



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN PARCIAL Y ACTIVIDAD
ENZIMÁTICA DE TRIPSINA Y LIPASA EN EL
TRACTO GASTROINTESTINAL DE
Cynoscion parvipinnis, *Cynoscion othonopterus* Y
Cynoscion xanthulus.**

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOCIENCIAS

presenta:

SANDRA CAROLINA DE LA REE RODRÍGUEZ

Hermosillo, Sonora, México

12 de agosto de 2019

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestra en Biociencias** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca de Ciencias Biológicas y de la Salud para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

Sandra Carolina De la Ree Rodríguez

Autor

Dra. Nohemí Gámez Meza

Coordinadora del Programa de Maestría en Biociencias

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada Caracterización parcial y actividad enzimática de tripsina y lipasa en el tracto gastrointestinal de *Cynoscion parvipinnis*, *Cynoscion othonopterus* y *Cynoscion xanthulus* presentada por la Biól. Sandra Carolina De La Reé Rodríguez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias.



Dra. Mayra Lizett González Félix

Directora



Dr. Martín Pérez Velázquez

Co-director



Dra. Nohemí Gámez Meza

Sinodal interno



Dr. Christian Minjarez Osorio

Sinodal interno



Dra. Carmen Arminda Contreras Vergara

Sinodal externo

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada con todo mi amor a los seres más maravillosos que la vida me pudo presentar, mis padres y mis abuelos, a ustedes les debo todo lo que soy y lo que he logrado.

A mis hermanos, aun teniendo diferentes caminos y formas de ver la vida, siempre han estado para apoyarme y forman parte fundamental de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico durante mi maestría.

Al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS) y al Posgrado en Biociencias por permitirme realizar mis estudios de posgrado dentro de sus instalaciones.

A mi directora de tesis la Dra. Mayra Lizett González Félix, por ser mi principal guía en este proyecto, por transmitir sus conocimientos, el tiempo invertido y la confianza brindada., al Dr. Martín Pérez Velázquez, por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis. A mis sinodales la Dra. Nohemí Gámez, la Dra. Carmen Arminda Contreras y el Doctor Christian Minjarez Osorio, por todo el apoyo, tiempo dedicado y por las acertadas contribuciones, que enriquecieron el trabajo realizado.

Agradezco especialmente a mis compañeros de laboratorio, Hugo Cañedo, María Luisa Juárez, Carlos Maldonado y Emmanuel Villanueva, por el soporte brindado, por los consejos, por todo el tiempo compartido, hayan sido momentos de estrés o de felicidad, pero sobre todo por la bonita amistad que logramos construir.

A Sofía Choza, por ofrecerme su amistad, motivación y ser mi fiel compañera durante estos dos años de maestría. A Ana Lucía Gómez, por su agradable compañía, amistad y todas las tazas de té compartidas.

A mis padres, Martín De La Reé y Karina Rodríguez, por guiarme siempre por el camino de la bondad y el amor, y por motivarme a seguir preparándome profesionalmente. A mis abuelos Juan De La Reé y Cecilia Barrera, por todo el amor y enseñanzas brindadas a lo largo de la vida. A mis hermanos, Edgar, Diana y Ana De La Reé, por existir y brindarme su amor, los mejores momentos de la vida son a su lado. A mis tíos Cecilia Barrera y Sergio Armendáriz, por el soporte brindado durante mis años de estudiante.

A mis queridas amigas, Rebekah Rentería, Rebeca García y Marcela Ruíz, por estar presentes tanto en momentos de luz como de oscuridad.

Y a toda la gente que de alguna forma me apoyó durante la realización de este trabajo, muchas gracias.

RESUMEN

Las proteínas y lípidos son los principales macronutrientes que constituyen el alimento de peces marinos, sin embargo, su adecuada utilización y aprovechamiento como nutrientes depende de la presencia y la adecuada cantidad de enzimas digestivas. La tripsina y lipasa pancreática promueven la digestión de dichos nutrientes al ser vertidas en el intestino anterior, y dado que en muchos peces el páncreas es un tejido distribuido de manera difusa, la caracterización y cuantificación de estas enzimas no es común. Sin embargo, su presencia y actividad varía dependiendo de la especie, la edad y los hábitos alimenticios, entre otros factores. Debido a que los sciánidos son peces marinos bien representados en el Golfo de California, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar parcialmente y comparar la actividad enzimática de la lipasa y la tripsina en el tracto gastrointestinal de *Cynoscion parvipinnis*, *C. othonopterus* y *C. xanthulus*, con el fin de contribuir al conocimiento de su fisiología digestiva y las potenciales aplicaciones biotecnológicas de estas enzimas. Para ello, se confirmó la presencia de lipasas y tripsina mediante métodos zimográficos y se determinó su peso molecular mediante electroforesis. Para la lipasa se estimaron pesos moleculares de 65.8 y 69.5 kDa para *C. othonopterus* y *C. xanthulus*, respectivamente. En *C. parvipinnis* se evidenciaron dos bandas de lipasas de 61.5 y 36.0 kDa. En las tres especies se observó mayor actividad de lipasa en el intestino anterior, seguida de ciegos pilóricos. La tripsina de *C. othonopterus* presentó un peso molecular de 24.4 kDa, una temperatura óptima de actividad en un rango entre 55 y 65°C y un pH óptimo entre 8.0 y 9.0. En *C. parvipinnis* la tripsina exhibió un peso molecular de 23.6 kDa, con una temperatura y pH óptimos de 65°C y 7.0-8.0, respectivamente. El peso molecular de la tripsina de *C. xanthulus* fue de 23.7 kDa, presentó una temperatura óptima de actividad de 65°C y un pH óptimo de 8.0. Las características bioquímicas observadas en las lipasas y la tripsina de las tres especies de sciánidos en este estudio son similares a las reportadas para otras especies de peces marinos. La tripsina cumple con ciertos criterios que hacen de esta enzima una candidata interesante para algunas aplicaciones industriales, tales como la elaboración de detergentes y alimentos.

ABSTRACT

Proteins and lipids are the main macronutrients in marine fish diets; however, their adequate utilization as nutrients will depend on the presence and proper amount of digestive enzymes. Trypsin and pancreatic lipase promote the digestion of these nutrients when they are secreted into the anterior intestine, but since the pancreas is a diffuse tissue in fish, the characterization and quantification of pancreatic enzymes is uncommon. However, the presence and activity of the enzymes vary according to species, age, and feeding habits, among other factors. Because some sciaenid species are quite important in the Gulf of California, the objective of this study was to partially characterize and compare the enzymatic activities of lipase and trypsin within the gastrointestinal tract of *Cynoscion parvipinnis*, *C. othonopterus* and *C. xanthulus*, to contribute to the knowledge of their digestive physiology and their potential biotechnological applications. The presence of lipase and trypsin was confirmed by zymography and the molecular weights of both enzymes were determined by electrophoresis. For lipase, molecular weights of 65.8 and 69.5 kDa were determined for *C. othonopterus* and *C. xanthulus*, respectively. For *C. parvipinnis* two lipases of 61.5 and 36.0 kDa were determined. In all three species, anterior intestine showed the largest lipase activity, followed by pyloric caeca. Molecular weight of *C. othonopterus* trypsin was 24.4 kDa, it showed an optimum temperature for activity in the range of 55 to 65°C, and an optimum pH between 8.0 and 9.0. In *C. parvipinnis* trypsin had a molecular weight of 23.6 kDa, an optimum temperature for activity of 65°C and an optimum pH between 7.0 and 8.0. Trypsin of *C. xanthulus* was 23.7 kDa, its optimum temperature of activity was 65°C, and it had an optimum pH of 8.0. Biochemical characteristics observed in lipase and trypsin of these three sciaenids were quite similar to those of other marine species. Trypsin meets certain criteria that make it an interesting candidate for some industrial applications, such as the production of detergents and in the food industry.

ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN	<i>i</i>
DEDICATORIA	<i>ii</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>iii</i>
RESUMEN	<i>iv</i>
ABSTRACT	<i>v</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>viii</i>
ÍNDICE DE TABLAS	<i>ix</i>
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	4
I.1. Enzimas digestivas	4
I.1.1. Lipasas	4
I.1.2. Proteasas	5
I.2. Enzimas digestivas en peces	6
I.2.1. Lipasas en peces	6
I.2.2. Proteasas en peces	8
I.2.2.1. Tripsina	8
I.3. Producción de sciánidos en el Golfo de California, México	10
II. JUSTIFICACIÓN	12
III. HIPÓTESIS	13
IV. OBJETIVOS	14
V.1. Objetivo general	14
V.2. Objetivos específicos	14
V. MATERIALES Y MÉTODOS	15
V.1. Acopio de organismos	15
V.2. Índices biológicos	16
V.3. Determinación del peso molecular	16
V.3.1. Preparación del extracto enzimático	16
V.3.2. Electroforesis SDS-PAGE	17
V.3.3. Zimografía	18
V.3.3.1. Detección de lipasas mediante zimogramas	18
V.3.3.2. Detección de tripsinas mediante zimogramas	19
V.4. Actividad de lipasas	19
V.4.1. Determinación de la actividad de lipasas en cada sección de los tractos gastrointestinales	19
V.4.2. Temperatura óptima de actividad de lipasas	20
V.4.3. pH óptimo de actividad de lipasas	21
V.5. Actividad de tripsinas	21
V.5.1. Determinación de la actividad de tripsinas en cada sección de los tractos gastrointestinales	21
V.5.2. Temperatura óptima de actividad de tripsinas	23
V.5.3. pH óptimo de actividad de tripsinas.....	24
V.6. Análisis estadístico	24

VI.	RESULTADOS	25
	VI.1. Parámetros biológicos e índices corporales	25
	VI.2. Lipasas	26
	VI.2.1. Peso molecular de lipasas	26
	VI.2.2. Concentración de lipasas estimado mediante densitometría y BSA como estándar cuantitativo	28
	VI.2.3. Actividad enzimática de las lipasas en diferentes secciones del tracto gastrointestinal	28
	VI.2.4. Temperatura óptima de la actividad de las lipasas	29
	VI.3. Tripsinas	30
	VI.3.1. Peso molecular de las tripsinas	30
	VI.3.2. Concentración de tripsinas estimada mediante densitometría y tripsina bovina como estándar cuantitativo	30
	VI.3.3. Actividad enzimática de las tripsinas en diferentes secciones del tracto gastrointestinal	33
	VI.3.4. Temperatura óptima de actividad de tripsinas	34
	VI.3.5. pH óptimo de actividad de tripsinas	36
VII.	DISCUSIÓN	37
	VII.1. Parámetros biológicos e índices corporales	37
	VII.2. Lipasa	37
	VII.3. Tripsina	40
VIII.	CONCLUSIONES	44
IX.	LITERATURA CITADA	45

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Ejemplares de <i>Cynoscion othonopterus</i> , <i>C. parvipinnis</i> y <i>C. xanthulus</i> .	15
2	Secciones del tracto gastrointestinal de <i>Cynoscion othonopterus</i> .	17
3	Corrida electroforética de los extractos crudos.	18
4	Mezcla de reacción después de concluir la titulación y el viraje a color rosa durante la determinación de actividad de la lipasa.	20
5	Mezcla de reacción después del viraje a color amarillo durante la determinación de actividad de tripsina	22
6	Curva estándar de diferentes concentraciones de tripsina bovina	23
7	Lipasa de <i>C. othonopterus</i> .	26
8	Lipasa de <i>C. parvipinnis</i> .	27
9	Lipasa de <i>C. xanthulus</i> .	27
10	Actividad de lipasa en intestino anterior de <i>C. parvipinnis</i>	30
11	Tripsina de <i>C. othonopterus</i> .	31
12	Tripsina de <i>C. parvipinnis</i> .	31
13	Tripsina de <i>C. xanthulus</i> .	32

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Parámetros biológicos e índices corporales de <i>C. parvipinnis</i> , <i>C. othonopterus</i> y <i>C. xanthulus</i> .	25
2	Concentración de lipasa estimada por densitometría en las diferentes secciones del tracto gastrointestinal de <i>C. othonopterus</i> , <i>C. parvipinnis</i> y <i>C. xanthulus</i> .	28
3	Actividad de lipasa en diferentes secciones del tracto gastrointestinal de <i>C. othonopterus</i> , <i>C. parvipinnis</i> y <i>C. xanthulus</i> .	29
4	Concentración de tripsina estimada por densitometría en las diferentes secciones del tracto gastrointestinal de <i>C. othonopterus</i> , <i>C. parvipinnis</i> y <i>C. xanthulus</i> .	32
5	Actividad de tripsina en las diferentes secciones del tracto gastrointestinal de <i>C. othonopterus</i> , <i>C. parvipinnis</i> y <i>C. xanthulus</i> .	33
6	Concentración de tripsina en las diferentes secciones del tracto gastrointestinal de <i>C. othonopterus</i> , <i>C. parvipinnis</i> y <i>C. xanthulus</i> .	34
7	Actividad de tripsina en intestino anterior de <i>C. othonopterus</i> , <i>C. parvipinnis</i> y <i>C. xanthulus</i> a diferentes temperaturas.	35
8	Actividad de tripsina en intestino anterior de <i>C. othonopterus</i> , <i>C. parvipinnis</i> y <i>C. xanthulus</i> a diferentes pH.	36

INTRODUCCIÓN

Las proteínas y lípidos son macronutrientes presentes en los alimentos que cumplen numerosas funciones de vital importancia en los organismos. Por ejemplo, las proteínas desempeñan una función estructural en el citoesqueleto, que mantiene la forma e integridad de las células; de transporte, como en la hemoglobina, que transporta oxígeno de la sangre al resto del organismo; de defensa, como los anticuerpos o inmunoglobulinas que defienden contra patógenos; de catálisis, como las enzimas que catalizan reacciones químicas que generan energía, sintetizan y/o degradan biomoléculas; como reguladores mediante hormonas como la insulina, que regula los niveles de glucosa en sangre. Adicionalmente, también presentan una función contráctil, como la actina y la miosina que constituyen las miofibrillas responsables de la contracción muscular (Kennelly y Rodwell, 2010). Por su parte, los lípidos son una importante fuente de reserva de energía; se almacenan en el tejido adiposo del organismo y se oxidan cuando es necesario para producir energía. También cumplen funciones de transporte, pues son constituyentes de las lipoproteínas que son el medio para transportar lípidos en la sangre, y también presentan una función estructural al formar parte de las membranas celulares o constituyendo la estructura básica de algunas hormonas y sales biliares (Botham y Mayes, 2010).

Las proteínas y lípidos se encuentran presentes en el alimento de peces marinos, siendo requeridos para lograr un óptimo desempeño biológico; sin embargo, su adecuada utilización y aprovechamiento como nutrientes depende no sólo de la presencia sino también de la adecuada concentración de enzimas digestivas (Langeland *et al.*, 2013). Las enzimas digestivas son también proteínas cuya función es hidrolizar los nutrientes consumidos en el alimento para convertirlos en moléculas más sencillas que puedan ser fácilmente absorbidas a través de la pared intestinal (Osorio, 2001). En los peces existe una gran variedad de enzimas que participan en la digestión del alimento a lo largo del tracto gastrointestinal. Son producidas en tejidos como el intestino, páncreas, estómago, hígado y ciegos pilóricos (Islam *et al.*, 2008). Existen diversas proteasas y lipasas, estas últimas hidrolizan triacilglicérols a glicerol y ácidos grasos libres, mientras que las proteasas hidrolizan proteínas en péptidos pequeños o aminoácidos para que puedan ser asimilados a través de la pared intestinal. Estos dos tipos de enzimas pertenecen a la familia de las $\alpha\beta$ -hidrolasas, al igual que las esterasas, deshalogenasas y peroxidadasas, que

presentan características estructurales similares como lo es el sitio activo, el cual consiste de una tríada catalítica altamente conservada: un residuo nucleofílico que puede ser de serina, cisteína o ácido aspártico, un residuo ácido catalítico, ya sea ácido aspártico o glutámico, y un residuo de histidina (Nardini y Dijkstra, 1999).

El tracto digestivo de peces es un subproducto de las pesquerías y de la acuicultura, y representa aproximadamente el 20% de la biomasa corporal de un pez. De acuerdo a algunas investigaciones, este subproducto podría presentar un amplio potencial biotecnológico como fuente de enzimas digestivas para uso industrial (Bougatef *et al.*, 2009), especialmente las proteasas digestivas, que tienen alta actividad biológica en un amplio rango de temperatura (Simpson y Haard, 1987; Martínez y Serra, 1989; Gildberg, 1992; Cancre *et al.*, 1999). La familia Sciaenidae se encuentra entre las familias de peces de gran importancia económica a nivel mundial, son mejor conocidos como curvinas o roncadorez debido a los sonidos que producen con la vejiga natatoria generalmente durante el cortejo de reproducción y desove (Lagárdere y Mariani, 2006). Estos organismos habitan en regiones templadas y tropicales de todo el mundo (Jiménez *et al.*, 2005), son carnívoros, y se caracterizan por tener un cuerpo alargado y comprimido. Adicionalmente su pesquería y cultivo son de gran importancia debido a que presentan elevadas tasas de crecimiento en todas las etapas de su desarrollo, buenos índices de conversión de alimento y gran aceptación por parte de los consumidores debido a la excelente calidad de su carne (Cárdenas, 2012). Algunos miembros de esta familia se localizan en el Golfo de California, por ejemplo, *Cynoscion othonopterus* que es comúnmente conocida como curvina golfina, *Cynoscion parvipinnis*, cuyo nombre común es curvina de aleta corta, y *Cynoscion xanthulus*, conocida como curvina de aleta amarilla. Estas son las tres especies de interés del presente estudio debido a que son importantes en las pesquerías regionales. De hecho, la curvina golfina actualmente constituye la pesquería más importante en la región debido a que es la única especie con permiso de explotación decretado por el Gobierno de México (Diario Oficial de la Federación, 2015). Su pesquería genera importantes ingresos económicos derivados de su venta, y empleos durante la temporada de pesca (Campoy, 1999; Rodríguez y Bracamonte, 2008; Ruelas-Peña *et al.*, 2013). No obstante, en nuestro país el procesamiento de productos pesqueros genera residuos o subproductos que hasta el momento no son explotados, por lo que no poseen valor comercial y generalmente son descargados directamente al mar sin ser tratados, causando

contaminación (Doode y Wong, 2001). Ello representa una problemática ambiental y económica, y se hace necesario buscar alternativas de usos para estos subproductos.

Generalmente, las investigaciones relacionadas con enzimas digestivas de peces están enfocadas en el estudio de proteasas, y en menor medida, a lipasas. Sin embargo, existe aún mucho por descubrir respecto a las diferentes características fisicoquímicas, propiedades y modo de acción de las enzimas digestivas de peces. Por ejemplo, se desconocen los pesos moleculares, pH y temperatura óptima para su actividad, entre otras características. El conocer las propiedades de biocatálisis de las enzimas digestivas de estos organismos es importante, ya que el caracterizarlas y cuantificarlas pudiera permitir el ser utilizadas en aplicaciones biotecnológicas como en la industria de alimentos y otros procesos químicos (Osorio *et al.*, 2001). Lo anterior pudiera representar un excelente destino y utilización de los subproductos de la pesca y la acuicultura, y resulta interesante mencionar el hecho de que la industria de enzimas a nivel mundial tiene un valor estimado de un billón de dólares y el 75% corresponde a enzimas hidrolíticas. Las proteasas representan uno de los tres grupos de enzimas industriales, ocupando el 60% del mercado, y específicamente la tripsina representa el 3% y las lipasas otro 3% del total de enzimas utilizadas (Gupta *et al.*, 2002; Nadeem, *et al.*, 2007). El presente estudio pretende generar información sobre algunas características bioquímicas de enzimas de interés que pudieran tener alguna aplicación biotecnológica.

I. ANTECEDENTES

I.1. Enzimas digestivas

Las enzimas digestivas son proteínas que hidrolizan nutrientes consumidos en el alimento para convertirlos en moléculas más sencillas y pequeñas, para que puedan ser absorbidas con mayor facilidad por el epitelio intestinal y ser transportadas hacia el torrente sanguíneo (Moyano-López, 2006). Dos grandes grupos de enzimas digestivas son las lipasas y las proteasas.

I.1.1. Lipasas

Las lipasas (triacilgliceril acil hidrolasas, E.C. 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis de lípidos con la liberación de ácidos grasos libres, diglicéridos, monoglicéridos y glicerol (Anobom *et al.*, 2014). Son estables en solventes orgánicos, su especificidad de sustratos es amplia y, por lo general, muestran una alta regulación o estereo-selectividad en catálisis, características que hacen a las lipasas uno de los grupos de biocatalizadores más utilizados en procesos biotecnológicos (Hasan *et al.*, 2006). Estas enzimas son utilizadas en la formulación de detergentes principalmente, así como también en la manufactura de cosméticos, productos farmacéuticos, industrias del cuero, textiles y papel, producción de biodiesel y biopolímeros, y en el pretratamiento de aguas residuales ricas en lípidos (Horchani *et al.*, 2012). Algunos de los requisitos para la aplicación de lipasas en la industria de detergentes son el que las enzimas presenten una amplia especificidad de sustrato, actividad y estabilidad a temperaturas mayores a 40°C y pH alcalino, así como ser compatibles con los componentes del detergente, por ejemplo, ser compatibles con proteasas (Grbavcic *et al.*, 2011). Las lipasas, al igual que las esterasas, proteasas, deshalogenasas, hidrolasas epóxidas, peroxidadas y proteasas, constituyen la familia de enzimas $\alpha\beta$ -hidrolasas. El sitio activo de las $\alpha\beta$ -hidrolasas consiste en una tríada catalítica altamente conservada, con un residuo nucleofílico, ya sea serina, cisteína o ácido aspártico, un residuo ácido catalítico que puede ser ácido aspártico o glutámico, y un residuo de histidina (Nardini y Dijkstra, 1999; Bordes *et al.*, 2011). Las lipasas se caracterizan porque generalmente el residuo nucleofílico es un residuo de serina (Jaeger *et al.*, 1999) y son las únicas dentro de esta familia que poseen un ácido glutámico en la tríada catalítica (Heikinheimo *et al.*, 1999).

Las lipasas más importantes son las lipasas pancreáticas, que junto con la colipasa pancreática y la bilis en mamíferos actúan en la luz del intestino para digerir triglicéridos, ésteres del colesterol y fosfolípidos, entre otros lípidos (Sebban-Kreuzer *et al.*, 2003). En el estómago, las lipasas bucal y gástrica digieren parcialmente las grasas por acción de las fuertes contracciones del antro, estas grasas se emulsifican y pasan al duodeno donde, por acción de la lipasa pancreática, continúan su digestión. Las sales biliares de la secreción biliar en el duodeno forman micelas que van a servir para transportar lípidos a la pared del intestino donde se ensamblan en quilomicrones para ser exportadas a torrente sanguíneo y transportadas a diversos tejidos, incluyendo el hígado, donde las grasas se almacenan o se utilizan para re-sintetizar lipoproteínas de alta, media, y baja densidad y son posteriormente transportarlas a otros tejidos (National Research Council-NRC; 1993).

I.1.2. Proteasas

Las proteasas son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas y participan en procesos de coagulación de la sangre por medio de la trombina, que es una serina proteasa, y en la activación de zimógenos como las enzimas pancreáticas. Están presentes en todos los organismos y constituyen entre 1 a 5% del contenido del genoma (Rao *et al.*, 1998). Estas enzimas se encuentran dentro de la familia $\alpha\beta$ -hidrolasas, sin embargo, de acuerdo con su estructura y forma de acción, están divididas en exopeptidasas, las cuales rompen el péptido cerca de los grupos terminales del sustrato, y en endopeptidasas, que lo hacen lejos de los grupos terminales (Nadeem *et al.*, 2007). A su vez, con base en sus grupos funcionales de acción, se clasifican en cuatro grupos: serina proteasas, ácido aspártico proteasas, cisteína proteasas y metaloproteasas. Las serina proteasas poseen en su centro activo un aminoácido de serina esencial para la catálisis enzimática. Esta clase de enzimas, clasificadas como E.C. 3.4.21, incluyen la tripsina, quimotripsina y subtilisina, entre otras (Kumar y Takagi, 1999).

Entre las serina proteasas se encuentra un grupo de enzimas llamadas comúnmente proteasas alcalinas, que son un grupo de enzimas fisiológica y comercialmente importante pues son utilizadas primordialmente como aditivos en detergentes, en el curtido de pieles, tienen uso farmacéutico, se emplean en la recuperación de plata en placas de rayos X, en tratamientos de desechos de la industria avícola, y en la industria alimenticia y química (Zaragoza-Carmona,

2011). Las proteasas alcalinas más abundantes son la tripsina y la quimotripsina y están presentes en intestino (Alarcón *et al.*, 1998). El rango de pH óptimo es generalmente de 7 a 11 (Castillo-Yáñez *et al.*, 2005), sus temperaturas óptimas van desde 50 hasta 70°C y la masa molecular varía entre 15 y 30 kDa (Paliwal *et al.*, 1994). Requieren un ion divalente como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} o una combinación de estos cationes para aumentar su actividad (Fogarty *et al.*, 1974). Para que estas enzimas puedan ser utilizadas en la industria de detergentes deben poseer una alta estabilidad y actividad en un rango amplio de temperaturas y pH, también deben tener una larga vida de almacenamiento prolongado, deben presentar actividad a bajos niveles de concentración en el detergente (0.04-0.08%) y ser compatibles con los demás compuestos del detergente como los agentes oxidantes y secuestrantes iónicos (Banika y Prakash, 2004).

I.2. Enzimas digestivas en peces

Las enzimas digestivas de peces pudieran tener importantes aplicaciones industriales dado que están disponibles en cantidades significativas y generalmente presentan una actividad biológica alta (Castillo-Yáñez *et al.*, 2005).

I.2.1. Lipasas en peces

En el intestino de mamíferos la lipólisis se lleva a cabo mediante dos lipasas principales, la lipasa pancreática dependiente de colipasa y la lipasa activada por sales biliares, esta última es menos específica. En peces también hay evidencia de un sistema de lipasa-colipasa pancreática y de lipasa pancreática dependiente de sales biliares. La secreción de lipasa asegura una digestión y absorción eficaz de los lípidos de la dieta en el intestino anterior de los peces, que consisten principalmente de triacilgliceroles, uno de los principales tipos de lípidos dietarios tanto de peces marinos como de agua dulce (Tocher, 2003). Se ha reportado que el contenido de lipasa pancreática dependiente de sales biliares cambia dependiendo de diversos factores, incluyendo la dieta y la edad (Boivin *et al.*, 1990; Fieker *et al.*, 2011). En algunos peces como la lubina *Dicentrarchus labrax* y la curvina ocelada *Sciaenops ocellatus*, los niveles crecientes de lípidos en la dieta han provocado una mayor actividad de lipasa pancreática (Buchet *et al.*,

2000; Zambonino Infante y Cahu, 1999, 2001). Varios tipos de lipasas han sido observadas en el tracto digestivo de peces juveniles o adultos, entre ellas, la lipasa neutra no-específica activada por sales biliares parece jugar un papel importante en la digestión de lípidos neutros en varias especies de peces, tales como la lubina listada *Morone saxatilis*, la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* y el pargo japonés *Pagrus major*. Esta enzima cataliza la hidrólisis no sólo de acilglicéridos sino también de otras grasas dietarias menores incluyendo los ésteres de colesterol y los ésteres de vitaminas (Izquierdo *et al.*, 2000). También hay evidencia de la presencia de lipasa pancreática específica en varias especies, por ejemplo, en trucha arcoíris ha sido aislada lipasa pancreática que fue activada por colipasa y se observó que es específica para triacilglicéridos (Izquierdo y Henderson, 1998).

Iijima *et al.* (1998) purificaron la lipasa del hepatopáncreas de *P. major* y obtuvieron una enzima única con una masa molecular 64 kDa que presentó un pH óptimo en el rango de 7.0 a 9.0. Por otra parte, Matus-De la Parra *et al.* (2007) al caracterizar la lipasa del atún de aleta azul *Thunnus orientalis* observaron que la máxima actividad de la enzima ocurre a 45°C y a pH de 9.0. Kurtovic *et al.* (2010) purificaron lipasas a partir de los ciegos pilóricos del salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) y del hoki de Nueva Zelanda *Macruronus novaezelandiae* y reportaron dos tipos de lipasa para la primera especie con pesos moleculares de 79.6 y 54.9 kDa., y una lipasa de 44.6 kDa para la segunda especie; ambas lipasas tuvieron la mayor actividad a 35°C y el pH óptimo de actividad fue entre 8 y 8.5. Por su parte, Rueda-López *et al.* (2017) realizaron una caracterización bioquímica de la lipasa pancreática del *T. orientalis*, totoaba *Totoaba macdonaldi* y la lubina rayada *Morone saxatilis*. Las actividades más altas se encontraron a 45°C para totoaba, 40°C para el atún de aleta azul y 35°C para la lubina rayada, mientras que el pH óptimo fue de 8.0 para las tres especies. González-Félix *et al.* (2015) reportaron que el peso molecular de la lipasa de *C. othonopterus* es de 57.4 kDa, pero hasta el momento no existen reportes de temperatura o pH óptimo para la actividad de las especies que se investigan en el presente estudio, y también se desconocen los pesos moleculares de las lipasas de *C. parvipinnis* y *C. xanthulus*.

I.2.2. Proteasas en peces

En el tracto digestivo de peces existen proteasas ácidas como la pepsina que está presente en el estómago y, por otra parte, existen las proteasas alcalinas intestinales que juegan un papel importante en la digestión de la proteína dietaria en peces durante fases larvarias cuando carecen de un estómago funcional (Govoni *et al.*, 1986), así como también posteriormente durante etapas juveniles y adultas. Estas enzimas son la tripsina, la quimotripsina y la elastasa, que pertenecen a la familia de las serina proteasas (E.C.3.21.x) y se caracterizan por tener estructuras similares con un sitio activo conformado por serina, histidina y ácido aspártico, y por ser generalmente activas a pH neutros y alcalinos (Simpson, 2000). En investigaciones previas se han aislado y caracterizado las tres enzimas anteriormente mencionadas del tracto digestivo de organismos marinos, siendo la tripsina la más abundante (Essed *et al.*, 2002). Cabe mencionar que el uso de proteasas alcalinas de organismos acuáticos, principalmente de la tripsina, se ha incrementado durante los últimos años, ya que se caracterizan por ser estables y activas en altas temperaturas y pH, y en presencia de surfactantes o agentes oxidantes (Klomklao *et al.*, 2005; Espósito *et al.*, 2009).

I.2.2.1. Tripsina

La tripsina (E.C.3.4.21.4.) es una proteasa pancreática secretada en el intestino anterior que juega un papel muy importante en la hidrólisis de proteínas, hidrolizando los enlaces peptídicos en el extremo carboxilo de los residuos de arginina y lisina (Klomklao *et al.*, 2009), es decir, rompen los enlaces peptídicos situados en el centro de la proteína, dividiéndola en dos fragmentos de aproximadamente el mismo tamaño (Castillo-Yañez *et al.*, 2005). Además, es la encargada de activar los zimógenos pancreáticos para transformarlos a su forma activa, tales como la quimotripsina, la elastasa y las carboxipeptidasas A y B (Corring, 1980; Klomklao *et al.*, 2009). Por lo tanto, desempeña un papel esencial en el proceso digestivo de peces (Hjelmeland y Raa, 1982). En general, se ha descrito que es óptimamente activa a pH de 7.5 a 10 y a temperaturas de 35 a 65°C, y su peso molecular suele variar entre 20 y 30 kDa (Klomklao, 2008).

Como se mencionó anteriormente, la tripsina es la proteasa alcalina más abundante. Jonas *et al.* (1983) observaron en el siluro europeo *Silurus glanis* que la actividad de tripsina es mayor que la de quimotripsina, lo cual también se ha demostrado en otras especies, por ejemplo, Essed *et al.* (2002) encontraron una actividad de tripsina mayor a la actividad de quimotripsina en el atún rojo *Thunnus thynnus*. Adicionalmente reportaron una temperatura y pH óptimos de actividad de proteasas alcalinas de 60°C y de 10 a 12, respectivamente, así como pesos moleculares que varían de 16.8 a 26.8 kDa.

Por su parte, Concha-Frías *et al.* (2016) caracterizaron parcialmente proteasas obtenidas de extractos intestinales del robalo común *Centropomus undecimalis* y reportaron pH óptimos de actividad entre 7 y 11; mientras que la temperatura óptima fue de 65°C y el peso molecular fue de 25 y 35 kDa para tripsina y quimotripsina, respectivamente. Candiotta *et al.* (2018) caracterizaron la tripsina a partir de extractos del intestino del lenguado brasileño *Paralichthys orbignyanus* reportando una temperatura y pH óptimos de actividad de 50°C y 9.5, respectivamente.

Algunos estudios han logrado purificar la tripsina de diversas especies. Castillo-Yañez *et al.* (2005) purificaron y caracterizaron la tripsina de la sardina Monterrey *Sardinops sagax caerulea* con peso molecular de 25 kDa, un pH óptimo de actividad de 8 y una temperatura óptima de 50°C. Bougateg *et al.* (2007) caracterizaron la tripsina purificada de las vísceras de la sardina europea *Sardina pilchardus* y reportaron que la enzima tiene un peso molecular de 25 kDa, con pH y temperatura óptimos de actividad de 8.0 y 60°C, respectivamente. Khantaphant y Benjakul (2010) purificaron la tripsina de ciegos pilóricos del pargo rojo de raya marrón, *Lutjanus vitta*, para la cual reportaron un peso molecular de 24 kDa y una actividad máxima a pH de 8.5 y 60°C. Klomklao *et al.* (2011) también purificaron la tripsina de vísceras del pez gato híbrido *Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus* y reportaron un peso molecular de 24 kDa, y temperatura y pH óptimos de actividad de 60°C y de 8, respectivamente. Silva *et al.* (2011) caracterizaron la tripsina de las vísceras de mojarra caitipa *Diapterus rhombeus*, la enzima purificada presentó un peso molecular de 26.5 kDa, y se observó mayor actividad enzimática entre 50 y 55°C y en pH de 8.5. Freitas-Junior *et al.* (2012) obtuvieron la tripsina purificada a partir de ciegos pilóricos de pirarucú *Arapaima gigas* y describieron una tripsina de 28.0 kDa con temperatura óptima de 65°C y pH de 9.0. Dos Santos *et al.* (2016) purificaron

la tripsina proveniente de ciegos pilóricos del pez lanceta *Luphiosilurus alexandria*, que mostró una actividad máxima a temperatura y pH de 50°C y 9.0, respectivamente, y un peso molecular de 24 kDa. Finalmente, Klomklao y Benjakul (2018) reportaron dos tripsinas, A y B, provenientes del atún blanco *Thunnus alalunga*, las cuales exhibieron pesos moleculares de 21 y 24 kDa, respectivamente, y reportaron que la temperatura óptima de actividad de la tripsina A fue de 60°C y de 55°C para la tripsina B, mientras que la máxima actividad fue a pH de 8.5 para ambas.

I.3. Producción de sciánidos en Golfo de California, México

Los miembros de la familia Scianidae son conocidos como curvinas o tambores, y se caracterizan por ser de cuerpo alargado y comprimido. Son predominantemente marinos y costeros, aunque un gran número de especies pueden ser encontradas temporalmente en aguas salobres, y algunas especies también son dulce-acuícolas (Fischer *et al.*, 1995). Un gran número de miembros de esta familia tiene gran aceptación comercial en mercados nacionales e internacionales por la calidad de su filete. Generalmente poseen elevadas tasas de crecimiento en todas las etapas de su desarrollo y buenos índices de conversión de alimento (Cárdenas, 2012), por ello son de gran interés para la industria acuícola. Un ejemplo de sciánidos de importancia comercial en el Golfo de California es la curvina golfina, *C. othonopterus*, cuya producción de peso eviscerado para los estados de Sonora y Baja California fue de 5,389 toneladas (t) en el año 2016 (Mendivil-Mendoza *et al.*, 2018). Para esta especie se han evaluado aspectos nutricionales y ambientales encaminados al desarrollo de su cultivo, tales como el efecto de diferentes niveles de inclusión de proteína y lípido dietarios en su crecimiento y composición corporal (González-Félix *et al.*, 2015b; Pérez-Velazquez *et al.*, 2014), así como también la influencia del lípido dietario sobre la actividad de la lipasa pancreática dentro del intestino del pez, observándose que a medida que aumenta el lípido dietario, la actividad de lipasa disminuye (González-Félix *et al.*, 2015a). Sin embargo, en otras especies de peces la actividad de la lipasa no se ha visto afectada por altos niveles de lípidos en la dieta (García Meilán *et al.*, 2013; Morais *et al.*, 2004).

Otros sciánidos importantes en las pesquerías del Golfo de California son la curvina de aleta corta *C. parvipinnis* y la curvina de aleta amarilla *C. xanthulus*, que junto con otras especies de sciánidos representan una producción promedio anual de 2,140 t, que equivale al 31.5% de la producción total anual promedio de peces de escama en la región (Carta Estatal Pesquera de Baja California, 2015). Otro sciánido del Golfo de California, *T. macdonaldi*, es el miembro más grande de la familia (Flanagan y Hendrickson, 1976; Román-Rodríguez y Hammann, 1997) y actualmente es una de las principales especies de peces marinos cultivados en los estados de Baja California y Sonora. Rueda-López *et al.* (2017) observaron un aumento de la actividad de lipasa tras haber añadido taurocolato de sodio al alimento en totoaba, pero no se observó un incremento en la actividad cuando se añadió una mezcla de sales biliares o extractos biliares naturales a la reacción, por lo que se sospecha que pudiera tratarse de una lipasa pancreática dependiente de colipasa. En general, la caracterización y cuantificación de enzimas pancreáticas de peces no es común pues en muchos peces el páncreas es un tejido difuso y, por otra parte, tanto la presencia como la actividad de estas enzimas varía dependiendo de la especie, la edad y sus hábitos alimenticios, entre otros factores. Sin embargo, dado que los sciánidos son peces marinos bien representados en el Golfo de California y sus volúmenes de producción pesquera son importantes, la utilización de los subproductos de las pesquerías de *C. othonopterus*, *C. parvipinnis* y *C. xanthulus* pudiera generar un recurso económico adicional para los pescadores y limitar el impacto ecológico negativo que causa el esparcir los desechos de vísceras al medio ambiente marino.

II. JUSTIFICACIÓN

Los sciánidos constituyen una de las familias más importantes en la pesquería del Golfo de California y tienen gran potencial en acuicultura. El conocer diferentes características de sus enzimas digestivas, tales como el peso molecular, el pH y la temperatura óptima para su actividad, entre otras, es importante, ya que sus propiedades de biocatálisis permiten establecer si alguna de ellas pudiera tener aplicaciones biotecnológicas, por ejemplo, en la industria de alimentos, detergentes, o en diversos procesos químicos, lo que representa un excelente uso para los subproductos de la pesca y acuicultura pues les confiere un valor agregado, y provee una fuente de ingreso económico adicional.

III. HIPÓTESIS

Dado que la tripsina y lipasa son importantes en el proceso digestivo de peces carnívoros, se espera observar una actividad alta de estas enzimas en el tracto gastrointestinal de diversas especies de sciánidos regionales, y que dichas enzimas posean distintos tamaños moleculares.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es caracterizar parcialmente y comparar la actividad enzimática de lipasas y tripsinas en el tracto gastrointestinal de *C. parvipinnis*, *C. othonopterus* y *C. xanthulus* del Golfo de California.

IV.2. Objetivos específicos

- Confirmar la presencia de lipasas y tripsinas en el tracto gastrointestinal de las tres especies de sciánidos.
- Determinar el peso molecular de lipasas y tripsinas, y sus concentraciones en diferentes regiones del tracto gastrointestinal de las tres especies de sciánidos.
- Evaluar la actividad enzimática de lipasas y tripsinas en diferentes regiones del tracto gastrointestinal de las tres especies de sciánidos.
- Determinar el pH y temperatura óptima de lipasas y tripsinas en las tres especies de sciánidos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Acopio de organismos

Se obtuvieron 15 organismos silvestres de *C. othonopterus*, 23 de *C. xanthulus* y 33 de *C. parvipinnis* (Figura 1) mediante pesquería artesanal en Bahía de Kino, Sonora, y se transportaron en hielo ($\approx 4^{\circ}\text{C}$) al Laboratorio de Nutrición Acuícola del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS) de la Universidad de Sonora. Una vez en el laboratorio, se identificaron los individuos a nivel de especie utilizando una guía de identificación de peces de la región Pacífico Centro-Oriental (Fischer *et al.*, 1995). Posteriormente, se determinó la longitud y el peso de cada organismo y se evisceraron. El tracto digestivo, hígado y gónadas se pesaron individualmente, se etiquetaron y almacenaron individualmente en bolsas de plástico resellables en ultra-congelación a -82°C para análisis posteriores.

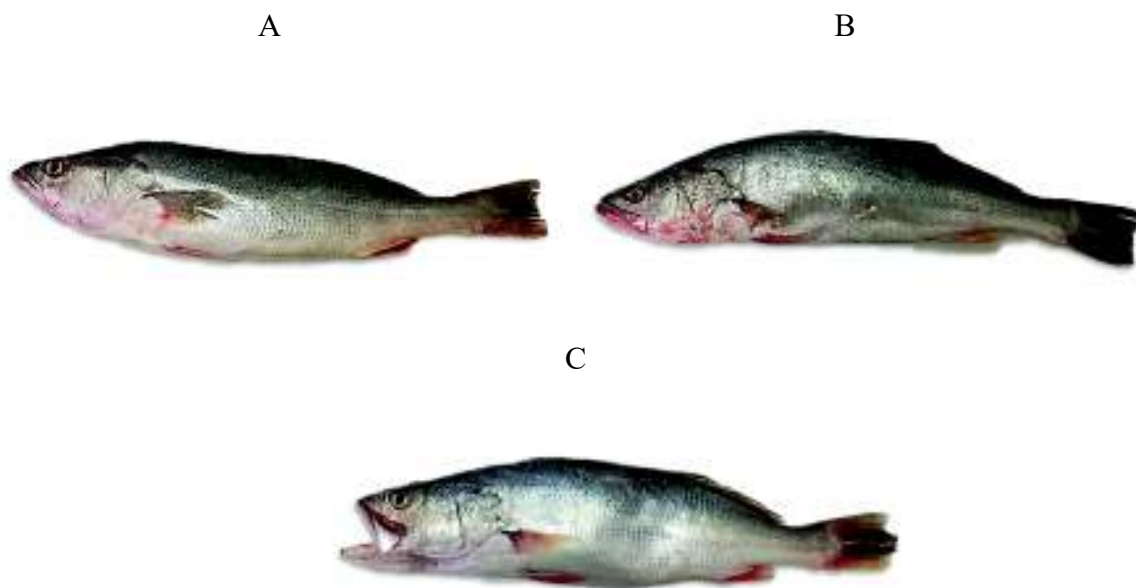


Figura 1. Ejemplares de *Cynoscion othonopterus* (A), *C. parvipinnis* (B) y *C. xanthulus* (C).

V.2. Índices biológicos

El peso del hígado, de las vísceras y de las gónadas de 15 organismos se utilizó para la determinación del índice hepatosomático (IHS), índice viscerosomático (IVS) e índice gonadosomático (IGS), respectivamente, que son índices biológicos a partir de los cuales se puede inferir el estado fisiológico del pez mediante las siguientes formulas:

- Índice hepatosomático (IHS, %) = $\frac{\text{peso de hígado (g)}}{\text{peso del organismo (g)}} \times 100$
- Índice gonadosomático (IGS, %) = $\frac{\text{peso de gónada (g)}}{\text{peso del organismo (g)}} \times 100$
- Índice viscerosomático (IVS, %) = $\frac{\text{peso de víscera (g)}}{\text{peso del organismo (g)}} \times 100$

V.3. Determinación del peso molecular

V.3.1. Preparación del extracto enzimático

Se utilizaron los ciegos pilóricos y el intestino del tracto gastrointestinal (GI) de los organismos, el cual se dividió en intestino anterior, intestino medio e intestino posterior (Figura 2). Se pesó aproximadamente 0.5 g de cada sección y se homogenizaron (T-10 Basic Ultra-Turrax, IKAWorks Inc., Wilmington, NC, USA) en frío (4°C) individualmente en 2.5 mL de buffer Tris-HCl 0.05 M (pH 7.5) con 200 µL de benzamidina (8.7 mM) para los extractos de lipasa, y para los de tripsina en 2.5 mL de buffer Tris-HCl 0.05 M con CaCl₂ 0.02 M (pH 8.2). El extracto crudo se centrifugó (Heraeus Fresco 21, ThermoFisher Scientific, Dreieich, Germany) a 21,000 g y 4°C durante 30 minutos, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente al menos tres ocasiones hasta clarificar. Posteriormente el sobrenadante se concentró y semipurificó en filtros de 30 kDa para lipasa y 10 kDa para la tripsina (Amicon®Ultra-4, Centrifugal filter device, Millipore Corp., Billerica, MA, USA) mediante centrifugación a 1,300 g y 4°C por 30 min. Se recuperó el concentrado y se conservó a -20°C para análisis posteriores.



Figura 2. Secciones del tracto gastrointestinal de *Cynoscion othonopterus*.

V.3.2. Electroforesis SDS-PAGE

Se determinó el peso molecular y se cuantificó la concentración de lipasas y tripsinas en diferentes secciones del tracto GI de cada una de las especies mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), utilizando un sistema electroforético vertical de cuatro geles (Mini-Protean Tetra Cell, Bio-Rad®, Hercules, CA, USA) con geles de acrilamida al 10%. Las corridas electroforéticas se realizaron a un voltaje constante de 115 V en frío ($\approx 4^{\circ}\text{C}$) (Figura 3). Se utilizó un estándar de peso molecular de rango amplio (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad®, Hercules, CA, USA) para la determinación del peso molecular y albúmina de suero bovino (BSA) y tripsina bovina como estándar cuantitativo para lipasa y tripsina, respectivamente. Después de la corrida electroforética, los geles para el análisis de tripsina se incubaron en ácido tricloroacético al 50% durante 18 h, posteriormente las bandas se revelaron mediante inmersión del gel en azul brillante de Coomassie R-250 durante una hora a 37°C , mientras que los geles para el análisis de lipasa se revelaron utilizando la tinción QC Colloidal Coomassie (Bio-Rad®, Hercules, CA, USA) durante 18 h en agitación constante a temperatura ambiente. Finalmente, los geles se lavaron con agua tridestilada para eliminar el exceso de colorante y se escanearon en un densitómetro GS-900 (Bio-Rad®, Hercules, CA, USA) calibrado para la identificación y cuantificación de bandas utilizando el software Image Lab 5.0 (Bio-Rad®, Hercules, CA, USA). El software realiza un análisis cuantitativo de las bandas de interés utilizando la banda de BSA o tripsina bovina de concentración conocida como referencia.

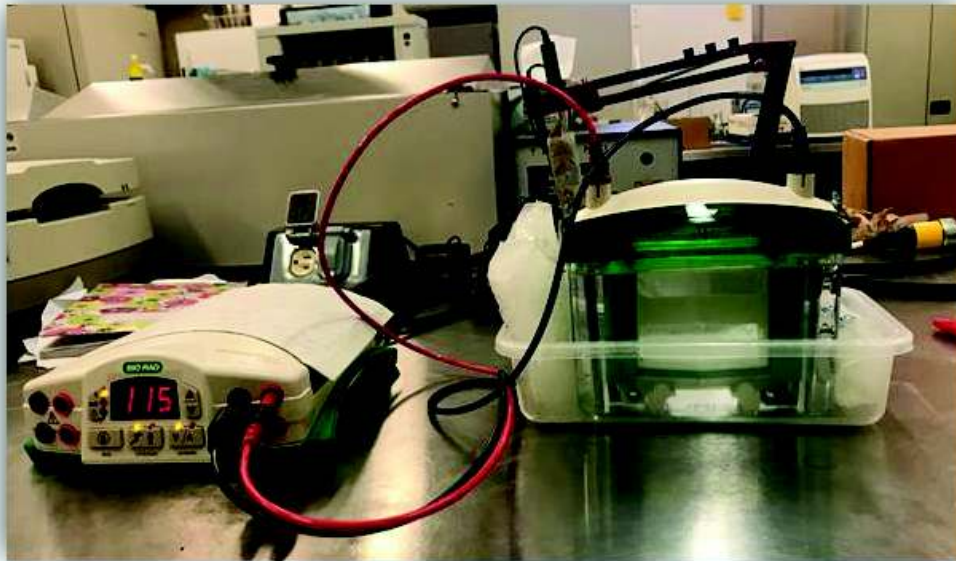


Figura 3. Corrida electroforética de los extractos crudos.

V. 3.3. Zimografía

V.3.3.1. Detección de lipasas mediante zimograma

Las bandas correspondientes a las lipasas del tracto GI de las tres especies se corroboraron mediante el método zimográfico descrito por Raman *et al.* (1998) realizando electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% como se describió anteriormente. Inmediatamente después de la corrida electroforética, el gel se lavó tres veces con agua tridestilada y se sumergió en el sustrato cromogénico, el cual se preparó utilizando el colorante Victoria Blue R en etanol al 70%, ácido oleico como sustrato, goma de acacia y agar al 1% en buffer de fosfato (0.2 M, pH 8.0), que se calentó a 50°C. Se aplicó una ligera capa de buffer de fosfato sobre el gel y después el sustrato cromogénico, se incubó a 37°C durante 12 h, seguido de una tinción con azul brillante de Coomassie R-250 durante 18 h a temperatura ambiente, se lavaron y se escanearon en el densitómetro; las bandas oscuras sobre el fondo claro indican actividad de lipasa.

V.3.3.2. Detección de tripsinas mediante zimograma

Las bandas correspondientes a las tripsinas se detectaron siguiendo el método descrito por García-Carreño *et al.* (1993). Se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida como se describió anteriormente, y al finalizar la corrida el gel se lavó con agua tridestilada y se sumergió en una solución preparada con caseína al 2% en buffer Tris-HCl 0.05 M donde se incubó durante 30 minutos a 5°C. Posteriormente el gel se sumergió en un sustrato de tinción durante 2 h, el cual se preparó con etanol al 40%, ácido acético al 10% y 0.1% de azul brillante de Coomassie R-250. Después de la incubación el gel se lavó con agua tridestilada y se escaneó en el densitómetro; las bandas claras sobre el fondo azul indican actividad de tripsina.

V.4. Actividad de lipasas

V.4.1. Determinación de la actividad de lipasas en cada sección de los tractos gastrointestinales

La actividad de las lipasas en los tractos gastrointestinales se determinó utilizando el método de Ensayo Enzimático de Lipasa de la Comisión Enzimática E.C.3.1.1.3 (Enzyme Commission, 1993) con pequeñas modificaciones. Se preparó una mezcla de reacción que consistió en 0.25 mL de buffer Tris-HCl 0.2 M (pH 7.7), 0.625 mL de agua tridestilada, 0.25 mL del extracto enzimático crudo de cada una de las secciones del tracto GI (intestino anterior-IA, medio-IM y posterior-IP, y ciegos pilóricos-CP) y 0.75 mL de aceite de oliva extra virgen comercial. La mezcla de reacción se incubó a 35°C y 120 rpm en un agitador horizontal durante un tiempo de reacción de 30 min. La reacción se detuvo añadiendo 0.75 mL de etanol al 95%, e inmediatamente después se agregó 20 µL de fenolftaleína al 0.1% seguida por titulación con NaOH 0.2 M hasta que en la muestra se observó un viraje a color rosa claro (Figura 4). Utilizando el mismo procedimiento, se corrieron muestras blanco que se incubaron a 4°C, pero el extracto enzimático se agregó después de 30 min. de incubación. Las mezclas de reacción de cada extracto y sus respectivos blancos se prepararon por duplicado para cada organismo y se analizaron tres organismos por especie. Se definió la actividad de la lipasa en unidades por mL (U/mL) de extracto crudo como la cantidad de enzima que hidroliza 1.0 microequivalente de ácidos grasos de triglicéridos por hora, mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad (U/mL)} = (\text{mL NaOH usados})(M)(1000)(2)(\text{Factor de dilución}) \div (\text{Volumen total})$$

Donde:

Actividad (U/mL) = Unidades de actividad de lipasa/mL de extracto enzimático.

mL NaOH usados = Volumen de NaOH utilizado en el tubo de prueba – Volumen de NaOH utilizado en el tubo blanco.

M = Molaridad del NaOH.

1000 = Factor de conversión de miliequivalentes a microequivalentes.

2 = Factor de conversión de 0.5 a 1 h.

Factor de dilución = Dilución del buffer usado para la extracción del tejido. En este estudio se utilizó el mismo buffer para la extracción y para el ensayo, por lo que el factor de dilución es igual a 1.

Volumen total = Volumen en mL del extracto enzimático utilizado en la reacción.



Figura 4. Mezcla de reacción después de concluir la titulación y el viraje a color rosa durante la determinación de actividad de la lipasa.

V.4.2. Temperatura óptima de actividad de lipasas

Debido a que la actividad enzimática de las lipasas de las tres especies fue superior en el intestino anterior, se utilizó exclusivamente esta sección del tracto GI para evaluar la actividad lipolítica de la enzima en el extracto crudo a diferentes temperaturas, con la finalidad de determinar la temperatura

óptima de actividad. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada especie, y cada mezcla de reacción se evaluó por duplicado acompañado del blanco también por duplicado. Las mezclas de reacción se incubaron a 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 y 70°C durante 30 min. utilizando aceite de oliva como sustrato y buffer Tris-HCl 0.2 M (pH 7.7), mediante la misma metodología descrita anteriormente.

V.4.3. pH óptimo de actividad de lipasas

El pH óptimo de actividad de las lipasas se evaluó también exclusivamente en el intestino anterior por triplicado para cada especie, y cada reacción y blanco por duplicado. El rango de pH que se evaluó fue de 6 a 10 sustituyendo el buffer Tris-HCl 0.2 M (pH 7.7) usado en el ensayo descrito previamente con los siguientes buffers: buffer citrato-fosfato 0.2 M para el pH 6.0, buffer Tris-HCl 0.2 M para pH 7.0 a 9.0 y buffer de glicina-NaOH 0.2 M para pH 10. Las mezclas de reacción se incubaron durante 30 min. a 45°C, siguiendo la metodología descrita anteriormente.

V.5. Actividad de tripsinas

V.5.1. Determinación de la actividad de tripsina en cada sección de los tractos gastrointestinales

Se determinó la actividad de las tripsinas en las cuatro secciones del tracto gastrointestinal para tres organismos de cada especie siguiendo el método descrito por Erlanger *et al.* (1961). Se preparó la mezcla de reacción utilizando N α -Benzoyl-L-arginina 4-nitroanilida clorhidrato (BAPNA) como sustrato de la enzima, diluido en dimetil sulfóxido (DMSO), y éste a su vez diluido en buffer Tris-HCl 0.05 M con CaCl₂ 0.01 M (pH 8.2). Se agregó 1.25 mL del reactivo anterior a un microtubo para centrifuga y 20 μ L del extracto enzimático e inmediatamente se incubó en baño María a 35°C durante 30 min. Después del periodo de incubación la reacción se detuvo con ácido acético al 30%. Cada extracto proveniente de un organismo se analizó por duplicado con muestras blanco también duplicadas. Las muestras blanco se prepararon de la misma forma, sustituyendo el extracto enzimático por agua tridestilada. Posteriormente se leyó la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro de doble haz (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, Dreieich, Germany) observándose un viraje a color amarillo como resultado de la actividad de la tripsina sobre el sustrato (Figura 5). Se determinó la actividad de tripsina mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad (U/mL)} = (\Delta\text{BS} \div V_{\text{total}}) \div (\text{CEM} \times \text{TI} \times V_e)$$

Donde:

Actividad (U/mL) = Unidades de actividad de tripsina/mL de extracto enzimático.

Δ ABS = Absorbancia de la muestra – Absorbancia del blanco.

Vtotal = Volumen total de la reacción.

CEM = Coeficiente de extinción molar.

TI = Tiempo de incubación.

Ve = Volumen del extracto enzimático.



Figura 5. Mezcla de reacción después del viraje a color amarillo durante la determinación de actividad de tripsina.

La concentración de la tripsina se expresó también en mg/mL mediante la transformación de las lecturas de absorbancia a 410 nm obtenidas en el espectrofotómetro. Se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de tripsina bovina y se realizó una regresión lineal con los datos generados (Figura 6). De la ecuación de regresión se obtuvo el coeficiente de extinción molar (0.1445) y la pendiente (0.0073).

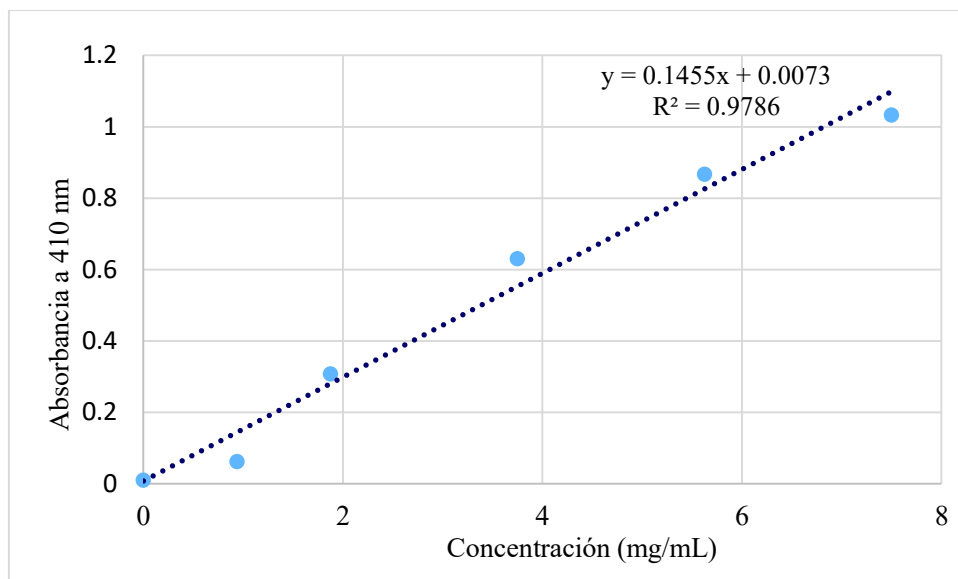


Figura 6. Curva estándar de diferentes concentraciones de tripsina bovina.

La estimación de la concentración de la enzima se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración (mg/mL)} = \frac{\Delta\text{ABS} - m}{\text{CEM}}$$

Donde:

ΔABS = Absorbancia de la muestra – Absorbancia del blanco

m = Pendiente de la recta

CEM: Coeficiente de extinción molar

V.5.2. Temperatura óptima de actividad de tripsinas

Debido a que la actividad enzimática de las tripsinas fue mayor en el IA de las tres especies, se utilizó exclusivamente esta sección para evaluar la actividad proteolítica de las tripsinas en el extracto crudo a diferentes temperaturas en tres organismos de cada especie, y al igual que para las lipasas, cada mezcla de reacción se evaluó por duplicado acompañado del blanco también por duplicado. Con la finalidad de determinar la temperatura óptima de actividad, se siguió el mismo protocolo que se describió anteriormente incubando la mezcla de reacción a 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, y 90°C durante 30 min, y leyendo la absorbancia de la reacción de tripsina con el sustrato a 410 nm.

V.5.3. pH óptimo de actividad de tripsinas

El pH óptimo de actividad de las tripsinas se evaluó en el IA por triplicado en cada especie y con duplicados para cada mezcla de reacción y blancos, en un rango de pH de 6 a 10, sustituyendo el buffer Tris-HCl 0.2 M (pH 7.7) por los siguientes buffers: citrato-NaOH 0.1 M para el pH 6.0, Tris-HCl 0.1 M para pH de 7.0 a 9.0 y glicina-NaOH 0.1 M para el pH de 10. Las mezclas de reacción se incubaron durante 30 minutos a 65°C, y se siguió el protocolo descrito anteriormente leyendo absorbancia a 410 nm.

V.6. Análisis estadístico

Los pesos moleculares y las concentraciones de las lipasas y tripsinas estimadas con el software para *C. othonoperus*, *C. parvipinnis* y *C. xanthulus*, así como los índices biológicos se analizaron mediante estadística descriptiva, mientras que la actividad enzimática en las diferentes secciones del tracto GI, la concentración enzimática (Erlanger *et al.*, 1961), el pH y la temperatura óptima de actividad se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANDEVA) utilizando un nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Cuando se observaron diferencias estadísticamente significativas se utilizó la prueba Tukey-HSD como procedimiento de separación de promedios. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc. 2004, Tulsa OK, USA).

VI. RESULTADOS

VI.1. Parámetros biológicos e índices corporales

El peso total y longitud total de 33 organismos de *C. parvipinnis*, 23 de *C. xanthulus* y 15 de *C. othonopterus* se presenta en la tabla 1. Se registró un peso y longitud promedio de 862.03 g y 46.53 cm, respectivamente, para *C. parvipinnis*, 1129.36 g y 51.02 cm para *C. othonopterus*, y 879.37 g y 47.33 cm para *C. xanthulus*. Se registró el peso de las vísceras, gónadas e hígado de 15 organismos de cada especie, que permitió determinar algunos índices corporales. El índice gonadosomático (IGS) fue de 0.53% en *C. parvipinnis*, 0.08% en *C. othonopterus* y 0.24% en *C. xanthulus*. El índice hepatosomático (IHS) varió de 1.23 a 1.61%, mientras que el índice viscerosomático (IVS) varió de 7.28 a 9.54%.

Tabla 1. Parámetros biológicos e índices corporales de *C. parvipinnis*, *C. othonopterus* y *C. xanthulus*. El peso y longitud son promedio \pm E.E. de 33 organismos de *C. parvipinnis*, 15 organismos de *C. othonopterus* y 23 de *C. xanthulus*. El peso de órganos e índices son promedio \pm E.E. de 15 organismos para cada especie.

Parámetro	<i>C. parvipinnis</i>	<i>C. othonopterus</i>	<i>C. xanthulus</i>
Peso total (g)	862.03 \pm 49.22	1,129.36 \pm 53.92	879.37 \pm 45.55
Longitud total (cm)	46.53 \pm 1.00	51.02 \pm 0.75	47.33 \pm 0.91
Peso de gónada (g)	3.96 \pm 0.91	0.90 \pm 0.27	2.04 \pm 0.49
Peso de hígado (g)	10.01 \pm 0.60	14.21 \pm 1.25	12.69 \pm 1.28
Peso de víscera (g)	65.75 \pm 4.59	82.09 \pm 3.93	70.67 \pm 4.54
IGS (%)	0.53 \pm 0.11	0.08 \pm 0.02	0.24 \pm 0.05
IHS (%)	1.44 \pm 0.06	1.23 \pm 0.06	1.61 \pm 0.13
IVS (%)	9.54 \pm 0.63	7.28 \pm 0.16	9.06 \pm 0.65

VI.2. Lipasas

VI.2.1. Peso molecular de las lipasas

El peso molecular de las lipasas de cada especie se determinó en geles de electroforesis mediante el software Image Lab 5.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., 2013). Las bandas que correspondían a las lipasas fueron posteriormente confirmadas mediante zimogramas, en donde se observa la reacción de actividad de la lipasa con el sustrato cromogénico en color azul sobre un fondo claro. El peso molecular promedio \pm E.E. de la lipasa de *C. othonopterus* fue de 65.8 ± 0.3 kDa (Figura 7); para *C. parvipinnis* se detectaron dos bandas con actividad de lipasa de 61.5 ± 0.2 y 36.0 ± 0.3 kDa (Figura 8), y para *C. xanthulus* el peso molecular de la lipasa fue de 69.5 ± 0.8 kDa (Figura 9).

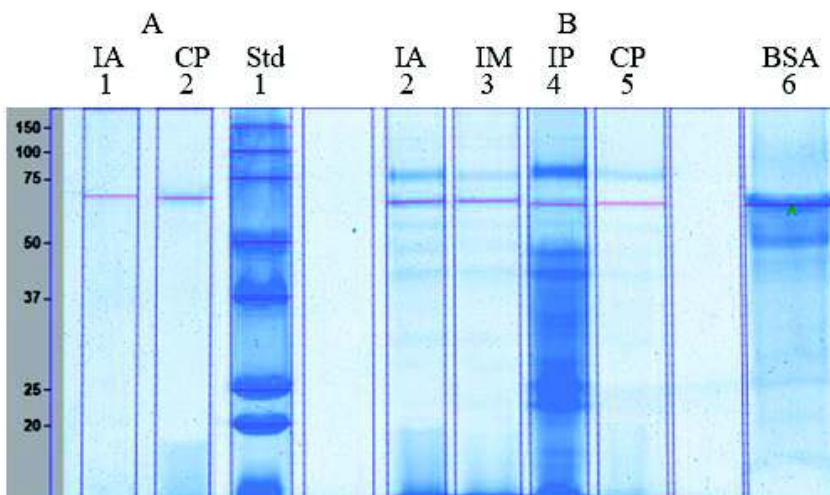


Figura 7. Lipasa de *C. othonopterus*. Panel A) Zimograma: Carril 1) Intestino anterior (IA), 2) Ciegos pilóricos (CP). Panel B) Gel de electroforesis teñido con QC Coomassie Coloidal: Carril 1) Estándar de peso molecular, Carril 2) Intestino anterior, Carril 3) Intestino medio (IM), Carril 4) Intestino posterior (IP), Carril 5) Ciegos pilóricos, Carril 6) Albúmina de suero bovino (BSA) como estándar cuantitativo (A).

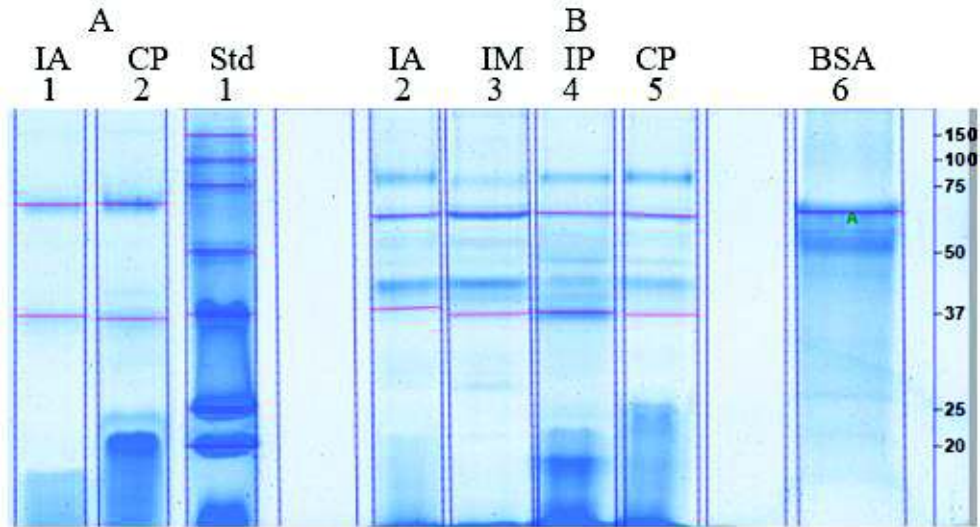


Figura 8. Lipasa de *C. parvipinnis*. Panel A) Zimograma: Carril 1) Intestino anterior (IA) y 2) Ciegos pilóricos (CP). Panel B) Gel de electroforesis teñido con QC Coomassie Coloidal: Carril 1) Estándar de peso molecular, Carril 2) Intestino anterior, Carril 3) Intestino medio (IM), Carril 4) Intestino posterior (IP), Carril 5) Ciegos pilóricos, Carril 6) Albúmina de suero bovino (BSA) como estándar cuantitativo (A).

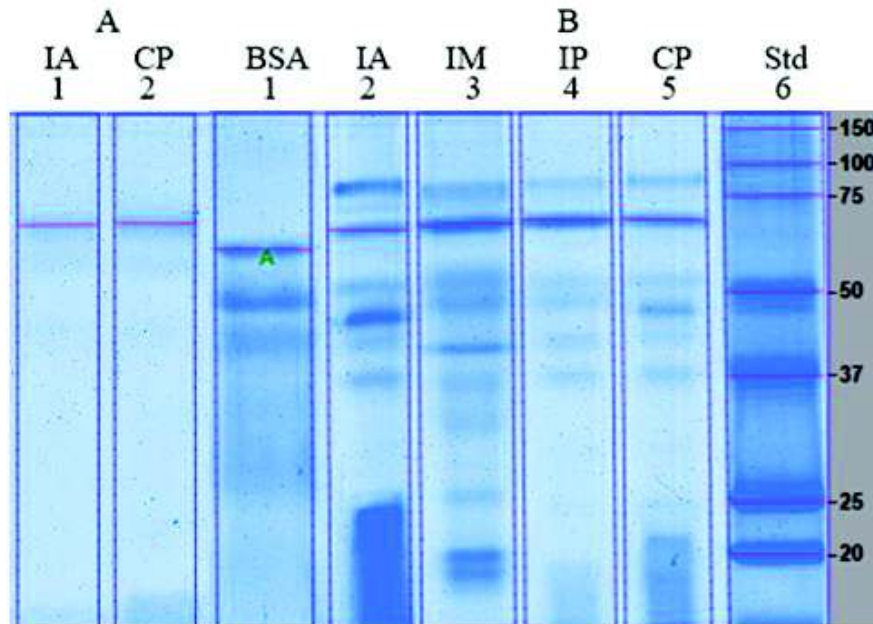


Figura 9. Lipasa de *C. xanthulus*. Panel A) Zimograma: Carril 1) Intestino anterior (IA) y 2) Ciegos pilóricos (CP). Panel B) Gel de electroforesis teñido con QC Coomassie Coloidal: Carril 1) Albúmina de suero bovino (BSA) como estándar cuantitativo (A), Carril 2) Intestino anterior (IA), Carril 3) Intestino medio (IM), Carril 4) Intestino posterior (IP), Carril 5) Ciegos pilóricos (CP), Carril 6) Estándar de peso molecular.

VI.2.2. Concentración de lipasas estimada por densitometría y BSA como estándar cuantitativo

La concentración de la lipasa de las tres especies determinada mediante el software Image Lab 5.0 (Bio-Rad®, Hercules, CA, EUA) estableció concentraciones de lipasa variables en tracto GI de cada especie. En *C. othonopterus* se observó una concentración de 0.72 a 0.40 mg/mL, en *C. parvipinnis* de 0.62 a 0.20 mg/mL y en *C. xanthulus* de 0.69 a 0.32 mg/mL (Tabla 2). Las mayores concentraciones se registraron en intestino medio y las menores en intestino posterior.

Tabla 2. Concentración de lipasa estimada por densitometría en las diferentes secciones del tracto GI de *C. othonopterus*, *C. parvipinnis* y *C. xanthulus*. Los valores son promedios \pm E.E. de tres réplicas para cada especie.

Región del TG	Concentración mg/mL		
	<i>C. othonopterus</i>	<i>C. parvipinnis</i>	<i>C. xanthulus</i>
IA	0.49 \pm 0.03	0.54 \pm 0.11	0.66 \pm 0.06
IM	0.72 \pm 0.03	0.62 \pm 0.13	0.69 \pm 0.06
IP	0.40 \pm 0.003	0.20 \pm 0.13	0.32 \pm 0.11
CP	0.61 \pm 0.04	0.52 \pm 0.13	0.52 \pm 0.23

VI.2.3. Actividad enzimática de las lipasas en diferentes secciones del tracto gastrointestinal

El promedio \pm E.E. de la actividad de las lipasas de las tres especies de sciánidos en diferentes secciones del tracto GI se presenta en la tabla 3. La actividad lipolítica de *C. othonopterus* fue mayor en el IA, con 101.00 U/mL, seguida por CP e IM. En IP la actividad fue significativamente menor que en IA, pero no fue diferente de CP e IM. En *C. parvipinnis* la actividad de lipasa fue más alta en IA, con 133.33 U/mL pero no fue significativamente diferente de CP. El IM e IP presentaron una menor actividad y no fueron significativamente diferentes de CP. De igual manera, la actividad lipolítica de *C. xanthulus* fue mayor en IA con 113.60 U/mL, seguida de CP, la cual no fue significativamente diferente de IA. En IM, la actividad fue estadísticamente igual a CP, y la menor actividad se presentó en IP, pero no fue estadísticamente diferente de IM.

Tabla 3. Actividad de lipasa en diferentes secciones del tracto GI de *C. othonopterus*, *C. parvipinnis* y *C. xanthulus*. Los valores son promedios \pm E.E. de 3 réplicas para cada región analizadas por duplicado. Los promedios con diferentes superíndices en la misma columna son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Región del TG	Actividad U/mL		
	<i>C. othonopterus</i>	<i>C. parvipinnis</i>	<i>C. xanthulus</i>
IA	101.00 ^a \pm 9.55	133.33 ^a \pm 19.56	113.60 ^a \pm 15.47
CP	81.33 ^{ab} \pm 6.98	86.00 ^{ab} \pm 15.10	89.00 ^{ab} \pm 12.96
IM	73.14 ^{ab} \pm 8.67	65.33 ^b \pm 5.23	64.00 ^{bc} \pm 5.84
IP	50.67 ^b \pm 4.09	56.00 ^b \pm 6.53	44.00 ^c \pm 4.78
ANOVA $P>F$	0.002	0.003	0.000734

VI.2.4. Temperatura óptima de actividad de las lipasas

La temperatura óptima de actividad de la lipasa evaluada en IA de *C. parvipinnis* y *C. xanthulus* se evaluó en un rango de temperatura de 20 a 60°C, mediante el método de ensayo enzimático E.C.3.1.1.3 de la Comisión Enzimática. Sin embargo, no se logró determinar un óptimo de actividad para esta enzima, ya que los datos de actividad obtenidos resultaron sumamente inconsistentes en las diferentes temperaturas evaluadas para las dos especies. Por ejemplo, para *C. parvipinnis*, se observó mayor actividad a 20°C seguida por 60°C y posteriormente por 25°C y 55°C (Figura 10). Por lo tanto, dado la inconsistencia observada en los datos generados, no se realizó este análisis con *C. othonopterus* ni se evaluó el efecto del pH sobre la actividad de la lipasa mediante esta metodología.

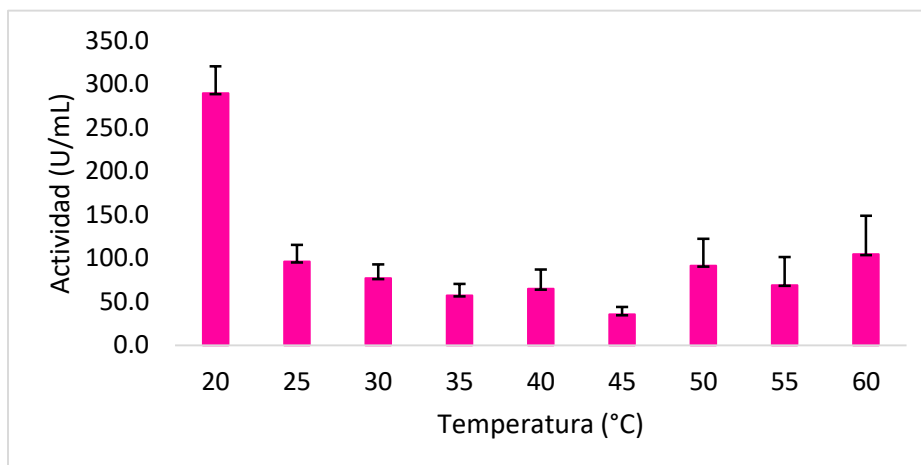


Figura 10. Actividad de lipasa en intestino anterior de *C. parvipinnis* a diferentes temperaturas. Los valores son promedios de tres repeticiones con duplicados.

VI.3. Tripsina

VI.3.1. Peso molecular de la tripsina

Se confirmó la presencia de tripsina en las tres especies de sciánidos mediante zimogramas, cuya banda se observa en un color claro sobre un fondo azul oscuro. El peso molecular \pm E.E. de la tripsina de *C. othonopterus* fue de 24.4 ± 0.15 kDa (Figura 11), la de *C. parvipinnis* fue de 23.6 ± 0.12 kDa (Figura 12) y la de *C. xanthulus* fue de 23.7 ± 0.11 kDa (Figura 13).

VI.3.2. Concentración de tripsinas estimada por densitometría y tripsina bovina como estándar cuantitativo

Se determinó la concentración de tripsina mediante el software Image Lab 5.0 (Tabla 4). Los valores de concentración variaron de 0.09 a 0.19 mg/mL. La concentración observada en intestino anterior y ciegos pilóricos de *C. othonopterus* fueron mayores que en intestino medio y posterior, mientras que en *C. parvipinnis* la mayor concentración se observó en ciegos pilóricos. En *C. xanthulus* se observaron valores semejantes (≈ 0.10 mg/mL) en todas las secciones del tracto GI.

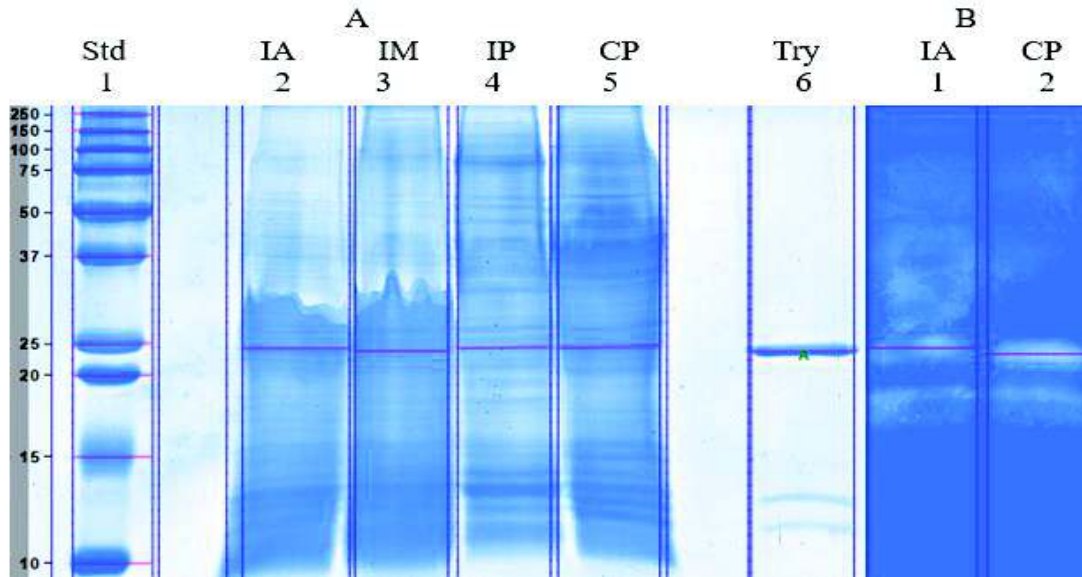


Figura 11. Tripsina de *C. othonopterus*: Panel A) Gel de electroforesis teñido con QC Colloidal Coomassie: Carril 1) Estándar de peso molecular, Carril 2) Intestino anterior (IA), Carril 3) Intestino medio (IM), Carril 4) Intestino posterior (IP), Carril 5) Ciegos pilóricos (CP), Carril 6) Tripsina bovina (Try)) como estándar cuantitativo (A). Panel B) Zimograma: Carril 1) Intestino anterior, 2) Ciegos pilóricos.

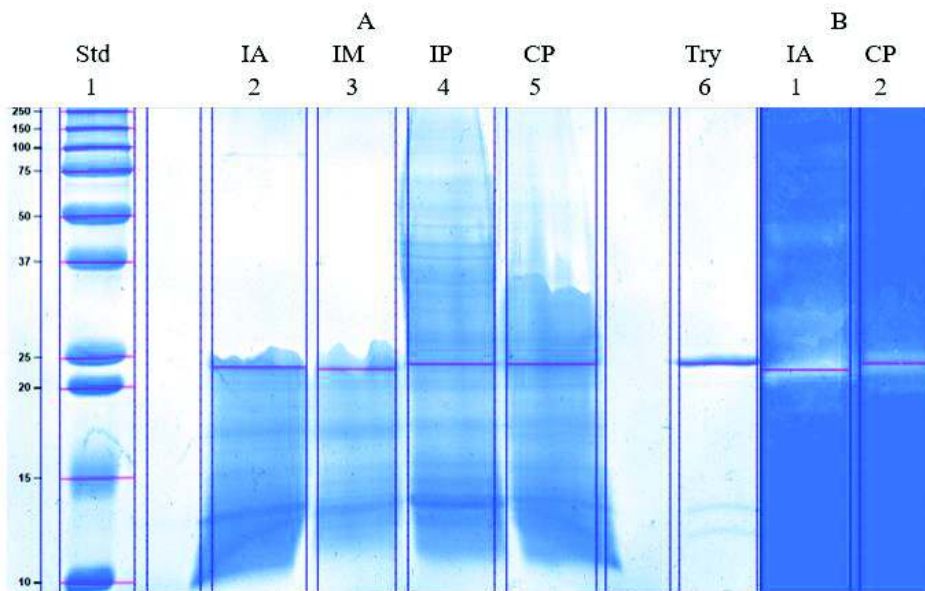


Figura 12. Tripsina de *C. parvipinnis*: Panel A) Gel de electroforesis teñido con QC Colloidal Coomassie: Carril 1) Estándar de peso molecular, Carril 2) Intestino anterior (IA), Carril 3) Intestino medio (IM), Carril 4) Intestino posterior (IP), Carril 5) Ciegos pilóricos (CP), Carril 6) Tripsina bovina (Try) como estándar cuantitativo (A). Panel B) Zimograma: Carril 1) Intestino anterior, 2) Ciegos pilóricos.

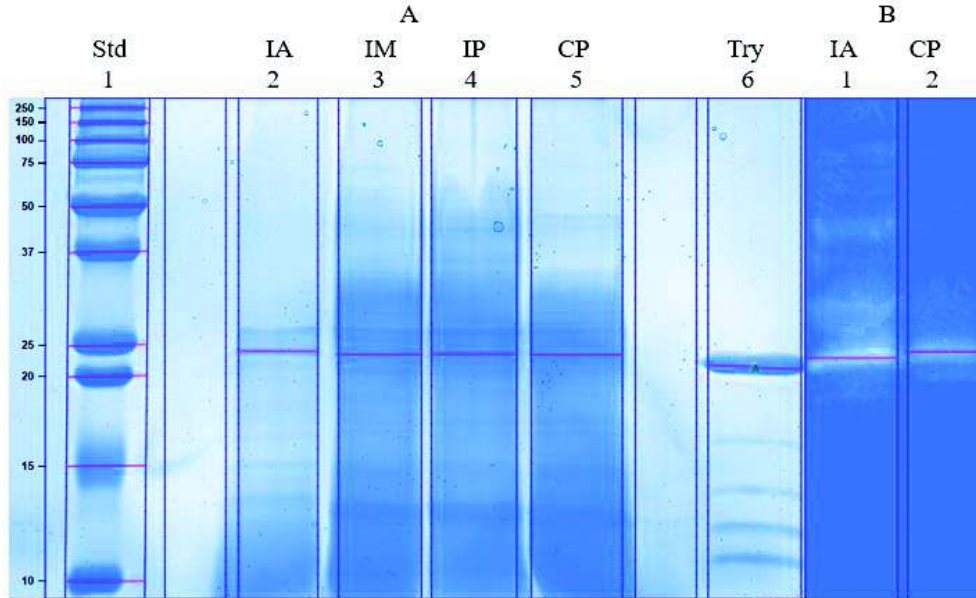


Figura 13. Tripsina de *C. xanthulus*: Panel A) Gel de electroforesis teñido con QC Colloidal Coomassie: Carril 1) Estándar de peso molecular, Carril 2) Intestino anterior (IA), Carril 3) Intestino medio (IM), Carril 4) Intestino posterior (IP), Carril 5) Ciegos pilóricos (CP), Carril 6) Tripsina bovina (Try) como estándar cuantitativo (A). Panel B) Zimograma: Carril 1) Intestino anterior, 2) Ciegos pilóricos.

Tabla 4. Concentración de tripsina estimada por densitometría en las diferentes secciones del tracto gastrointestinal de *C. othonopterus*, *C. parvipinnis* y *C. xanthulus*. Los valores son promedios \pm E.E. de tres réplicas para cada especie.

Región del TG	Concentración mg/mL		
	<i>C. othonopterus</i>	<i>C. parvipinnis</i>	<i>C. xanthulus</i>
IA	0.19 \pm 0.01	0.12 \pm 0.04	0.10 \pm 0.02
IM	0.13 \pm 0.01	0.11 \pm 0.04	0.09 \pm 0.01
IP	0.13 \pm 0.02	0.10 \pm 0.03	0.10 \pm 0.004
CP	0.17 \pm 0.01	0.16 \pm 0.03	0.10 \pm 0.01

VI.3.3. Actividad enzimática de las tripsinas en diferentes secciones del tracto gastrointestinal

Los valores registrados para la actividad de tripsina en las tres especies, evaluada en diferentes secciones del tracto GI a 35°C, son el promedio \pm E.E. de tres organismos experimentales y se observan en la tabla 5. La actividad proteolítica en *C. othonopterus* fue significativamente mayor en IA que en las demás secciones, con 65.11 U/mL. No se observaron diferencias estadísticas entre la actividad de IM, de CP, o de IP. La actividad proteolítica de tripsina de *C. parvipinnis* también fue mayor en IA con 66.54 U/mL, y no fue significativamente diferente de lo observado en CP, y la actividad en CP no fue significativamente diferente de IM e IP. En *C. xanthulus* no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de tripsina, sin embargo, numéricamente se observó mayor actividad también en IA y la menor en IP (Tabla 6).

Tabla 5. Actividad de tripsina en las diferentes secciones del tracto gastrointestinal de *C. othonopterus*, *C. parvipinnis* y *C. xanthulus*. Los valores son promedios \pm E.E. de 3 réplicas para cada región analizadas por duplicado. Los promedios con diferentes superíndices en la misma columna son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Región del TG	Actividad (U/mL)		
	<i>C. othonopterus</i>	<i>C. parvipinnis</i>	<i>C.xanthulus</i>
IA	65.11 ^a \pm 19.93	66.54 ^a \pm 21.26	108.82 \pm 52.33
CP	17.27 ^b \pm 5.80	30.82 ^{ab} \pm 4.46	57.05 \pm 12.54
IM	24.60 ^b \pm 6.97	20.73 ^b \pm 1.77	85.23 \pm 25.29
IP	17.82 ^b \pm 4.97	21.70 ^b \pm 5.09	27.88 \pm 1.45
ANOVA $P > F$	0.0352	0.0286	0.2757

La concentración de tripsina estimada mediante regresión lineal (Tabla 6) muestra las mismas diferencias estadísticas observadas para la actividad. Solamente se detectaron diferencias estadísticas para *C. othonopterus* y *C. parvipinnis*, pero no para *C. xanthulus*. En *C. othonopterus* se detectó una significativamente mayor actividad en IA, y en *C. parvipinnis*, la concentración de tripsina en IA y CP no fue significativamente diferente, así como tampoco lo

fueron la de CP, IM e IP. La concentración osciló en un rango de 0.21 a 1.61 mg/mL en las tres especies.

Tabla 6. Concentración de tripsina en las diferentes secciones del tracto gastrointestinal de *C. othonopterus*, *C. parvipinnis* y *C. xanthulus*. Los valores son promedios \pm E.E. de 3 réplicas para cada región analizadas por duplicado. Los promedios con diferentes superíndices en la misma columna son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Región del TG	Concentración (mg/mL)		
	<i>C. othonopterus</i>	<i>C. parvipinnis</i>	<i>C.xanthulus</i>
IA	0.94 ^a \pm 0.30	0.96 ^a \pm 0.32	1.61 \pm 0.80
CP	0.21 ^b \pm 0.09	0.42 ^{ab} \pm 0.07	0.82 \pm 0.19
IM	0.32 ^b \pm 0.11	0.27 ^b \pm 0.03	1.25 \pm 0.39
IP	0.22 ^b \pm 0.08	0.28 ^b \pm 0.08	0.38 \pm 0.02
ANOVA $P > F$	0.0346	0.0290	0.2766

VI.3.4. Temperatura óptima de actividad de tripsinas

La temperatura óptima de actividad de tripsina evaluada en intestino anterior de cada una de las especies se presenta en la Tabla 7. Se evaluó un rango de temperatura de 20 a 90°C. La actividad óptima de tripsina del intestino anterior de *C. othonopterus* fue a 60°C con 426.28 U/mL (Figura 14), sin embargo, no fue significativamente diferente de la actividad registrada a 55 ó 65°C, con valores de 307.13 y 318.43 U/mL, respectivamente. Por otra parte, la actividad de tripsina de intestino anterior de *C. parvipinnis* y *C. xanthulus* fue significativamente mayor a 65°C, con valores de 699.38 y 160.67 U/mL, respectivamente (Figuras 15 y 16). En las tres especies se observó una caída drástica en la actividad a 70°C.

Tabla 7. Actividad de tripsina en intestino anterior de *C. othonopterus*, *C. parvipinnis* y *C. xanthulus* a diferentes temperaturas. Los valores son promedios \pm E.E. de 3 réplicas para cada región analizadas por duplicado. Los promedios con diferentes superíndices en la misma columna son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Temperatura	Actividad U/mL		
	<i>C. othonopterus</i>	<i>C. parvipinnis</i>	<i>C. xanthulus</i>
20°C	19.10 ^{fg} \pm 0.79	15.83 ^{fh} \pm 0.91	13.90 ^{cef} \pm 1.88
25°C	26.56 ^{fg} \pm 3.63	18.76 ^{fh} \pm 3.10	15.03 ^{cef} \pm 1.45
30°C	80.82 ^{cdef} \pm 18.24	24.87 ^{fgh} \pm 2.06	14.70 ^{cef} \pm 0.64
35°C	100.49 ^{cdef} \pm 18.46	27.81 ^{fgh} \pm 4.85	20.69 ^{cdef} \pm 1.64
40°C	146.05 ^{cdef} \pm 30.99	37.08 ^{fgh} \pm 4.17	21.59 ^{cdef} \pm 1.16
45°C	184.37 ^{bcd} \pm 34.40	82.75 ^{dfg} \pm 12.72	24.19 ^{cdef} \pm 0.68
50°C	229.92 ^{bcd} \pm 41.79	132.26 ^{deg} \pm 16.92	30.29 ^{cdef} \pm 0.79
55°C	307.13 ^{abcd} \pm 57.68	200.19 ^{ce} \pm 28.58	42.05 ^{bcde} \pm 5.61
60°C	426.28 ^{ab} \pm 81.43	473.34 ^b \pm 8.75	62.62 ^{bd} \pm 7.91
65°C	318.43 ^{abcd} \pm 36.22	699.38 ^a \pm 27.60	160.67 ^a \pm 3.37
70°C	48.00 ^{defg} \pm 2.92	146.16 ^{cde} \pm 11.49	64.89 ^{bd} \pm 7.57
75°C	36.17 ^{defg} \pm 5.36	39.11 ^{fgh} \pm 5.39	36.06 ^{cdef} \pm 9.22
80°C	29.16 ^{efg} \pm 5.33	38.74 ^{fgh} \pm 5.92	35.27 ^{cdef} \pm 5.52
85°C	28.86 ^{efg} \pm 6.33	42.05 ^{fgh} \pm 4.96	42.16 ^{bcdef} \pm 6.60
90°C	26.68 ^{efg} \pm 5.79	40.62 ^{fgh} \pm 4.97	27.24 ^{cdef} \pm 6.55
ANOVA $P > F$	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

VI.3.5. pH óptimo de actividad de tripsinas

La actividad proteolítica de tripsina a diferentes pH se presenta en la Tabla 8. La mayor actividad proteolítica se observó a pH 8.0 en *C. othonopterus*, con 797.84 U/mL, no obstante, no fue significativamente diferente de la actividad a pH de 9.0, de 527.90 U/mL. (Figura 17). En *C. parvipinnis* la mayor actividad de tripsina también se registró a pH de 8.0, con 845.20 U/mL; sin embargo, este valor tampoco fue significativamente diferente del valor registrado a pH de 7, con 653.30 U/mL (Figura 18). Finalmente, en *C. xanthulus* se obtuvo una significativamente mayor actividad de tripsina a pH de 8.0, con 782.80 U/ml, mayor que todos los valores de actividad registrada a otros pH (Figura 19).

Tabla 8. Actividad de tripsina en intestino anterior de *C. othonopterus*, *C. parvipinnis* y *C. xanthulus* a diferentes pH. Los valores son promedios \pm E.E. de 3 réplicas para cada región analizadas por duplicado. Los promedios con diferentes superíndices en la misma columna son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

pH	Actividad U/mL		
	<i>C.othonopterus</i>	<i>C. parvipinnis</i>	<i>C. xanthulus</i>
6	291.15 ^{bc} \pm 34.93	227.32 ^{cb} \pm 10.32	306.11 ^{cde} \pm 9.91
7	493.42 ^{bc} \pm 20.23	653.30 ^{abc} \pm 75.83	499.75 ^b \pm 44.19
8	797.84 ^a \pm 31.65	845.20 ^a \pm 48.15	782.80 ^a \pm 2.37
9	527.90 ^{ab} \pm 72.25	462.49 ^{bcd} \pm 61.70	325.90 ^{cd} \pm 15.97
10	245.41 ^{bc} \pm 6.26	211.50 ^{cd} \pm 10.69	215.79 ^{de} \pm 11.33
ANOVA $P>F$	0.0003	< 0.0001	< 0.0001

VII. DISCUSIÓN

VII.1. Parámetros biológicos e índices corporales

En el presente estudio, se registró un peso promedio en los organismos experimentales de 862.03, 1129.36 y 879.37 g, y una longitud promedio de 46.53, 51.02 y 47.33 cm para *C. parvipinnis*, *C. othonopterus* y *C. xanthulus*, respectivamente. Los valores de estos parámetros corresponden a peces de talla grande y característicos de organismos de talla comercial. Por otra parte, los valores observados para el IHS de 1.44, 1.23 y 1.61%, para el IVS de 9.54, 7.28 y 9.06%, y para el IGS de 0.53, 0.08 y 0.24% en *C. parvipinnis*, *C. othonopterus* y *C. xanthulus*, respectivamente, son valores comparables a valores reportados en la literatura de otras especies de sciánidos e inclusive las mismas. Para *C. parvipinnis* se han reportado valores de IHS de 0.9-2.6% y un IVS de 3.7-5.9% (González-Félix *et al.*, 2017) y en *C. othonopterus* se han reportado valores de IHS de 2.2-2.9% (González-Félix *et al.*, 2015b). En otro sciánidos como *T. macdonaldi* se presentaron datos de IHS de 1.6-2.2% y de IVS de 3.6-4.5% (González-Félix *et al.*, 2017a) y para *S. ocellatus* se reportaron valores de IHS de 1.33-1.96% (Castillo *et al.*, 2015). Las diferencias entre los valores reportados en este estudio y los valores reportados en la literatura, principalmente en el IVS, pueden atribuirse a la diferencia en tallas, pues en la literatura prácticamente todos los peces son juveniles más pequeños que los organismos utilizados aquí, la diferencia radica principalmente en la talla, sin embargo, algo que sigue siendo evidente es el buen estado fisiológico de los organismos experimentales.

VII.2. Lipasa

Se comprobó la presencia de la lipasa en el tracto GI de *C. othonopterus*, *C. xanthulus* y *C. parvipinnis*. Las lipasas están presentes en especies de peces carnívoros que, además de consumir alto contenido de proteína, también consumen grasa que suele estar presente en su dieta natural.

En *C. othonopterus* el peso molecular de la lipasa fue de 65.8 kDa, semejante al peso molecular de la lipasa de *Pagrus major* de 64 kDa reportada por Ijima *et al.* (1998). En el caso de *C. parvipinnis*, la lipasa mostró dos bandas de 61.5 y 36.0 kDa, suceso similar a lo observado

en una investigación realizada por Kurtovic *et al.* (2010) con la lipasa de *O. tshawytscha*, donde se detectaron dos bandas, una de 79.6 kDa y otra de 54.9 kDa, lo cual atribuyeron a dos posibles isozimas de la enzima. Por otra parte, Gjellesvik *et al.* (1992) reportaron que la lipasa del bacalao del Atlántico *Gadus morhua* tiene un peso molecular de 60 kDa, valor muy similar al peso molecular de la primera banda de lipasa de *C. parvipinnis* mencionada. Finalmente, la lipasa de *C. xanthulus* presentó un peso molecular de 69.6 kDa, un valor cercano al peso molecular de la lipasa pancreática de *T. macdonaldi* con 70.4 kDa reportado por González-Félix *et al.* (2018a), y también similar al peso molecular de lipasa purificada de la gran carpa india *Catla catla* de 70 kDa reportado por Kameshwar-Sharma *et al.* (2014). Estudios adicionales en peces han reportado pesos moleculares de lipasa tales como 80.3 kDa en *S. ocellatus* (González-Félix *et al.*, 2018b), 74 kDa en la carpa común *Cyprinus carpio* (Görgün *et al.*, 2012), y 44.6 kDa de *M. novaezelandiae* (Kurtovic *et al.*, 2010). Görgün *et al.* (2012) sugieren que el peso molecular de la lipasa de peces marinos varía según la especie, y estas diferencias en la estructura tridimensional de las enzimas pudieran atribuirse a diferencias en la secuencia de aminoácidos que conforman la estructura primaria de las proteínas como resultado de diversidad en la constitución genética de las especies y también como posible resultado de sus adaptaciones ambientales (Klomklao *et al.*, 2006), pero es posible que los hábitos alimenticios también jueguen un papel muy importante en las diferencias estructurales de las lipasas y otras enzimas digestivas de los peces.

La actividad enzimática de lipasa evaluada en las diferentes secciones del tracto GI de *C. othonpterus*, *C. parvipinnis* y *C. xanthulus* a 35°C confirmó que el intestino anterior es la sección que, numéricamente, presenta la mayor actividad enzimática, aunque no necesariamente es diferente estadísticamente de ciegos pilóricos, y en general, se observa una disminución gradual de actividad conforme se avanza en el intestino hacia el extremo posterior. Este comportamiento concuerda con previas investigaciones que han demostrado que la digestión y absorción de lípidos en peces marinos se produce en el intestino anterior (Borlongan 1990; Rust 2002). González-Félix *et al.* (2018a) también reportaron mayor actividad lipolítica en intestino anterior y ciegos pilóricos de *T. macdonaldi* en comparación a la actividad observada en las partes distales del intestino, y en la dorada *Sparus aurata* y en *T. orientalis* se observó el mismo comportamiento (Deguara *et al.*, 2003; Matus de la Parra *et al.*, 2007). Dado que las enzimas

pancreáticas se secretan en el intestino anterior de los peces, se explica perfectamente el por qué hay mayor actividad en las secciones anteriores del tracto y menor actividad hacia la parte posterior o final. Por otra parte, debido a que la lipasa es una proteína, la misma enzima está expuesta a ser hidrolizada por proteasas que se encuentren en el tracto GI, por lo que es posible que, al llegar a la sección media y posterior del intestino, la lipasa haya sido objeto de proteólisis. Es interesante destacar que la lipasa de las tres especies de sciánidos demostró su habilidad catalítica para hidrolizar los ácidos grasos esterificados a las moléculas de triacilglicerol presentes en el aceite de oliva, ello hace suponer que el mecanismo catalítico en las lipasas de estas especies de peces es similar al mecanismo catalítico en una diversidad de organismos superiores, y que, en condiciones de cultivo por ejemplo, pudieran utilizar fuentes de lípidos dietarios de origen vegetal para estas especies, siempre y cuando se satisficieran sus requerimientos de ácidos grasos esenciales.

Desafortunadamente, los valores obtenidos al determinar la temperatura óptima de actividad resultaron ser inconsistentes y poco confiables al utilizar la metodología de la Comisión Enzimática E.C.3.1.1.3 (Enzyme Commission, 1993) que se utilizó exitosamente para establecer la temperatura óptima de actividad de otras especies como *T. macdonaldi*, otro miembro de la misma familia también endémico del Golfo de California, cuya lipasa presentó mayor actividad a 45°C (González-Félix *et al.*, 2018a). Rueda-López *et al.* (2017) reportaron un óptimo de actividad de lipasas de 35 a 45°C en *T. orientalis*, *Morone saxatilis*, y *T. macdonaldi*. Kurtovic *et al.* (2010) caracterizaron las lipasas de *O. tshawytscha* y *M. novaezelandiae*, y en ambos peces la temperatura óptima de actividad de la lipasa fue a 35°C. La diferencia en la temperatura óptima de actividad de las enzimas pancreáticas de peces podría estar relacionada con la temperatura del agua en que habitan, y cada especie tiene una temperatura óptima para su adecuado desempeño biológico (Klomklao y Benjakul, 2018). Sin embargo, generalmente la temperatura óptima de actividad enzimática en peces y en vertebrados superiores es mayor que su temperatura óptima fisiológica (Murray *et al.*, 1990). Las especies de sciánidos que se describen en este trabajo, en su ambiente natural, se encuentran a temperaturas promedio en un rango de 19.76 ± 2.33 y hasta 27.80 ± 1.94 °C (Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura, 2018). Debido a que no se logró determinar exitosamente la temperatura óptima de la lipasa de ninguna especie, no se determinó tampoco el pH óptimo que se evaluaría una vez determinada la

temperatura óptima, por lo que se recomienda utilizar otra metodología analítica para llevar a cabo estas determinaciones.

VII.3. Tripsina

El peso molecular de la tripsina del tracto GI de *C. othonopterus* fue de 24.4 kDa, mientras que el peso molecular de la tripsina de *C. parvipinnis* fue de 23.6 kDa y el de *C. xanthulus* fue de 23.7 kDa. Estos valores son semejantes a los de las tripsinas de mamíferos y otras especies de peces marinos, tales como la tripsina de *S. sagax caerulea*, que tiene un peso molecular de 25 kDa (Castillo-Yañez *et al.*, 2005) y la tripsina del gobio *Zosterisessor ophiocephalus*, con un peso molecular de 23.2 kDa (Nasri *et al.*, 2012). Klomklao *et al.* (2011) obtuvieron la tripsina purificada de *C. macrocephalus* × *C. gariepinus*, con un peso molecular de 24 kDa. En otro estudio, Klomklao *et al.* (2018) informaron sobre dos tripsinas (A y B) presentes en *T. alalunga*, con pesos moleculares de 21 y 24 kDa. La tripsina del ciego pilórico de tambaqui *Colossoma macropomum*, presentó un peso molecular de 23.9 kDa (Marcuschi *et al.*, 2010) y la tripsina de *D. rhombeus* fue de 26.5 kDa (Silva *et al.*, 2011). Es común que el peso molecular de la misma enzima en diferentes especies sea distinto, dado que se espera variación genética entre ellas (Klomklao *et al.*, 2007) en la estructura primaria, secundaria y terciaria de la proteína, aun cuando se trate de especies emparentadas, generadas por diferentes presiones ecológicas o ambientales en las que se han desarrollado, y que resultan en adaptaciones evolutivas incluso a nivel molecular (Jellouli *et al.*, 2009).

De manera semejante a lo observado para la lipasa, la actividad proteolítica fue significativamente mayor en el intestino anterior de *C. othonopterus*, respecto a las demás secciones del tracto GI y también en *C. parvipinnis*, aunque no fue significativamente diferente a los ciegos pilóricos. En *C. xanthulus* no se detectaron diferencias significativas, sin embargo, la actividad fue numéricamente mayor en intestino anterior. Langeland *et al.* (2013) también reportaron una mayor actividad de la tripsina en intestino anterior comparado con otras secciones del tracto GI de la trucha alpina *Salvelinus alpinus*, mientras que Torrissen *et al.* (1984) encontraron una mayor actividad de tripsina en el intestino anterior del salmón del atlántico *Salmo salar* y de *O. mykiss*. Lo anterior puede ser explicado de la misma forma que lo observado

en lipasas, la tripsina también es sintetizada en páncreas e ingresa al intestino en la región anterior del tracto digestivo (Einarsson *et al.*, 1996).

La máxima actividad de tripsina de *C. othonopterus* se observó a 60°C, aunque no fue significativamente mayor a la actividad presentada a 55 o 65°C. Ello concuerda con los resultados reportados por Klomklao *et al.* (2009) para dos isoformas de tripsina del intestino del barrilete *Katsuwonus pelamis*, con actividad óptima a 55 y 60°C para cada tripsina. También Klomklao *et al.* (2011) reportaron para tripsina de las vísceras de *C. macrocephalus* × *C. gariepinus* una temperatura óptima de actividad de 60°C, al igual que la de *O. tshawytscha* (Kurtovic *et al.*, 2006), la de *S. pilchardus* (Bougatef *et al.*, 2007) y del mújol *Mugil cephalus* (Guizani *et al.*, 1991). La actividad de tripsina de *C. parvipinnis* y *C. xanthulus* fue significativamente mayor a 65°C, que concuerda con el valor reportado por Concha-Frías *et al.* (2016) para la tripsina de *C. undecimalis*, por Guerrero-Zárata *et al.* (2014) para el pejelagarto *Atractosteus tropicus*, el salmón de río *Brycon orbignyanus* y *T. thynnus* (Essed *et al.*, 2002; García-Carreño *et al.*, 2002).

Existen reportes de temperaturas óptimas de actividad a temperaturas más bajas que los valores observados en este trabajo, como la de la tripsina de *S. sagax caerulea*, cuya actividad fue óptima a 50°C (Castillo-Yañez *et al.*, 2005), y para el bacalao del Pacífico *Gadus macrocephalus* (Fuchise *et al.*, 2009). También se han reportado temperaturas óptimas de actividad para la tripsina en un rango de 30-40°C, como los casos de la tripsina del pez ballesta *Balistes capriscus* (Jellouli *et al.*, 2009), del pez gato aleta de vela *Pterygoplichthys disjunctivus* (Villalba-Villalba *et al.*, 2013) y del mrigal *Cirrhinus mrigala* (Khangembam y Chakrabarti, 2015). Como en todas las enzimas, la actividad óptima puede estar asociada a la temperatura óptima ambiental de desempeño biológico (Klomklao y Benjakul, 2018).

Por otra parte, se observó una disminución drástica de actividad de la tripsina en las tres especies de interés al alcanzar los 70°C. Un comportamiento similar se ha observado en otras investigaciones, la actividad de tripsinas de vísceras de *C. macrocephalus* × *C. gariepinus* y del hígado de *T. alalunga* mostraron una fuerte disminución en su actividad a partir de los 70°C (Klomklao *et al.*, 2011 y 2018). Concha-Frías *et al.* (2016) también reportaron una caída drástica de actividad a 75°C. Este comportamiento puede ser atribuido a la desnaturalización térmica de

la enzima, que genera el despliegue de las moléculas y la pérdida de la estructura secundaria y terciaria y, por tanto, ya no son funcionales. De acuerdo con lo mencionado por Klomklao *et al.* (2005), la mayoría de las proteasas alcalinas de organismos acuáticos son estables y activas en condiciones adversas, como temperaturas entre 50 y 60°C, por lo tanto, esta característica hace de las tripsinas de *C. othonopterus*, *C. parvipinnis* y *C. xanthulus* candidatas muy interesantes para algunas aplicaciones industriales, tales como la elaboración de detergentes y la industria de alimentos.

La mayor actividad de tripsina de *C. othonopterus* se observó a un pH de 8.0, sin ser esta significativamente diferente de la actividad observada a pH de 9.0, por lo tanto, ambos se consideran como pH óptimos de actividad de tripsina. En *C. parvipinnis*, la mayor actividad se registró a pH de 8.0, y no fue significativamente diferente de la actividad observada a pH de 7.0, por lo que el rango de 7.0 a 8.0 se considera óptimo. En *C. xanthulus*, la actividad proteolítica fue óptima a pH de 8.0. Los valores de pH óptimo de actividad del presente estudio concuerdan con los valores óptimos reportados por Castillo-Yañez *et al.* (2005) en un rango de 7-9; el mismo autor reportó para la tripsina de *S. sagax caerulea* un pH óptimo de 8.0. Klomklao *et al.* (2011) para la tripsina de *C. macrocephalus* × *C. gariepinus* y Kurtovic *et al.* (2006) para la tripsina de *O. tshawytscha*, también reportaron pH óptimos de 8.0. Por otra parte, Klomklao *et al.* (2018) reportaron un pH óptimo de las tripsinas de *T. alalunga* de 8.5, mientras que Silva *et al.* (2011) reportaron una mayor actividad enzimática de tripsina de *D. rhombeus* en el rango de pH de 7.5 a 11.0, con una actividad máxima de 8.5. Finalmente, Bougatef *et al.* (2007) reportaron para la tripsina de *S. pilchardus* pH óptimos de actividad alrededor de 8.0 a 9.0. De manera que los valores de pH óptimos mencionados en la literatura para otras especies de peces marinos y de agua dulce concuerdan estrechamente con los valores observados en este estudio para los tres sciánidos.

La actividad de la tripsina de las tres especies disminuyó a pH más altos y más bajos que los óptimos, y esto posiblemente se deba a cambios conformacionales, afectando la carga eléctrica de las cadenas laterales de los aminoácidos, esta alteración elimina las interacciones electrostáticas que estabilizan la estructura terciaria (Murray *et al.*, 1990) o provoca la desnaturalización de la enzima en condiciones antagónicas de acidez o alcalinidad de las soluciones acuosas que resultan en una menor actividad (Klomklao *et al.*, 2010). En general, las

tripsinas de los organismos acuáticos son activas en un rango de pH de 7.0 a 10.0 y pueden hidrolizar diversos sustratos (De Vecchi y Coppes, 1996; Castillo-Yañez *et al.*, 2005), esta es una característica que sugiere la posibilidad del uso de la tripsina de éstas tres especies de sciánidos como aditivos en formulaciones de detergentes, dado que en las formulaciones de detergentes se utilizan enzimas que son activas en estos rangos de pH alcalino (Freitas-Júnior *et al.*, 2012).

VIII. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales del presente estudio se puede concluir que:

- Las lipasas presentes en el tracto gastrointestinal de *C. othonopterus*, *C. parvipinnis* y *C. xanthulus* presentaron mayor actividad lipolítica principalmente en intestino anterior y ciegos pilóricos, y disminuyó gradualmente hacia las partes distales del intestino.
- En *C. Parvipinnis* se encontraron dos bandas en el estudio electroforético, lo que podría interpretarse como dos posibles lipasas.
- Las tripsinas en las tres especies de sciánidos se encontraron en las cuatro secciones del tracto gastrointestinal, sin embargo, su mayor actividad proteolítica y concentración se encontró en el intestino anterior y ciegos pilóricos, esto puede ser porque las enzimas pancreáticas se vierten al intestino en la región anterior.
- Los pesos moleculares y actividad catalítica óptima de las lipasas y tripsinas de las tres especies de sciánidos son semejantes a otras especies de peces marinos y de agua dulce.
- Las temperaturas óptimas de actividad de las tripsinas de *C. othonopterus*, *C. parvipinnis* y *C. xanthulus* se encontraron en un rango interesante para enzimas con aplicaciones industriales como en la industria de detergentes y de alimentos.
- Los pH óptimos de actividad de las tripsinas de *C. othonopterus*, *C. parvipinnis* y *C. xanthulus* corresponden a valores alcalinos, esto sugiere la posibilidad de su uso como aditivo en detergentes.
- Los resultados obtenidos en el presente estudio representan un avance en el conocimiento de la fisiología digestiva de estas especies.

IX. LITERATURA CITADA

- Alarcón, F. J., M. Díaz, F. J. Moyano y E. Abellán. 1998. Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiology and Biochemistry* 19: 257-267
- Anobom, C. D., A. S. Pinheiro, R. A. De Andrade, E. C. Agueiras, G. C. Andrade, M. V. Moura, R. V. Almeida y D. M. Freire. 2014. From Structure to Catalysis: Recent Developments in the Biotechnological Applications of Lipases. *BioMed Research International*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/684506>
- Banika R. M. y M. Prakash. 2004. Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. *Microbiological Research* 159: 135–140.
- Boivin, M., S. J. Lanspa, A. R. Zinsmeister, V. L. Go y E. P. DiMagno. 1990. Are diets associated with different rates of human interdigestive and postprandial pancreatic enzyme secretion? *Gastroenterology* 99: 1763–1771.
- Bordes, F., L. Tarquis, J. M. Nicaud y A. Marty. 2011. Isolation of a thermostable variant of Lip2 lipase from *Yarrowia lipolytica* by directed evolution and deeper insight into the denaturation mechanisms involved. *Journal of Biotechnology* 156:117–124.
- Borlongan I. G. 1990. Studies on the digestive lipases of milkfish, *Chanos chanos*. *Aquaculture* 89: 315–325.
- Botham, K. M. y P. A. Mayes. 2010. lípidos de importancia fisiológica. 140-150 p. En: J. de León Fraga, Ma. Bernal Pérez y J. L. González Huerta (Eds.), Harper. *Bioquímica Ilustrada*. McGraw-Hill. D. F., México.
- Bougatef, A., N. Souissi, N. Fakhfakh, Y. Ellouz-Triki y M. Nasri. 2007. Purification and characterization of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry* 102: 343–350.
- Bougatef, A., M. Hajji, R. Balti, I. Lassoued, Y. Triki Ellouz y M. 2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry* 14: 1198-1205. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.10.075.

- Buchet, V., J. L. Zambonino Infante y C. L. Cahu. 2000. Effect of lipid level in a compound diet on the development of red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. *Aquaculture* 184: 339-347.
- Campoy, J. D. 1999. Análisis de la situación pesquera en la reserva de la biósfera Alto Golfo de California y Delta del río Colorado, INE/SEMARNAT, 5 pp.
- Cancre, I., R. Ravallec, A. Van Wormhoudt, E. Stenverg, A. Gildberg y Y. Le Gal. 1999. Secretagogues and growth factors in fish and crustacean protein hydrolysates. *Marine Biotechnology* 1: 489–494.
- Candiotta, B. F., A. C. V. Freitas-Júnior, R. C. A. Neric, R. S. Bezerrac, R. V. Rodriguesd, L. A. Sampaio y M. B. Tesser. 2018. Characterization of digestive enzymes from captive Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Brazilian Journal of Biology*. 78: 281-288.
- Cárdenas, S. 2012. Biología y acuicultura de corvinas en el mundo. *Revista AquaTIC* 37:1-13.
- Carta Estatal Pesquera de Baja California. 2015. Secretaría de Pesca y Acuicultura de Baja California. www.sepescabc.gob.mx.
- Castillo, S., S. Halligan y D. M. III. Gatlin. 2015. Growth responses of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus* to dietary phenylalanine and tyrosine can be used to calculate the total aromatic amino acid requirement 1,2. *The Journal of Nutrition* 145: 2341–2346.
- Castillo-Yañez, F. J., R. Pacheco-Aguilar, L. F. Garcia-Carreno y M. A. N. Toro. 2005. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 140: 91–98.
- Concha-Frías, B., C. A. Alvarez-González, M. G. Gaxiola-Cortes, A. E. Silva-Arancibia, P. H. Toledo-Agüero y R. Martinez-García. 2016. Partial characterization of digestive proteases in the common snook *Centropomus undecimalis*. *International Journal of Biology* 8: 1-11. doi: 10.5539/ijb.v8n4p1.
- Corring, T. 1980. The adaptation of digestive enzymes to the diet: it physiological significance. *Reproduction Nutrition Development* 20: 1217–1235.
- Deguara, S., Jauncey, K. y Agius, C. 2003. Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. *Journal of Fish Biology* 62: 1033-1043.
- De Vecchi, S. y Z. Coppes. 1996. Marine fish digestive proteases – relevance to food industry and the south-west Atlantic region- a review. *Journal of Food Biochemistry* 20:193-214.

- Diario Oficial de la Federación. 2015. Acuerdo por el que se suspende temporalmente la pesca comercial mediante el uso de redes de enmalle, cimbras y/o palangres operadas con embarcaciones menores, en el norte del Golfo de California. <http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5388486&fecha=10/04>
- Doode, S. y P. Wong. 2001. El Golfo de California: surgimiento de nuevos actores sociales, ambientalismo y región, México. *Estudios Sociales* 11: 25-56.
- Dos Santos, C. W. V., M. E. Da Costa Marques, H. A. Tenório, E.C. de Miranda y H. J. Vieira-Pereira. 2016. Purification and characterization of trypsin from *Luphiosilurus alexandri* pyloric cecum. *Biochemistry and Biophysics Reports* 8:29–33.
- Einarsson S., P. S. Davies y C. Talbot. 1996. The Effect of Feeding on The Secretion of Pepsin, Trypsin and Chymotrypsin in The Atlantic Salmon, *Salmo Salar L.* *Fish Physiology Biochemistry* 15: 439-446.
- Enzyme Commission. 1993. Enzymatic Assay of Lipase (E.C.3.1.1.3). Reagent Chemicals ACS Specification, 8th ed., 95.
- Erlanger, B., N. Kokowsky y W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95: 271-278.
- Espósito, T. S., P. G. Amaral, D. S. Buarque, G. B. Oliveira, L. B. Carvalho y R. S. Bezerra. 2009. Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. *Food Chemistry* 112:125–130.
- Essed, Z., I. Fernández, F. J. Alarcón y F. J. Moyano. 2002. Caracterización de la actividad proteasa digestiva de atún rojo *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758). *Boletín. Instituto Español de Oceanografía* 18: 99-107.
- Fieker, A., J. Philpott y M. Armand. 2011. Enzyme replacement therapy for pancreatic insufficiency: present and future. *Clinical and Experimental Gastroenterology*. 4: 55–73.
- Fischer, W., F. Krupp, W. Schneider, C. Soomer, K. E. Carpenter y V. H. Niem. 1995. Guía FAO para la Identificación de Especies para los Fines de la Pesca. Pacífico Centro-Oriental. Vol. III. Vertebrados: 1201-1813 p. En: N. L. Chao (Eds.). *Sciaenidae*, pp. 1427-1518. Roma, Italia.
- Flanagan, C. A., y J. R. Hendrickson. 1976. Observations on the commercial fishery and reproductive biology of the totoaba, *Cynoscion macdonaldi* in the northern Gulf of California. *Fishery Bulletin* 74: 531-544.

- Fogarty, W. M., P. J. Griffin y A. M. Joyce. 1974. Enzymes of *Bacillus* species-Part 2. *Process Biochemistry* 9:27-35.
- Freitas-Júnior, A. C. V., H. M.S. Costa, M. Y. Icimoto, I. Y. Hirata, M. Marcondes, L. B. Carvalho Jr., V. Oliveira y R. S. Bezerra. 2012. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera as a source of thermostable trypsin. *Food Chemistry* 133: 1596-1602.
- Fuchise, T., H. Kishimura, H. Sekisaki, Y. Nonami, G. Kanno, S. Klomklao, S. Benjakul y B. Chun. 2009. Purification and characteristics of cold-zone fish trypsin. *Food Chemistry* 116: 611-616.
- García-Carreño, F. L., L. E. Dimes y N. F. Haard. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry* 214: 65-69.
- García-Carreño, F. L., C. Albuquerque-Cavalcanti, M. A. Navarrete del Toro y E. Zaniboni-Filho. 2002. Digestive proteinases of *Brycon orbignyanus* (Characidae, Teleostei): Characteristics and effects of protein quality. *Comparative Biochemistry and Physiology* 132: 343-352. doi.org/10.1016/S1096-4959.
- García-Meilán, I., J. M. Valentín, R. Fontanillas y M. A. Gallardo. 2013. Different protein to energy ratio diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*): effects on digestive and absorptive processes. *Aquaculture* 412: 1-7.
- Gjellesvik, D.R., D. Lombardo y B.T. Walther. 1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): purification and properties. *Biochimica et Biophysica Acta* 1124: 123-134.
- Gildberg, A. 1992. Recovery of proteinase and protein hydrolysate from fish viscera. *Bioresource Technology* 39: 271-276.
- González-Félix, M.L., C. Minjarez-Osorio, M. Perez-Velazquez y P. Urquidez-Bejarano. 2015a. Influence of dietary lipid on growth performance and body composition of the Gulf corvina, *Cynoscion othonopterus*. *Aquaculture* 448: 401-409.
- González-Félix, M.L., M. Perez-Velazquez, C. Maldonado-Othón, M.T. Viana y J.P. Lazo. 2015b. Effect of dietary protein and lipid level on biological performance and body composition of the Gulf corvina *Cynoscion othonopterus*. *Aquaculture* 421: 21-25.

- González-Félix, M. L., M. Pérez-Velázquez y H. Cañedo-Orihuela. 2017. The effects of environmental salinity on the growth and physiology of totoaba *Totoaba macdonaldi* and shortfin corvina *Cynoscion parvipinnis*. *Journal of Fish Biology* 9: 510-527.
- Biochemical composition and fatty acid profile of gonads from wild and cultured shortfin corvina (*Cynoscion parvipinnis*) during the early maturation stage. *Archives of Biological Sciences* 69(3): 491-501.
- González-Félix, M.L., E. B. Santana-Bejarano, M. Pérez-Velázquez y A. G. Villalba-Villalba. 2018a. Partial characterization, quantification and activity of pancreatic lipase in the gastrointestinal tract of *Totoaba macdonaldi*. *Archives of Biological Sciences* 70: 489-496.
- González-Félix, M. L., D. M. Gatlin, M. Pérez-Velázquez, K. Webb, A. García-Ortega y M. Hume. 2018b. Red drum *Sciaenops ocellatus* growth and expression of bile salt-dependent lipase in response to increasing dietary lipid supplementation. *Fish Physiology and Biochemistry* 44:1319-1331.
- Görgün, S. y M. A. Akpınar. 2012. Purification and characterization of lipase from the liver of carp, *Cyprinus carpio* L. (1758), living in Lake Tödürge (*Sivas, Türkiye*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science* 12: 207-215.
- Govoni, J.J., G. W. Boehlert y Y. Watanabe. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fishes* 16: 59-77.
- Grbavcic, S., D. Bezbradica, L. L. Zivkovic, N. Avramovic, N. Milosavić, y I. Karadzic. 2011. Production of lipase and protease from an indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strain and their evaluation as detergent additives: compatibility study with detergent ingredients and washing performance. *Bioresource Technology* 102: 11226-11233. doi: 10.1016/j.biortech.2011.09.076
- Guerrero-Zárate, R., C. A. Alvarez-González, M. A. Olvera-Novoa, N. Perales-García, C. A. Frías-Quintana, R. Martínez-García y W. M. Contreras-Sánchez. 2014. Partial characterization of digestive proteases in tropical gar *Atractosteus tropicus* juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry* 40: 1021-1029.
- Guizani, N., R. S. Rolle, M. R. Marshall y C. I. Wei. 1991. Isolation, purification and characterization of a trypsin from the pyloric ceca of mullet (*Mugil cephalus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 98: 517-521.

- Gupta, R., Q. K. Beg y P. Lorenz. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 15-32.
- Hasan, F., A. A. Shah y A. Hameed. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 235-251.
- Hjelmeland, K. y J. Raa. 1982. Characteristics of two trypsin like isozymes isolated from the arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 71: 557-562.
- Heikinheimo, P., A. Goldman, C. Jeffries y D. L. Ollis. 1999. Of barn owls and bankers: a lush variety of alpha/beta hydrolases. *Structure* 15:141-146.
- Horchani, H., I. Aissa, S. Ouertani, Z. Zarai, y. Gargouri, A. Sayari. 2012. Staphylococcal lipases: biotechnological applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 76: 125-132.
- Iijima, N., S. Tanaka y Y. Ota. 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiology and Biochemistry* 18: 59-69.
- Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. 2018. Temperatura superficial marina del Pacífico Mexicano. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/325216/Temperatura_superficial_marina_del_Pac_fico_Mexicano10nov17_02_feb_18.pdf.
- Islam, M. A., N. Absar y A. S. Bhuiyan. 2008. Isolation, purification and characterization of lipase from Grey mullet (*Liza parsia* Hamilton, 1822). *Asian Journal of Biochemistry* 3(4): 243-255.
- Izquierdo, M.S. y R. J. Henderson. 1998. The determination of lipase and phospholipase activities in gut contents of turbot (*Scophthalmus maximus*) by fluorescence-based assays. *Fish Physiology and Biochemistry* 19:153-162.
- Izquierdo, M. S., J. Socorro, L. Arantzamendi y C. M. Hernández-Cruz. 2000. Digestión, absorción y utilización de lípidos en larvas de peces marinos. pp 251-263 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) Avances en Nutrición Acuicola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola.

- Jaeger, K. E., D. B. Dijkstra y M.T. Reetz. 1999. Bacterial biocatalysts: Molecular Biology, ThreeDimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. Annual Review of Microbiology 53:315-351.
- Jellouli, K., A. Bougatef, D. Daassi, R. Balti, A. Barkia y M. Nasri. 2009. New alkalinetrypsin from the intestine of Grey triggerfish (*Balistes capriscus*) with highactivity at low temperature: purification and characterization, Food Chemistry 116: 644-650.
- Jiménez, M. T., E. Pastor, A. Grau, J. I. Alconchel, R. Sánchez y S. Cárdenas. 2005. Revisión del cultivo de esciéndidos en el mundo, con especial atención a la corvina *Argyrosomus regius* (Asso, 1801). Boletín. Instituto Español de Oceanografía 21:169-175.
- Jonas, E., M. Ragyanski, J. Olah y L. Borros. 1983. Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis*, L.), herbivorous (*Hypophthalmichthys molitrix*, VAL) and omnivorous (*Cyprinus carpio*, L.) fishes. Aquaculture 30: 145-154.
- Kameshwar-Sharma, Y.V.R., N. Boora y P. Tyagi. 2014. Isolation, Purification and Characterization of Secondary Structure and Kinetic Study of Lipase from Indian Major Carp, *Catla catla* (Catla). Enzyme Engineering. 3: 121. doi:10.4172/2329-6674.1000121.
- Kennelly, P.J. y V.W. Rodwell, 2010. Proteínas: órdenes de estructura superiores, pp. 35-47. En: J. de León Fraga, Ma. Bernal Pérez y J. L. González Huerta (Eds.), Harper. Bioquímica Ilustrada. McGraw-Hill. D. F., México.
- Khangembam, B.K. y R. Chakrabarti. 2015. Trypsin from the digestive system of carp *Cirrhinus mrigala*: purification, characterization and its potential application. Food Chemistry 175: 386-394.
- Khantaphant, S. y S. Benjakul. 2010. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). Food Chemistry 120: 658-664.
- Klomklao, S. 2008. Digestive proteinases from marine organisms and their applications. Songklanakarin Journal of Science and Technology 30: 37-46.
- Klomklao, S. y S. Benjakul. 2018. Two trypsin isoforms from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) liver: Purification and physicochemical and biochemical. International Journal of Biological Macromolecules 107: 1864-1870.
- Klomklao, S., S. Benjakul, W. Visessanguan, B. K. Simpson y H. Kishimura. 2005. Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueoustwo-phase systems. Process Biochemistry 40: 3061-3067.

- Klomklao, S., S. Benjakul, W. Visessanguan, H. Kishimura, B. K. Simpson y H. Saeki. 2006. Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology* 144: 47-56.
- Klomklao, S., S. Benjakul, W. Visessanguan, H. Kishimura y B. K. Simpson, B. K. 2007. Purification and characterization of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chemistry* 100: 1580-1589.
- Klomklao, S., H. Kishimura, Y. Nonami y S. Benjakul. 2009. Biochemical properties of two isoforms of trypsin purified from the intestine of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chemistry* 115: 155-162.
- Klomklao, S., S. Benjakul y H. Kishimura. 2010. Proteinases in hybrid catfish viscera: Characterization and effect of extraction media. *Journal of Food Biochemistry* 34: 711-729.
- Klomklao, S., S. Benjakul, H. Kishimura y M. Chaijan. 2011. 24 kDa Trypsin: a predominant protease purified from the viscera of hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus*), *Food Chemistry* 129: 739-746.
- Kumar, C. G. y H. Takagi. 1999 Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances* 17: 561-594.
- Kurtovic, I., S. N. Marshall y B. K. Simpson. Isolation and characterization of a trypsin fraction from the pyloric ceca of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). 2006. *Comparative Biochemistry and Physiology* 143: 432-440.
- Kurtovic, I., S. N. Marshall y X. Zhao. 2010. Purification and properties of digestive lipases from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and zeland hoki (*Macruronus novaezelandiae*). *Fish Physiology and Biochemistry* 36: 1041-1060.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lagardère, J. P. y A. Mariani. 2006. Spawning sounds in meagre *Argyrosomus regius* recorded in the Gironde estuary, France. *Journal of Fish Biology* 69: 1697-1708.
- Langeland, M., Lindberg, J. E., Lundh T. 2013. Digestive Enzyme Activity in Eurasian Perch (*Perca fluviatilis*) and Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquac Res Development* 5:1.
- Marcuschi, M., T. S. Esposito, M. F. M. Machado, I. Hirata y M. V. Silva. 2010. Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui

- (*Colossoma macropomum*). Biochemical and Biophysical Research Communications 396: 667-673.
- Martinez, A. y J. L. Serra. 1989. Proteolytic activities in the digestive tract of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). Comparative Biochemistry and Physiology B. Biochemistry and Molecular Biology 93: 61-66.
- Matus de la Parra, A., A. Rosas, J. P. Lazo y M. T. Viana. 2007. Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. Fish Physiology and Biochemistry 33: 223-231.
- Mendivil-Mendoza, J. E., E. A. Aragón-Noriega, J. A. Arreola-Lizárraga, G. Rodríguez-Domínguez, S. G. Castillo-Vargasmachuca y G. G. Ortega-Lizárraga. 2018. Indicadores de sustentabilidad para la pesquería de curvina golfina *Cynoscion othonopterus* en el Alto Golfo de California. Revista de Biología Marina y Oceanografía 531: 119-130.
- Morais, S., C. Cahu, J. L. Zambonino-Infante, J. Robin, I. Rønnestad, M. T. Dinis y L. E. C. Conceição. 2004. Dietary triacylglycerol source and level affects performance and lipase expression in larval seabass (*Dicentrarchus labrax*). Lipids 39: 449-458.
- Moyano López, F. J. 2006. Bioquímica Digestiva en Especies Acuicultivadas: Aplicaciones en Nutrición. 396-409 p. En: L. E. Cruz Suárez, D. Ricque Marie, M. Tapia Salazar, M. G. Nieto López, D. A. Villareal Cavazos, A. C. Puello Cruz y A. García Ortega (Eds). Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15 al 17 de noviembre de 2006. Universidad de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Murray, R. K., P. A. Mayes D. K. Granner y V. W. Rodwell. 1990. Enzyme kinetics. In: Harpers Biochemistry (Rodwell, V. W. Eds), pp. 68-81.
- Nadeem, M., J. I. Qazi, Q. Syed y S. Baig. 2007. Studies on commercially important alkaline protease from *Bacillus licheniformis* N-2 isolated from decaying organic soil. Turkish Journal of Biochemistry 32:171-177.
- Nardini, M. L. y Dijkstra, B. W. 1999. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. Current Opinion in Structural Biology 9:732-737.
- Nasri, R., A. Sila, N. Ktari, I. Lassoued, A. Bougatef, M. Karra-Chaabouni y M. Nasri. 2012. Calcium dependent, alkaline detergent-stable trypsin from the viscera of Goby

- (*Zosterisessor ophiocephalus*): purification and characterization. *Process Biochemistry* 47: 1957-1964.
- NRC (National Research Council). 1993. Nutrient requirements of warm water fishes and shellfishes. National Academy Press. Washington, D.C. 102 p.
- Osorio, N. M., S. Ferreira-Dias, J. H. Gusmao y M. M. R. da Fonseca. 2001. Response surface modeling of the production of omega-3 polyunsaturated fatty acids-enriched fats by a commercial immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11: 677-686.
- Paliwal, N., S. P. Singh y S. K. Garg. 1994. Cation-induced thermal stability of an Alkaline protease from a *Bacillus* sp. *Bioresource Technology* 50: 209-11.
- Perez-Velazquez, M., P. Urquidez-Bejarano, M. L. González-Félix y C. Minjarez-Osorio, 2014. Evidence of euryhalinity of the Gulf corvina (*Cynoscion othonopterus*). *Physiological Research* 63: 659-666.
- Raman P. Y., K. S. Rajendra, R. Gupta y W. S. Davidson. 1998. Rapid Zymogram for Lipase. *BioTechniques* 24: 754-756.
- Rao, V. D., S. Misra, I. V. Boronenkov, R. A. Anderson y J. H. Hurley. 1998. Structure of type IIbeta phosphatidylinositol phosphate kinase: a protein kinase fold flattened for interfacial phosphorylation. *Cell* 94: 829-39.
- Rodríguez, Q. G. y S. A. Bracamonte. 2008. Pertinencia de las ANP como política de conservación y mejoramiento de la calidad de vida. Análisis de percepción en la Reserva de la Biósfera Alto Golfo de California y Delta del Río Colorado. *Estudios sociales* 32: 143-176.
- Román-Rodríguez, M. J. y M. G. Hammann. 1997. Age and growth of totoaba, *Totoaba macdonaldi* (Sciaenidae), in the upper Gulf of California. *Fishery Bulletin* 95: 620-628.
- Rueda-López, S., E. Martínez-Montaña y M.T. Viana. 2017. Biochemical Characterization and Comparison of Pancreatic Lipases from the Pacific Bluefin Tuna, *Thunnus orientalis*; Totoaba, *Totoaba macdonaldi*; and Striped Bass, *Morone saxatilis*. *Journal of the World Aquaculture Society* 48: 156-165.
- Ruelas-Peña, J. H., C. Valdez-Muñoz y E. A. Aragón-Noriega. 2013. La pesquería de la curvina golfina y las acciones de manejo en el Alto Golfo de California, México. *Latin American Journal of Aquatic Research* 4: 498-505.

- Rust M. B. 2002. Nutritional physiology. 367-452 p. En: Halver J. E. y R. Hardy R (Eds). Fish nutrition. Academic. New York, pp. 367-452.
- Sebban-Kreuzer, C., L. Ayvazian, C. Juhel, J. P. Salles, C. Chapus, y B. Kerfelec. 2003. Inhibitory effect of the pancreatic lipase C-terminal domain on intestinal lipolysis in rats fed a high-fat diet: chronic study. *International Journal of Obesity* 27: 319-325.
- Silva, J. F., T. S. Espósito, M. Marcuschi, K. Ribeiro, R. O. Cavalli, V. Oliveira y R. S. Bezerra. 2011. Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). *Food Chemistry* 129: 777-782.
- Simpson, B. K. 2000. Digestive proteinases from marine animals. In N. F. Haard & B.K. Simpson (Eds.), *Seafood enzymes: Utilization and influence on postharvest seafood quality* (pp. 531–540). New York: Mercel Dekker.
- Simpson, B. K. y N. F. Haard. 1987. Trypsin and trypsin like enzymes from the stomach less cunner (*Tautoglabrus adspersus*) Catalytic and other physical characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35: 652-656.
- Tocher, D. R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science* 11: 107-184.
- Torrissen, K. R. 1984. Characterization of Proteases in the Digestive Tract of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) In Comparison With Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 77: 669-674.
- Villalba-Villalba, A. G., J. C. Ramírez-Suárez, E. M. Valenzuela-Soto, G. G. Sánchez, G. C. Ruiz y R. Pacheco-Aguilar. 2013. Trypsin from viscera of vermiculated sailfin catfish, *Pterygoplichthys disjunctivus*, Weber, 1991: its purification and characterization. *Food Chemistry* 141: 940-945.
- Zambonino-Infante, J.L. y C. L. Cahu. 1999. High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *Journal of Nutrition*. 129:1195–1200.
- Zambonino-Infante, J.L. y C. L. Cahu. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology* 130: 477-487.
- Zaragoza-Carmona, J. A. J. 2011. Aislamiento de cepas de *Bacillus* productoras de proteasas con potencial uso industrial. Tesis de Maestría. Universidad Autonoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Químicas. San Nicolás de los Garza Nuevo León.