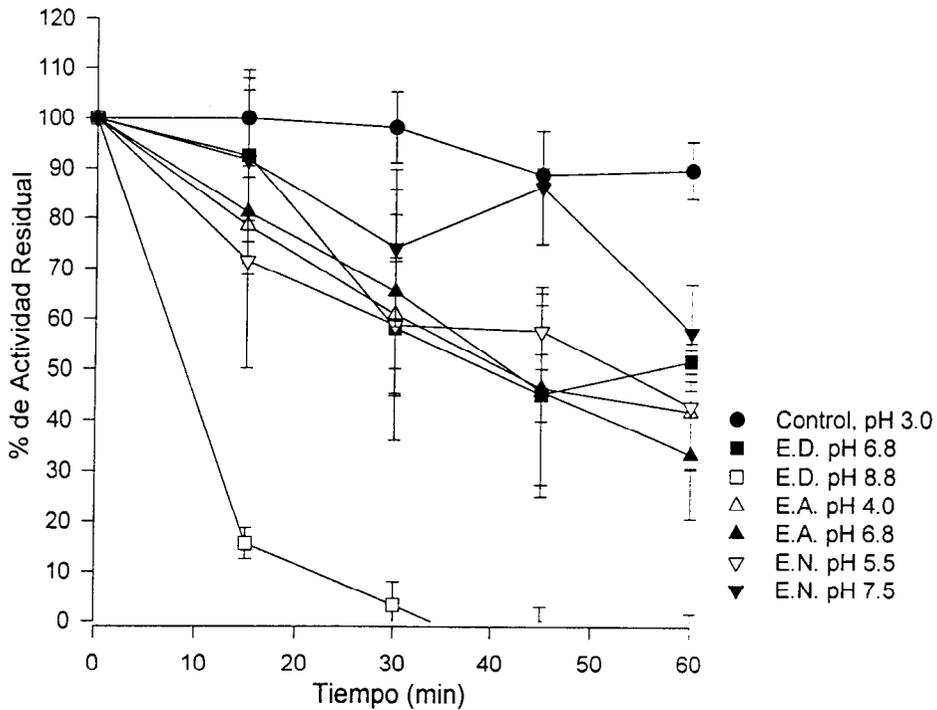


Fig. 24. Efecto del pH sobre la estabilidad de las proteasas de las vísceras del grupo I. E.D., amortiguador utilizado en la electroforesis desnaturizante; E.A., amortiguador utilizado en la electroforesis ácida y E.N. amortiguador utilizado en la electroforesis neutra.

En el grupo II (Fig. 25), la actividad proteolítica del control durante el tiempo de ensayo, disminuyó entre un 2 a 4 %. Sin embargo, al utilizar los amortiguadores de la electroforesis desnaturizante, a pH 6.8, la actividad disminuyó manteniendo un 65 % de la actividad inicial; a pH 8.8 la actividad en los primeros 15 min disminuyó hasta un 90 %, y a los 30 min hasta un 96 % de la actividad inicial, siendo imperceptible a los 45 min. En los amortiguadores utilizados en la electroforesis no desnaturizante a pH ácido, tanto en el amortiguador de pH 4 como en el de pH 6.8, la actividad se redujo un 30 %, manteniendo solo entre un 65 a 70 % de la actividad inicial. En los amortiguadores utilizados en la

electroforesis no desnaturizante a pH neutro, a pH 5.5 se mantuvo el 90 % de la actividad y a pH 7.5 solo el 45 %.

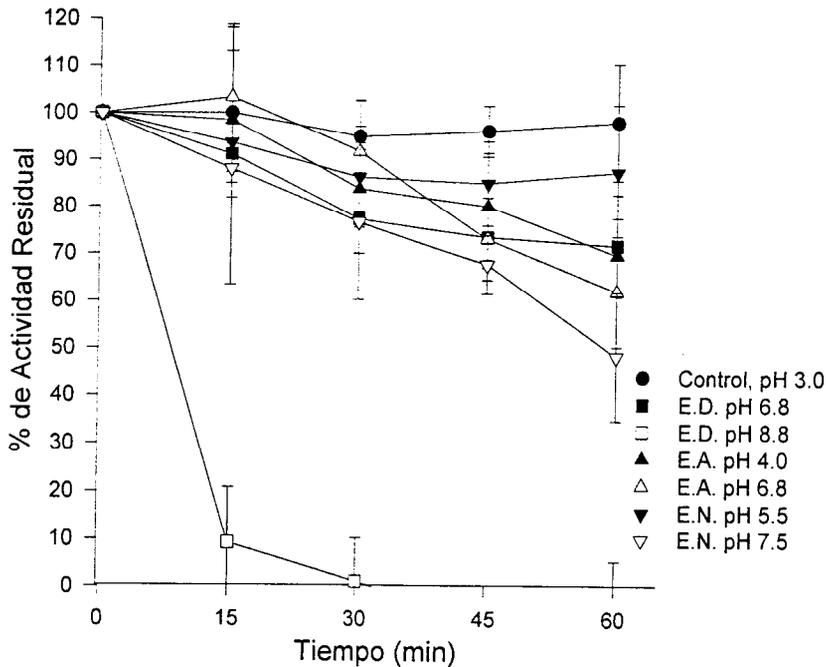


Fig. 25 Efecto del pH sobre la estabilidad de las proteasas de las vísceras del grupo II. E.D., amortiguador utilizado en la electroforesis desnaturizante; E.A., amortiguador utilizado en la electroforesis ácida y E.N. amortiguador utilizado en la electroforesis neutra.

En el grupo III, la actividad residual del control durante el tiempo de ensayo fue del 94 %. Sin embargo, al analizar la actividad con los amortiguadores utilizados en cada uno de los sistemas de electroforesis, en el amortiguador de pH 6.8, de la electroforesis desnaturizante la actividad fue disminuyendo poco a poco hasta ser imperceptible al término del ensayo; a pH 8.8, la actividad no fue detectada. Con los amortiguadores de la electroforesis ácida, a pH 4.0 y 6.8, la actividad enzimática durante los primeros 15 a 30 min se redujo hasta en un 50 %, y a los 60 min la actividad residual detectada llegó a ser solo del 20 %. En el caso de los amortiguadores de la electroforesis neutra, a pH 5.5 la actividad residual detectada al término del ensayo fue del 10 %, y a pH 7.5 del 35 %.

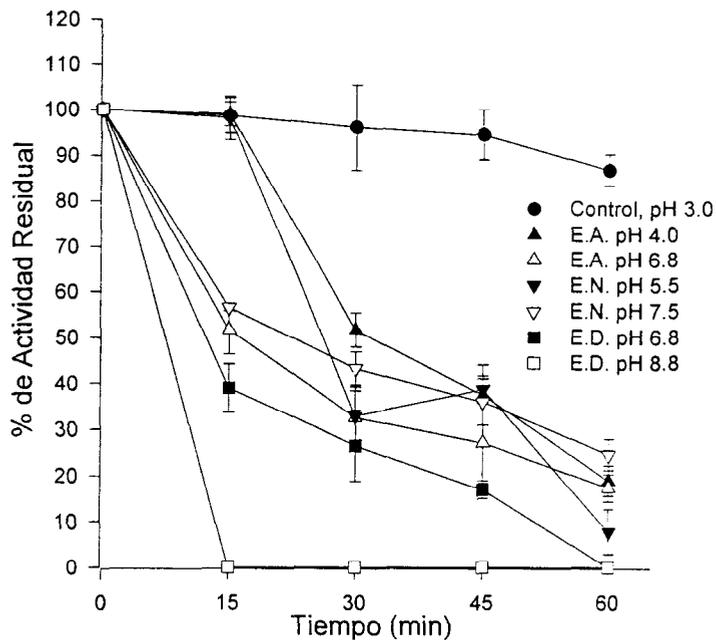


Fig. 26. Efecto del pH sobre la estabilidad de las proteasas de las vísceras del grupo III. E.D., amortiguador utilizado en la electroforesis desnaturalizante; E.A., amortiguador utilizado en la electroforesis ácida y E.N. amortiguador utilizado en la electroforesis neutra.

Con los resultados obtenidos en estos sistemas de electroforesis se observó que la participación del detergente en el sistema SDS-PAGE, así como el pH de las electroforesis neutra y ácida, impidieron la acción de las enzimas que fueron detectadas en tubo a pH ácido. Por lo que puede asumirse que el pH de estas electroforesis pueden tener efecto directo sobre las proteasas de los extractos.

Al comparar los resultados de la actividad proteolítica del control, con los resultados obtenidos en los extractos, bajo las mismas condiciones de ensayo al inicio de la etapa experimental del trabajo de tesis (ocho meses antes), se observa que por efecto del almacenamiento, la actividad enzimática se reduce de un 50 a 60 % en el grupo I y II y en un 70 % para el grupo III, lo que puede relacionarse con el poco éxito en el revelado de la actividad de proteasas en los sistemas electroforéticos utilizados.

Las enzimas de juveniles de abulón, mantienen el 80 % de la actividad residual con los amortiguadores de la electroforesis desnaturalizante (con un 10 % de

SDS) solo en los primeros 15 min, llegando a tener actividad nula en los siguientes intervalos de tiempo, por lo que el detergente utilizado en el sistema SDS-PAGE, pudiera reducir significativamente la actividad de los extractos de vísceras. Esto puede ser explicado por las características disociantes del SDS, que no permite recuperar ni total ni parcialmente la actividad de proteasas al tratar de renaturalizar con lavados a pH ácido, lo cual es posible con las proteasas alcalinas. Con los amortiguadores de la electroforesis no desnaturizante a pH neutro, solo en el caso de los grupos I y II, se recupera entre el 40 y 50 % de actividad, pero en el grupo III, solo es posible detectar un 15 % de la actividad residual al término del ensayo. Para los amortiguadores de la electroforesis no desnaturizante a pH ácido, en los grupos I y II la actividad residual es del 30 al 40 %, pero en el grupo III es solo del 10 al 20 %.

VII. DISCUSIÓN

El promedio de proteína soluble determinada para vísceras y hepatopáncreas, fue similar para los tres grupos evaluados, con una concentración media de 10 y 13 mg/mL respectivamente. El mayor contenido de proteína fue encontrado en las vísceras y en el hepatopáncreas de los organismos del grupo alimentado con diatomeas. En los organismos alimentados con macroalgas, no se encontraron diferencias significativas en cuanto al contenido de proteínas, aún cuando los organismos eran de diferente talla. Estos resultados son menores a los obtenidos en hepatopáncreas de adultos de abulón azul, donde la concentración de proteína fue de 25 mg/mL (Serviere *et al.*, 1997). Se sugiere que existe una demanda de proteína del organismo por unidad de peso corporal, explicando con ello, la diferencia en el contenido de proteína entre adultos y juveniles. El contenido de proteínas en el postesófago, estómago e intestino, derivan del alimento, restos de tejidos y secreciones (Reid, 1978), por lo que los resultados están directamente relacionados con la dieta ingerida.

La actividad proteolítica en juveniles de abulón azul fue detectada en vísceras y hepatopáncreas, observando mayor actividad proteolítica en el hepatopáncreas. Albrecht (1923) y Mc Lean (1970), reportaron la presencia de enzimas proteolíticas en secreciones hepatopancreáticas de gastrópodos. Encontraron que las enzimas del hepatopáncreas de moluscos son las mismas que se encuentran presentes en el canal alimentario. Estos estudios soportan la hipótesis de que las enzimas son producidas en el hepatopáncreas y son secretadas al interior del tracto digestivo. Al determinar actividad proteolítica a los grupos experimentales, la mayor actividad fue detectada en organismos del grupo I en ambos extractos, y la menor en el grupo II. Knauer *et al.* (1996), encontraron que juveniles de *H. midae* alimentados con diatomeas y dietas artificiales, exhiben diferente actividad de lipasas, amilasas y proteasas. Observaron que si el organismo se alimenta con diatomeas, los niveles de amilasa en el intestino se incrementan, y con dietas artificiales se secreta un gran contenido de proteasas, sugiriendo una dependencia de proteína como recurso energético. Al comparar los resultados de actividad de juveniles con los obtenidos en adultos de abulón, los hepatopáncreas de juveniles tuvieron menor actividad que los de las hembras, pero mayor actividad que los machos. Las diferencias observadas entre los grupos estudiados, puede estar relacionada no solo con la edad del organismo, sino también con la alimentación. Al respecto, se ha investigado la actividad endógena de carbohidrasas en el hepatopáncreas de organismos juveniles de *H. midae*, alimentados con diferentes macroalgas, con el objeto de observar la variación en la actividad de polisacaridas. Estos ensayos enzimáticos fueron llevados a cabo en hepatopáncreas de abulones tratados con antibiótico, para compararla con la actividad de la microflora entérica y sin ella, concluyendo que las bacterias podrían influir en la digestión y que el hepatopáncreas es capaz de

secretar carragenasas, laminarasas, alginasas, agarasas y celulasas; y de acuerdo a la dieta suministrada, hay una variación en la producción del paquete enzimático, (Erasmus, 1996; Erasmus *et al.*, 1997).

Más del 75 % de la actividad proteolítica en vísceras fue detectada en el intervalo de pH de 2 a 4. En los hepatopáncreas, los resultados fueron similares a los de las vísceras, detectando que en organismos de la misma talla, más del 85 % de la actividad se encontró en un pH de 4 a 5, y para el grupo de organismos más grandes, el 85 % de la actividad fue determinada en el rango de pH de 2 a 4, lo cual sugiere la presencia de una mayor cantidad de enzimas activas a pH ácido. La actividad proteolítica obtenida en el intervalo de pH de 6 a 12, para los extractos de vísceras y hepatopáncreas probados, resultó significativamente menor que la obtenida a pH ácido, lo que puede indicar la presencia de otra clase de enzimas. Cho *et al.* (1983), determinaron que en extractos crudos de tracto digestivo de *Haliotis discus hannai* la actividad proteolítica máxima se observa a pH 3.2. En hepatopáncreas de adultos de abulón azul, se detectó la mayor actividad de proteasas a pH de 5, y para postesófago, intestinos y recto en el rango de pH de 7 a 11 (Serviere *et al.*, 1997). Por lo que los resultados obtenidos en tracto digestivo de juveniles y adultos, sugiere una variación ontogenética del paquete enzimático.

Por otro lado, la descripción matemática del comportamiento de vísceras y hepatopáncreas de los grupos alimentados con macroalgas, en el intervalo de pH de 2 a 12, mostró que la actividad proteolítica máxima en vísceras se encuentra entre el pH de 2.1 a 2.7, con actividad mínima entre pH de 8 a 8.3. Para el hepatopáncreas la máxima actividad se detectó en el intervalo de pH 3 a 3.4 y un punto mínimo a pH 8.5. Estos cálculos matemáticos fueron compatibles con los descritos para cada ensayo. Mc Lean (1970), reportó que el pH óptimo de actividad proteolítica en *H. rufescens*, es diferente entre los fluidos de las glándulas salivales, glándula intestinal media y el postesófago, determinando que las glándulas salivales actuaban a pH entre 6.6 y 6.8; la glándula intestinal media a pH de 4.0; el postesófago resultó fuertemente proteolítico en el intervalo de pH de 5.4 a 5.8. Estos resultados, permiten inferir que la desnaturalización e hidrólisis ácida no es del todo suficiente para la eficiente digestión proteica, por lo que es necesaria la participación de enzimas con actividad a diferente pH.

El efecto de algunas sustancias químicas sobre la actividad proteolítica de extractos enzimáticos crudos de tracto digestivo y hepatopáncreas, mostraron de manera general, que el calcio incrementa la actividad proteolítica; la Cys-EDTA la inhibe y solo en el caso de los organismos más grandes, se observa un incremento en la actividad al agregar NaCl 0.684 M (40 ppm). Cho *et al.* (1983), reporta que en *H. discus hannai* la actividad proteolítica se ve facilitada por la participación de cationes divalentes como el Mn^{+2} . Similares resultados reportó Hernández-Santoyo (1995), observando que el EDTA causó una reducción de la

actividad del 90%, en extractos de vísceras de adultos de *H. fulgens*. Se infiere que al utilizar EDTA, se secuestra el ión metálico que está involucrado en la catálisis enzimática, desestabilizando la estructura de las enzimas impidiendo su participación sobre el sustrato proteico.

La actividad proteolítica se ha descrito en adultos de otras especies de abulón (Mc Lean, 1970; Cho *et al.*, 1983; Hernández-Santoyo, 1995; Erasmus 1996 y Serviere *et al.*, 1997), pero la identificación de las clases de enzimas es limitada. La actividad de tripsina y quimotripsina se determinó en los extractos de juveniles utilizando sustratos sintéticos específicos. No se encontraron referencias que permitieran comparar la actividad de las enzimas obtenidas con juveniles, pues los escasos ensayos reportados han sido con adultos. Los resultados de estos ensayos, muestran que la actividad quimotripsina y tripsina en vísceras y hepatopáncreas fueron similares entre los grupos alimentados con macroalgas. Los resultados de quimotripsina y tripsina obtenidos en el grupo alimentado con diatomeas, fueron menores a los de los otros grupos. La mayor actividad de estas enzimas, se encontró en hepatopáncreas. Este resultado contrasta con los obtenidos por Serviere *et al.* (1997), que no encontraron actividad tipo tripsina y quimotripsina en el hepatopáncreas de adultos de abulón azul, pero sí en el intestino y el recto. Groppe y Morse (1993), encontraron gran actividad de quimotripsina en el cuarto distal del intestino de *H. rufescens*, y mencionan que estas enzimas, pueden ser secretadas por las células epiteliales de intestino o bien, secretadas por el hepatopáncreas y transportadas al tracto gastrointestinal en el lumen intestinal. El significado fisiológico del radio de actividad enzimática en abulón permanece desconocida. De acuerdo al hallazgo de Groppe y Moore (1993) en adultos, los segmentos intestinales en organismos juveniles son inmaduros y muy pequeños lo que puede estar directamente asociado con la escasa participación de este tipo de enzimas. Además, en lo que respecta a las enzimas intestinales, éstas presentan el óptimo de su actividad a pH más alcalino (Serviere *et al.*, 1997), y de acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos con juveniles, la actividad en este rango fue muy pobre.

Como existe poca información sobre haliótidos en este sentido, se describen estudios en otros organismos, por ejemplo en crustáceos como *Penaeus monodon*, donde se observó un cambio en la participación de enzimas digestivas entre nauplio y adulto. Esto es atribuido a los constituyentes de la dieta, así como a la edad del organismo (Lee-Shing y Bon-Ning, 1992). En *Penaeus japonicus*, se ha reportado que el incremento en la actividad de enzimas digestivas está relacionada con la capacidad que tiene el animal para compensar una baja ingesta proteica, y que el disparo en la secreción del paquete enzimático puede deberse a algún componente de la dieta (Rodríguez *et al.*, 1994). Hernández-Cortés (1997) y Hernández-Cortés *et al.* (1997), purificaron y caracterizaron proteasas de *Penaeus vannamei*.

Utilizando sustrato sintético específico para metaloproteasas (CPA y CPB), no se detectó actividad de este tipo para ninguno de los extractos analizados.

Se determinó la actividad de fosfatasa ácida en los extractos, detectando en el hepatopáncreas la mayor actividad. Los organismos de los grupos alimentados con macroalgas, mostraron una mayor actividad de esta enzima. En el grupo alimentado con diatomeas, se obtuvo una actividad promedio del 65% comparada con la obtenida en los otros dos grupos. Reid (1981), encontró que en el estómago de bivalvos y en el divertículo digestivo, había actividad de enzimas ácidas como catepsinas, carboxipeptidasas y fosfatasas ácidas. Este tipo de enzimas se han detectado en los epitelios intestinales y en diferentes capas del estómago en organismos marinos y se han asociado con el transporte activo de glucosa, proteínas y lípidos. Al hacer la disección de los organismos estudiados, se observó que en los organismos alimentados con diatomeas, el tamaño de las vísceras y el hepatopáncreas, fue significativamente menor a las obtenidas en los grupos alimentados con macroalgas, lo que podría explicar las diferencias de las concentraciones encontradas para la actividad de esta enzima.

Se determinó actividad tipo pepsina para los extractos de todos los grupos. La mayor actividad proteolítica utilizando como sustrato hemoglobina, se observó en el rango de pH de 3 a 4 en ambos extractos, observando que en el hepatopáncreas hay un 50 % más actividad que en las vísceras. La mayor actividad tipo pepsina en vísceras se observó en el grupo I, y en el hepatopáncreas del grupo III. Los procesos digestivos están constituidos por un determinado número de etapas entre las que se incluye una fase de digestión ácida (HCl y pepsina) que se efectúa en el estómago, y una fase de digestión alcalina llevada a cabo por la acción de enzimas hidrolíticas secretadas por el hepatopáncreas a la luz del intestino. De acuerdo con los resultados obtenidos, en organismos juveniles de abulón azul, una gran actividad proteolítica fue registrada a pH ácido, y corroborada al determinar concentración de enzima tipo pepsina en los extractos. Estos resultados revelan la participación en el proceso digestivo de enzimas tipo pepsina, que pudieran estar relacionadas con la etapa inicial de la digestión, misma que podría ser completada en el tracto intestinal, con la participación de otro clase de enzimas. Kolodziejska y Mazurek (1995), en el molusco *Illex argentinus*, determinaron que el principal recurso de proteasas ácidas es el hepatopáncreas, y que la actividad proteolítica fue debida, casi en su totalidad, a proteasas aspárticas. Similar a los resultados obtenidos con juveniles de abulón azul, donde se registró la mayor actividad tipo pepsina en el hepatopáncreas.

Se hicieron análisis electroforéticos para determinar la composición de proteínas para cada uno de los extractos, detectando bandas similares en vísceras y hepatopáncreas, de 75, 30 a 38 y de 21 a 22 KDa. De acuerdo con los resultados reportados por Hernández-Santoyo (1995) y Serviere *et al.* (1997), en adultos de abulón azul se refieren bandas entre los 24 y 25 KDa. Hernández-Santoyo (1995), reporta además, una banda de 32 KDa.

La mayoría de las técnicas electroforéticas se han empleado para estudiar proteinasas cuyo pH óptimo de actividad es el alcalino. En este sentido, es necesario adecuar un método para el estudio de proteinasas aspárticas, que consideren su actividad a pH ácido, su punto isoeléctrico característico y su sensibilidad a los diferentes amortiguadores utilizados en la electroforesis. Para revelar proteinasas de abulón, fueron utilizados diferentes sistemas de electroforesis: 1) SDS-PAGE, 2) no desnaturizante a pH neutro y 3) no desnaturizante a pH ácido. Inicialmente se pensó que podía realizarse un paralelismo con el sustrato SDS-PAGE, que se utiliza con éxito para las proteasas alcalinas. Sin embargo, esto no fue posible debido a la alta sensibilidad de las proteasas ácidas al efecto desnaturizante del SDS (Cho *et al.*, 1983), por lo que se probó con sistemas de electroforesis en condiciones no desnaturizantes. No obstante, no se logró revelar actividad enzimática en ninguno de los extractos. Hernández-Santoyo (1995), reportó que los puntos isoeléctricos en el estómago de adultos de abulón azul oscilan entre 3.7 a 4.0, que de considerarlos para juveniles, coinciden con el pH de alguno de los amortiguadores de corrida utilizados en las electroforesis lo que consecuentemente dificulta el desplazamiento de las enzimas en los geles.

Se efectuó un ensayo del efecto del pH sobre la estabilidad de las proteasas en los extractos de vísceras, utilizando los amortiguadores empleados para cada una de las electroforesis. En el control de cada grupo, el porcentaje de actividad residual en 1 hora, no disminuyó más del 10%. Las enzimas de abulón mantienen en general, el 80 % de la actividad con SDS solo durante los primeros 15 min, siendo nula e irre recuperable en los siguientes intervalos de tiempo. En los amortiguadores de las electroforesis neutra y ácida para los grupos de organismos de la misma talla (I y II), es posible recuperar alrededor del 35 al 50 % de la actividad enzimática, y en el grupo III solamente del 10 al 20 %. Considerando que esta prueba de estabilidad de proteasas a diferente pH se hizo durante 1 hr, y algunos ensayos electroforéticos duraron de 5 a 6 hrs, esto podría justificar la pérdida de la actividad de las enzimas y consecuentemente el resultado obtenido. Se ha reportado que enzimas como la pepsina porcina, es sensible a los amortiguadores de pH superiores a 5.5, ya que pierde un 60 % de su actividad a pH 6.8 y en pepsina de pescado, la enzima es muy sensible a los amortiguadores de pH superior a 7, perdiendo hasta el 75 % de su actividad durante los primeros 30 min. Haciendo una comparación de los resultados de actividad obtenidos en los controles, con los generados al inicio de la etapa experimental (8 meses atrás), y que fueron trabajados bajo las mismas condiciones de ensayo, se observa que por efecto del almacenamiento, la actividad enzimática se reduce significativamente entre un 50 a un 70%. Cho *et al.* (1983), observaron cambios en la actividad proteolítica detectada bajo condiciones óptimas, al ensayar extractos de tracto digestivo de abulón en muestras mantenidas a -20°C, encontrando una disminución en la actividad hasta en un 30% durante los primeros 30 días de almacenamiento. Esto nos permite inferir, la alta sensibilidad de estas enzimas proteolíticas.

Los grupos de organismos que se estudiaron, fueron alimentados con macroalgas y diatomeas, que proveen al animal de nutrientes como: carbohidratos, lípidos, aminoácidos y ácidos grasos esenciales, así como esteroides, vitaminas y minerales. Las microalgas, han sido utilizadas como alimento en maricultura, pero una de sus desventajas es su alto costo de producción. Se ha reportado que las microalgas, tienen entre un 20 a 35 % en peso seco de proteína, y del 10 al 20 % de lípidos, dependiendo de su entorno ecológico y el tipo de especie, lo cual limita enormemente su aplicación (Brown y Jeffrey, 1992). Haciendo un análisis químico proximal de las macroalgas *Eisenia arborea* y *Ulva spp.*, con que fueron alimentados los abulones, su contenido de proteínas osciló entre un 10 al 16% en peso seco, siendo mucho menor al contenido de proteínas utilizado en dietas artificiales, que varía entre un 20 a un 50% (Hahn, 1989b; Fleming *et al.*, 1996). Sin embargo, para sustituir un alimento vivo por una dieta artificial, se requieren estudios detallados tanto del desarrollo ontogenético del sistema digestivo, hábitos alimenticios, así como la fisiología digestiva del organismo para obtener una dieta adecuada para cada etapa del desarrollo del abulón.

El enfoque de este trabajo, está basado en que un mejor conocimiento del sistema digestivo de juveniles de *Haliotis fulgens*, podría ser utilizado en el cultivo exitoso del abulón. El estudio de juveniles resulta particularmente importante pues representa la fase desarrollo de un organismo, etapa en la cual pueden ser implementadas diferentes dietas con el objeto de seleccionar la que repercuta en lograr la mayor talla del organismo en el menor tiempo y con ello descender el costo de producción. Aunado a ello y analizando la actividad de las enzimas en las diferentes etapas del abulón, se podría explicar la diferencia encontrada en los juveniles con respecto a adultos de abulones de la misma especie. Estos resultados son las primeras descripciones de actividad de proteasas que se hacen en juveniles de abulón, y resaltan la importancia de seguir realizando estudios de caracterización de las enzimas que participan en el proceso digestivo, pues se considera que existen ciertas interacciones entre los diferentes constituyentes de la dieta, su asimilación, así como en el desarrollo ontogenético del organismo con la participación enzimática.

VIII. CONCLUSIONES

Los extractos de vísceras y hepatopáncreas presentaron diferentes concentraciones de proteína soluble. La mayor concentración se encontró en el hepatopáncreas en todos los grupos.

Las condiciones recomendadas para ensayar actividad proteolítica en juveniles de abulón azul son: utilizar 100 μg de proteína, 20 minutos de incubación y amortiguador universal.

Todos los extractos mostraron actividad proteolítica sobre el sustrato proteico azocaseína, detectando mayor actividad a pH ácido, que disminuye a medida que se incrementa el pH. En el hepatopáncreas se observó un 40 % de más actividad proteolítica que en las vísceras.

El calcio incrementa significativamente la respuesta en la actividad enzimática de los extractos; las diferentes concentraciones de NaCl, no tuvieron un marcado efecto sobre la actividad, a excepción de los organismos de mayor talla. La Cys-EDTA inhibe la actividad proteolítica de los extractos.

Se detectó actividad tipo tripsina, quimotripsina, fosfatasa ácida y pepsina en los homogeneizados, lo que confirma la existencia de una gran variedad de enzimas proteolíticas en el tracto digestivo y en el hepatopáncreas de juveniles de abulón azul. La actividad tipo pepsina en juveniles de abulón fue detectada en el rango de pH de 3 a 4, encontrando un 85 % más actividad en hepatopáncreas que en vísceras. No se detectó actividad de Carboxipeptidasa A y Carboxipeptidasa B, en ninguno de los extractos.

No se reveló actividad de proteinasas con las técnicas electroforéticas utilizadas.

Se concluye finalmente que el principal aporte de proteasas ácidas en juveniles de abulón azul, viene del hepatopáncreas, el que secreta importantes enzimas digestivas: las proteasas, cuya presencia está directamente relacionada no solo con la dieta suministrada, sino también con los cambios ontogenéticos del organismo.

IX. PERSPECTIVAS

La información obtenida en este trabajo permite incrementar el conocimiento sobre las proteasas que participan en la digestión de los juveniles de abulón azul y señalan la importancia de continuar con estudios orientados a:

- Bioquímicamente obtener una preparación enzimática pura para realizar estudios de caracterización de las enzimas que participan en el proceso digestivo del abulón, incluyendo estudios de la estabilidad de las enzimas durante el almacenamiento, para conocer sus propiedades y en base a ello manejarlas.
- Realizar ensayos encaminados a conocer la variación ontogenética del abulón, directamente asociada a la participación enzimática durante las diferentes etapas del desarrollo de este organismo.
- Evaluar tasa de crecimiento en el abulón alimentado con dietas: naturales y artificiales, preparadas con diferentes fuentes de proteína, además de realizar estudios de digestibilidad *in vitro* para evaluar el aprovechamiento de las mismas.

X. BIBLIOGRAFÍA

Albrecht, P.G. (1921). Chemical study of several marine mollusks of the Pacific Coast. *J. Biol. Chem.* 45: 395-405.

Albrecht, P.G. (1923). Chemical study of several marine mollusks of the Pacific Coast. The liver. *J. Biol. Chem.* pp. 789-734.

Anson, M.L. y Mirsky, A.E. (1932). The estimation of pepsin with hemoglobin. Lab. of the Rockefeller Institute for Medical Research, Princeton, N.J. and the Hospital of the Rockefeller Institute for Medical Research, N.Y. pp. 59-63.

AOAC INTERNATIONAL, (1995). Official methods of analysis. 15th Ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D. C. 1094 pp.

Beynon, R.J. y Bond, J.S., (1989). Proteolytic enzymes, a practical approach. Beynon R. y Bond J. (Eds.) IRL Press, Oxford University. 255 pp.

Bradford, M.A. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Brown, M.R. y Jeffrey (1992). The nutritional properties of microalgae used in mariculture: an overview. *Proc. Aquaculture nutrition workshoop.* Allan y Dall (Editores). Salamander Bay. pp. 174-179.

Cox, K.W. (1962). California abalone, family *Haliotidae*. *Calif. fish and game.* Fish. Bull. 118: 1-133.

Cho, D.M., Pyeun, J.H. y Byun, D.S. (1983). Proteolytic activity of the crude enzyme extracted from the digestive tract of marine gastropods. *Bull. Korean Fish. Soc.* 16(3): 216-224.

Day, R.W. y Fleming, A.E. (1992). The determinants and measurement of abalone growth. En: *Abalone of the world: Biology, Fisheries and Culture*. Shepherd, S.A., Tegner, M.J. y Guzmán del Proo, S.A. (Eds). Proceeding of the 1st International Symposium on Abalone. Fishing News Book, Oxford, London. pp. 141-168.

Dimes, L.E., García-Carreño, F., y Haard, N. (1994). Estimation of protein digestibility-III. Studies on the digestive enzyme from the pyloric ceca of rainbow-trout and salmon. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A: 349-360.

Dittrich, B. (1992). Life under extreme conditions: aspects of evolutionary adaptation to temperature in crustacean proteases. *Polar Biol.* 12: 269-274.

Dixon, M. y Webb, E. (1979). *Enzymes*. Academic Press, third edition. Great Britain. pp. 1-136.

Erasmus, J. (1996). The role of enteric bacteria in the abalone, *Haliotis midae*. Msc Thesis. University of Cape Town. 86 pp.

Erasmus, J., Cook, P. y Coyne, V. (1997). The role of bacteria in the digestion of seaweed by the abalone *Haliotis midae*. *Aquaculture*. 155: 377-386.

Erlanger, B., Kokowsky, N. y Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95: 271-278.

Fallu, R., (1991). *Abalone Farming*. Fishing News Books. Great Britain. pp. 1-195.

Fleming, A.E. (1995). Digestive efficiency of the Australian abalone *Haliotis rubra* in relation to growth and feed preference. *Aquaculture*. 134: 279-293.

Fleming, A.E., Van-Barneveld, R.J. y Hone, P.W. (1996). The development of artificial diets for abalone: A review and future directions. *Aquaculture*. 140: 5-53.

Folk, J., Piez, K., Carroll, W. y Gladner, J. (1960). Carboxipeptidasa B. Purification and characterization of the porcine enzyme. En: Worthington Enzyme Manual. Ed. Von Worthington, E. U. 407 pp.

Folk, J. y Schirmer, E. (1963). The porcine pancreatic Carboxipeptidasa A system. En: Worthington Enzyme Manual. Ed. Von Worthington, E. U. 401 pp.

García-Carreño, F.L. (1991). Student-friendly classification for proteases. *Biotechnology Education*. 3(2): 144-149.

García-Carreño, F.L. (1992). Protease inhibition in theory and practice. *Biotechnology Education*. 3(4): 145-150.

García-Carreño, F.L. y Haard, N. (1993). Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *J. Food Biochem.* 17: 97-113.

García-Carreño, F.L., Dimes, L.E. y Haard, N. (1993). Substrate gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214: 65-69.

García-Carreño, F.L., Hernández-Cortés, P. y Haard, N., (1994). Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and a marine decapod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42: 1456-1461.

García-Carreño, F.L. (1996). Proteinase inhibitors. *Trends in food science and Technology*. 7: 197-204.

García-Carreño, F.L. y Navarrete del Toro, M.A. (1997). Classification of Proteases without tears- *Biochemical Education*. 25(3): 161-167.

Gómez-Pinchetti, J.L. y García-Reina, G. (1993). Enzymes from marine phycophages that degrade cell walls of seaweeds. *Marine Biology*. 116: 553-558.

Groppe, J. y Morse, D. (1993). Molluscan chymotrypsin-like protease: structure, localization and substrate specificity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 305 (1): 159-169.

Guzmán del Proo, S. (1992). A review of the biology of abalone and its fishery in México. En: Abalone of the world: Biology, Fisheries and Culture. Shepherd, S.A., Tegner, M.J. y Guzmán del Proo, S.A. (Eds). Proceeding of the 1st International Symposium on Abalone. Fishing News Book, Oxford, London. pp. 341-360.

Guzmán del Proo, S. (1994). Biología, Ecología y Dinámica de Población del Abulón (*Haliotis spp*) de Baja California, México. Tesis Doctoral, I.P.N., México, D. F. 63 pp.

Hahn, K.O. (1989a). Survey of the commercially important abalone species in the world. In: Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods, Hahn, K.O. Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 1-13.

Hahn, K.O. (1989b). Survey of the commercially important abalone species in the world. In: Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods, Hahn, K.O. De. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 135-156.

Hernández-Cortés, P. (1993). Proteinases con actividad de quimotripsina y colagenasa en langostilla *Pleuroncodes planipes* (Decapoda). Tesis Lic. U.A.B.C.S. México. La Paz, B.C.S. 82 pp.

Hernández-Cortés, P. (1997). Crustacean proteases characterization, biochemical and molecular consideration. Tesis de Doctorado. CIBNOR, México. La Paz, B.C.S. pp. 1-18.

Hernández-Cortés, P., Whitaker, J. y García-Carreño, F. (1997). Purification and characterization of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (crustacea: decapoda). Journal of Food Biochemistry 21: 497-514.

Hernández-Santoyo, A. (1995). Purificación y caracterización de proteasas digestivas del abulón azul *Haliotis fulgens* (Philippi, 1845). Tesis de Maestría, U.A.B.C., México. Ensenada, B.C. 67 pp.

Ino, T. (1966). Biological Studies on the propagation of japanese abalone (Genus *Haliotis*). Nippon Suisan Shigen Hogo Kyokai, Suisan Zoyoshoku Sosho 11: 104. (Translated from japanese in Fish. Res. Bd Can Trans Ser., 1078 (1968)).

- Knauer, J., Britz, P.J. y Hecht, T. (1996). Comparative growth performance and digestive enzyme activity of juvenile South African abalone, *Haliotis midae*, fed on diatoms and a practical diet. *Aquaculture*. 140: 75-85.
- Kolodziejska, I. y Mazurek A. (1995). Proteolytic activity of the viscera and partial purification of acid proteases of squid *Illex argentinus* hepatopancreas. *Pol. J. Food. Nutri. Sci.* 4/45 (3): 63-70.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *MRC Laboratory of Molecular biology, Hills Road Cambridge. Nature*. 227: 680-685.
- Lee-Shing, F. y Bon-Ning, L. (1992). Ontogenic change of digestive enzymes in *Peneaus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.* 103 B (4): 1033-1037.
- Lehninger, A.L. (1984). *Bioquímica*. 2da. Ed. Omega. Barcelona. pp. 189-253.
- Lindberg, D.R. (1992). Evolution, distribution and systematics of Haliotidae. En: *Abalone of the world: Biology, Fisheries and Culture*. Shepherd, S.A., Tegner, M.J. y Guzmán del Proo, S.A. (Eds). *Proceeding of the 1st International Symposium on Abalone*. Fishing News Book, Oxford, London. pp. 3-18.
- López, L.M. y Viana, M.T. (1995). Determination of the quality of food elaborated from unheated and heated fish silages for abalone juveniles of *Haliotis fulgens*. *Ciencias Marinas*. 21(3): 331-343.
- Mazón, J.M., Muciño, M. y Bazúa, L.A. (1996). Cultivo de abulón *Haliotis spp.* En: *Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur*. M. Casas y G. Ponce (Eds.). SEMARNAP, Gob. del Estado de Baja California Sur, FAO, UABCS, CIBNOR, CICIMAR, Inst. Nacional de Pesca y CETMAR. pp. 475-512.
- Mc Lean, N. (1970). Digestion in *Haliotis rufescens* Swainson (Gastropoda: Prosobranchia). *J. Exp. Zool.* 172: 303-318.
- McShane, P.E. (1992). Early life history of abalone: a review. En: *Abalone of the world: Biology, Fisheries and Culture*. Shepherd, S.A., Tegner, M.J. y Guzmán del Proo, S.A. (Eds). *Proceeding of the 1st International Symposium on Abalone*. Fishing News Book, Oxford, London. pp. 120-138.

Neurath, H. (1989). The diversity of proteolytic enzymes. En: Proteolytic enzymes a practical approach, R. J. Benyon, J. S. Bond, Ed. Irl Press, Oxford University. pp. 1-13.

Reid, R.G.B., (1978). The systematic, adaptative and physiological significance of proteolytic enzyme distribution in bivalves. *Veliger*. 29: 260-265.

Reisfeld, R.A., Lewis, V.J. y Williams, D.E. (1962). En: Alarcón-López, F.J. (1997). Procesos digestivos en peces marinos: caracterización y aplicaciones prácticas. Tesis Doctoral. Universidad de Almería España. 325 pp.

Rodríguez, A., Le-Vay, L. y Mourente, G.J. (1994). Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. *Marine Biology*. 118: 45-51.

Salas-Garza, A. y Searcy-Bernal, R. (1990). Problemas y Alternativas del Cultivo de abulón en México. Serie Científica U.A.B.C.S., México, 1 (No. Esp. 1 AMAC): 51-58.

Salas-Garza, A. y Searcy-Bernal, R. (1992). Desarrollo y estado actual del cultivo de abulón en México. En: Abalone of the world: Biology, Fisheries and Culture. Shepherd, S.A., Tegner, M.J. y Guzmán del Proo, S.A. (Eds). Proceeding of the 1st International Symposium on Abalone. Fishing News Book, Oxford, London. pp. 538-546.

Sarath, G., De la Motte, R. y Wagner, F.W. (1989). Protease assay methods. In: Proteolytic enzymes a practical approach, R. J. Benyon, J. S. Bond, Ed. Irl Press, Oxford University. pp. 25-32.

Selvarani, C., Bharathi, M.S. y Ramalingam, K. (1989). Digestive enzymes of marine bivalves, *Donax cuneatus* and *Perna viridis*. *Indian Journal of Marine Sciences*. 18: 217-218.

Serviere, Z. E., Navarrete del Toro, M.A. y García-Carreño, F. (1997). Protein hidrolizing enzymes in the digestive systems of adult mexican blue abalone, *Haliotis fulgens* (Gastropod). *Aquaculture*. 157: 325-336.

Sokal, R. R. y Rohlf, J. (1981). *Biometry*. W.H. Freeman y Company. pp. 271-371.

Stauffer, C. (1989). Effect of pH on activity. En: *enzyme assay for food scientist*. Edited by An Avi Book. Van Nostrand Reinhold. New York. Pp. 61-76.

Stroud, R. (1975). A family of proteins-cutting proteins. *Sci. Am.* 231 (1): 74-89.

Uki, N. y Watanabe, T. (1992). Review of the nutritional requirements of abalone (*Haliotis spp*) and development of more efficient artificial diets. En: *Abalone of the world: Biology, Fisheries and Culture*. Shepherd, S.A., Tegner, M.J. y Guzmán del Proo, S.A. (Eds). *Proceeding of the 1st International Symposium on Abalone*. Fishing News Book, Oxford, London. pp. 504-517.

Viana, M.T., López, L.M. y Salas A., (1993). Diet development for juvenile abalone *Haliotis fulgens*. Evaluation of two artificial diets and macroalgae. *Aquaculture*. 117: 149-156.

Viana, M.T., Cervantes-Trujano, M. y Solana-Sansores, R. (1994). Attraction and palatability activities in juvenile abalone (*Haliotis fulgens*): nine ingredients used in artificial diets. *Aquaculture*. 127: 19-28.

Wee, K.L., Maguire, G.B. y Hindrum, S.M. (1992). Methodology for digestibility studies with abalone. I. Preliminary studies on the feeding and defaecatory behaviour of blacklip abalone, *Haliotis rubra*, fed natural and artificial diets. *Proceedings of the Aquaculture Nutrition Workshop, Salamander Bay*. Editado por G.L. Allan and W. Dall. NSW Fisheries, Brackish Water Fish Culture Research Station, Salamander Bay, Australia. pp. 192-196.

Williams, D.E. y Reisfeld, R. A. (1964) En: Alarcón-López, F.J. (1997). *Procesos digestivos en peces marinos: caracterización y aplicaciones prácticas*. Tesis Doctoral. Universidad de Almería España. 325 pp.

Whitaker, J.R. (1994). *Principles of enzymology for the food sciences*. Marcel Dekker, Inc. Second Edition. New York. pp. 469-498.

Yonge, (1937). En: Reid, R.G.B. (1978). The systematic, adaptative and physiological significance of proteolytic enzyme distribution in bivalves. Department of Biology, University of Victoria. 20 (3): 260-265.

XI. ANEXO I

ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMALES DE MACROALGAS

En el Laboratorio de Análisis Químico Proximal del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, fue analizado el contenido de *Eisenia arborea* y *Ulva spp.*, macroalgas suministradas como alimento a los organismos de prueba. Los análisis fueron realizados de acuerdo al Manual de Análisis Químico Proximal de Insumos y Alimentos del Laboratorio de Nutrición de Crustáceos del CIB-NOR (AOAC INTERNATIONAL, 1995).

X.1 HUMEDAD

Calculado por el método de diferencia de peso. Se pesaron 2 g de muestra en una cápsula de porcelana previamente puesta a peso constante. La muestra fue colocada 18 hrs en estufa a 100 °C, enfriada en desecador por 30 min y pesada. Se calculó el porcentaje de humedad con la fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(\text{Peso de la muestra inicial} - \text{Peso de la muestra final})}{\text{Peso de la muestra inicial}} \times 100$$

X.2 CENIZAS

El contenido de cenizas fue calculado por diferencia de peso. La cápsula con el residuo de humedad, se coloca en mufla durante 24 hrs a 550 °C, posteriormente se transfiere a una estufa 30 min a 100 °C por y finalmente es enfriada en desecador por 30 min y pesada. El contenido de cenizas fue calculada por :

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{Peso de la muestra carbonizada}}{\text{Peso inicial de la muestra}} \times 100$$

X.3 PROTEÍNA CRUDA

Se determinó el contenido de nitrógeno total por el método de micro-Kjeldahl-Tecator. 0.1 g de muestra seca, se colocó en tubos de digestión de Kjeldahl, con 1.6 g de catalizador (CuSO₄ y K₂SO₄) y 3 mL de H₂SO₄. Se someten las

muestras a digestión a 400 °C y se retiran al colorarse la solución verde cristalina. Una vez frío, se añade 10 mL de agua destilada y se coloca el tubo en el destilador Kjeltex (semiautomático). El producto destilado se recibe en una solución de H₂BO₄ 1 % con verde de bromocresol y rojo de metilo. En pantalla aparecen los mL de HCl 0.05 N gastados en la titulación de la muestra.

Los cálculos se hacen con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ nitrógeno} = \frac{(V_1 - V_0) \times N \times 0.014 \times 100}{g}$$

donde:

- V₁ = mililitros de HCl gastados en la titulación de la muestra
- V₀ = mililitros de HCl gastados en la titulación del blanco
- N = normalidad del HCl
- g = peso de la muestra en gramos
- 0.014 = miliequivalentes del HCl

El porcentaje de la proteína cruda fue calculada del porcentaje de nitrógeno total multiplicado por el factor 6.25. El estándar utilizado fue FeSO₄ amoniacal.

X.4 LÍPIDOS

Se siguió el método de Soxhlet, colocando 2.5 g de material seco en un papel filtro Whatman No. 1 a peso constante dentro de un cartucho, se agregan 250 mL de éter de petróleo y el cartucho es introducido para extracción durante 6 hr. El sistema se enfría por 30 min y el cartucho se escurre, eliminando por aireación el exceso de éter. Se coloca en estufa por 24 hrs a 100 °C. Cada paquete se deseca durante 2 hrs y por diferencia de pesos se obtiene el porcentaje de lípidos en la muestra.

$$\text{Extracto etéreo} = \frac{(\text{Peso de la muestra inicial} - \text{Peso de la muestra final})}{\text{Peso de la muestra inicial}} \times 100$$

X.5 FIBRA CRUDA

Siguiendo el método de hidrólisis sucesiva, a 2 g de muestra desengrasada se agregan 200 mL de H₂SO al 1.25 % (0.255 N) hirviendo. Se coloca la muestra en ebullición con 2 o 3 gotas de octanol, en el digestor de fibra dejando hervir por 30 min. Se quita el vaso y se filtra en papel Whatman No. 541 al vacío y en caliente, enjuagando con agua destilada caliente durante cuatro veces. El residuo se transfiere a un vaso de extracción con 200 mL de NaOH 1.25 % hirviendo, se deja en ebullición durante 30 min. más. Se filtra y lava con 50 mL de HCl 1 % a 25 °C, con agua destilada caliente y por último con 50 mL de CH₃-OH a temperatura ambiente. El residuo es transferido a un crisol a peso constante y secado por 2 hrs a 100 °C. Se enfría, se pesa el crisol y el papel con la muestra y posteriormente se calcinaron en mechero y luego en la mufla por 24 hrs a 550 °C. El porcentaje de fibra cruda se obtiene con la fórmula:

$$\% \text{ Fibra Cruda} = \frac{(P_s - P_c - P_{cp})}{m} \times 100$$

$$\% \text{ Fibra Cruda} = 100 - (\% \text{ Lípidos} - \% \text{ Humedad})$$

donde:

P_s = peso en gramos del residuo seco a 100°C + papel filtro

P_c = peso en gramos del papel

P = peso en gramos de las cenizas y el papel filtro

m = peso en gramos de la muestra.

Tabla 5. Análisis químico proximales de macroalgas

CODIGO	1*	2**	3**	4**	5**	6**
MUESTRA	HUMEDAD	PROTEÍNA	LÍPIDOS	CENIZAS	FIBRA CRUDA	E.L.N.
<i>Ulva spp.</i>	88.97 ±0.47	16.82 ±0.13	12.83 ±0.23	32.74 ±0.64	0	37.61
<i>Eisenia arborea</i>	81.81 ±0.18	10.99 ±0.33	8.85 ±0.22	18.33 ±0.54	0.50 ±0.03	61.33

* Determinación en base húmeda.

** Determinación en base seca.

± Desviación estándar (Análisis por triplicado).

Estas algas, fueron utilizadas en el Laboratorio de producción de semilla S.C.P.P. "Progreso", de la Bocana, B.C.S., para alimentar a los organismos. Sin embargo, en otros países se han utilizado dietas comerciales a partir de diferentes fuentes de proteína (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje del análisis químico proximal de diferentes dietas de abulón.

DETERMINACIÓN	ALGAS		DIETA ARTIFICIAL	
	Peso Húmedo	Peso Seco	Peso Húmedo	Peso Seco
Humedad	78.00	--	76.40	--
Proteínas	13.60	61.80	15.6	66.10
Lípidos	1.30	5.90	2.0	8.50
Cenizas	2.40	10.90	2.8	11.90
Fibra cruda	0.0	0.0	0.0	0.0
ELN	4.70	21.40	3.20	3.60

(Hanh, 1989a)

ANEXO 2.

AMORTIGUADOR UNIVERSAL (Stauffer, 1989).

Cuando se tiene planeado cubrir un amplio intervalo de pH en un ensayo, el amortiguador usado debe ser una mezcla de ácidos débiles que puedan dar una buena capacidad para amortiguar en una escala amplia de pH y que los aniones a los cuales la enzima va a ser expuesta sean los mismos. Este amortiguador actúa entre el intervalo de pH de 2 a 12. Para su uso, se mezclan 20 mL de la solución concentrada con X mL de HCl 0.1 N y se afora a 100 mL. La composición de 1 L de solución concentrada y algunas mezclas representativas de pH se dan a continuación:

Tabla 7. Composición del amortiguador universal

Solución concentrada del amortiguador universal	pH	X
3.5 g de H_2BO_4	2	73.3
7.0 g de $C_2H_2O_3$ monohidratado	4	50.5
4.6 g de Na_2PO_4 monobásico	8	28.0
310 mL de NaOH 1 N	10	17.9
Aforar a 1 L de agua destilada	12	0.4