



UNIVERSIDAD DEL MAR

CAMPUS PUERTO ESCONDIDO

CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS DIGESTIVAS Y DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* EN ADULTOS DE LA PIGUA *Macrobrachium carcinus*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA
TERESA DE JESÚS MANRÍQUEZ SANTOS

DIRECTOR DE TESIS

DR. CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ GONZÁLEZ

PUERTO ESCONDIDO, OAX., ENERO 2009

Puerto Escondido, Oax., Enero 2009.



UNIVERSIDAD DEL MAR

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

Después de realizar una revisión detallada de la tesis “CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS DIGESTIVAS Y DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* EN ADULTOS DE LA FIGUA *Macrobrachium carcinus*”, presentada por la pasante de la LICENCIATURA EN BIOLOGÍA TERESA DE JESÚS MANRÍQUEZ SANTOS, se considera que cumple con los requisitos y la calidad necesarios para ser defendida en el examen profesional.

COMISIÓN REVISADORA

Dr. Carlos Alfonso Álvarez González

Director

M. en C. Beatriz A. Rodas Junco

Revisor

Dr. José Luís Arcos García

Revisor

M. en C. Pablo Torres Hernández

Revisor

Ocean. Pablo A. Pintos Terán

Revisor

DEDICATORIA

A mis queridos padres: Nicolás Manríquez Campa y Rosario Santos Enríquez, ellos son mi razón de vida.

A mis hermanos: Ana Karina, Luis Alberto, y Jessica Isabel, quienes han compartido los mejores momentos de mi vida.

A mis abuelos: Celestino y Casimira, que desde el cielo nos bendicen, a Lorenzo y Evarista que aunque estén lejos se que comparten con migo estos momentos.

A mis adorados sobrinos: Diego Noel, Marco Emiliano y Luis Fernando.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por que mi Fé en él ha permitido que cosas como estas sucedan, por darme la dicha de compartir estos momentos con mis seres queridos.

El agradecimiento profundo y con el corazón a mis queridos padres, Nicolás y Rosario, porque han forjado en mi el mayor de los valores, el amor. Gracias por sus consejos y sus bendiciones, espero que esta sea una satisfacción más en sus vidas, ¡los amo!

A mi hermano mayor Luis Alberto, por ser uno de mis mejores ejemplos de superación, a mis hermanas, Kary y Jessy, por que siempre me han apoyado en todo momento, por que además de la sangre nos une el amor incondicional.

Un agradecimiento especial a la familia Castellanos Santos, por todo el apoyo brindado durante mi estancia en la ciudad de Villahermosa !que Dios los bendiga siempre!

Al Dr. Carlos Alfonso Álvarez González, Líder del CA Biología y Manejo de Organismos Acuáticos de la UJAT DAC-BIOL, quien fungió como mi director de tesis, gracias a él se pudo realizar satisfactoriamente este trabajo, y por que además siempre vió en mi no solo a una estudiante mas, si no a una amiga, de corazón muchas gracias por todo su apoyo, sus consejos y recomendaciones permitieron que durante la elaboración de este trabajo pudiera ser una mejor persona a nivel profesional.

A mis codirectores, el Dr. José Luis Arcos García y a la M. C. Beatriz Rodas Junco, por el apoyo para la conclusión de este trabajo.

A la M. C. Nathalia Perales García, quien me apoyó en los trabajos de laboratorio y que además me brindó su amistad.

A todos los compañeros del laboratorio de acuicultura: Arkady, Nora, Tilo, Karina, Carlos Alfonso, Melquíades, Luis, Gabriel, Juan, Rosa, Sergio, Víctor, Pablo, William, Caleb, Roger, quienes hicieron que mi estancia en la ciudad de Villahermosa fuera amena y placentera.

A mis compañeros y amigos: Edgar, Magdiel, Beatriz, Rosaura, David y en especial a Omar por que su apoyo fue crucial para lograr la culminación de este trabajo.

	INDICE	Página
Índice de figuras		iii
Índice de tablas		iv
RESUMEN		v
ABSTRACT		vi
I INTRODUCCION		1
1.1 Biología de <i>Macrobrachium carcinus</i>		2
1.2 Ciclo de vida de <i>Macrobrachium carcinus</i>		3
1.3 Tamaño		3
1.4 Alimentación		3
1.5 Fisiología digestiva		4
1.6 Enzimas digestivas		6
1.6.1 Proteasas		6
1.6.2 Amilasas		7
1.6.3 Lipasas		7
1.6.4 Fosfatasas acidas y alcalinas		7
1.7 Estudios de caracterización enzimática		8
1.7.1 Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de las enzimas		8
1.7.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de las enzimas		8
1.7.3 Caracterización mediante inhibidores específicos		9
1.8 Utilización de técnicas electroforéticas		9
1.9 Estudios de digestibilidad <i>in Vitro</i>		10
II ANTECEDENTES		12
III JUSTIFICACION		15
IV OBJETIVOS		16
4.1 Objetivo general		16
4.2 Objetivos particulares		16
V HIPOTESIS		16
VI MATERIALES Y METODO		17
6.1 Localización geográfica		17
6.2 Selección de adulto y extracción de proteínas		17
6.3 Determinación de la proteína soluble		17
6.4 Caracterización de actividades específicas		19
6.4.1 Actividad de proteasas		19
6.4.1.1 Proteasas alcalinas		19
6.4.1.2 Tripsina		19
6.4.1.3 Quimotripsina		20
6.4.1.4 Leucina aminopeptidasa		20
6.4.1.5 Carboxipeptidasa		20
6.4.2 Actividad de lipasas		21
6.4.3 Actividad de amilasas		21

6.4.4	Actividad de fosfatasas alcalinas	21
6.4.5	Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de proteasas alcalinas	22
6.4.6	Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de proteasas alcalinas	22
6.4.7	Estudios de inhibición enzimática	23
6.4.8	Estudios de inhibición por técnicas electroforéticas para proteasas alcalinas	23
6.5	Selección de ingredientes para técnicas de digestibilidad <i>in vitro</i>	24
6.6	Determinación del grado de hidrólisis	24
6.7	Análisis de aminoácidos totales liberados durante la hidrólisis enzimática	26
6.8	Análisis de las muestras resultantes de la hidrólisis enzimática mediante técnicas electroforéticas	26
6.9	Análisis estadístico	27
VII	RESULTADOS	28
7.1	Determinación de la proteína soluble	28
7.2	Caracterización de actividades específicas	28
7.2.1	Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de proteasas alcalinas	28
7.2.2	Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de las proteasas alcalinas	29
7.2.3	Efecto de inhibidores <i>in vitro</i> sobre la actividad de proteasas alcalinas	29
7.2.4	Estudio de inhibición mediante técnicas electroforéticas para proteasas alcalinas	30
7.3	Digestibilidad <i>in Vitro</i>	30
7.3.1	Determinación del grado de hidrólisis	30
7.3.2	Determinación del grado de hidrólisis total	30
7.3.3	Análisis de aminoácidos totales liberados durante la hidrólisis enzimática	31
7.3.4	Análisis mediante técnicas electroforéticas	31
VIII	DISCUSION	32
8.1	Caracterización enzimática	32
8.1.1	pH óptimo y estabilidad de proteasas alcalinas	32
8.1.2	Temperatura óptima y estabilidad de proteasas alcalinas	33
8.1.3	Caracterización mediante inhibidores y usos de SDS-PAGE	33
8.2	Digestibilidad <i>in Vitro</i>	34
IX	CONCLUSIONES	36
X	RECOMENDACIONES	37
XI	BIBLIOGRAFIA	38

	Índice de Figuras	Página
Figura 1.	Macho adulto de <i>Macrobrachium carcinus</i> capturado en el río Usumacinta Tenosique Tabasco México (con longitud total de 550 mm y peso de 950 g).	51
Figura 2.	Anatomía general del tubo digestivo de crustáceos (Ceccaldi, 1986).	52
Figura 3.	Efecto del pH sobre la actividad de proteasas alcalinas de los extractos de adultos <i>M. carcinus</i> .	53
Figura 4.	Estabilidad de proteasas alcalinas a diferente pH y con tres tiempos de preincubación de los extractos enzimáticos en adultos de <i>M. carcinus</i> .	54
Figura 5.	Estabilidad de proteasas alcalinas a pH de 6, 7, 8, 9,10 y 11 y con tres tiempos de preincubación de los extractos enzimáticos en adultos de <i>M. carcinus</i> .	55
Figura 6.	Efecto de la temperatura sobre la actividad de proteasas alcalinas de los extractos de adultos de <i>M. carcinus</i> .	56
Figura 7.	Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de proteasas alcalinas de los extractos de adultos de <i>M. carcinus</i> .	57
Figura 8.	Estudio de inhibición de proteasas alcalinas presentes en los extractos multienzimáticos de adultos de <i>M. carcinus</i> hembras y machos.	58
Figura 9.	Estudio electroforético de inhibición de proteasas alcalinas presentes en el extracto multienzimático de adultos de <i>M. carcinus</i> .	59
Figura 10.	Grado de hidrólisis (GH) de diferentes ingredientes de origen proteico utilizando extracto multienzimático de adultos de <i>M. carcinus</i>	60
Figura 11.	Proceso de digestión alcalina de los diferentes ingredientes de origen proteico por acción de los extractos enzimáticos de adultos de <i>M. carcinus</i> .	61

Índice de tablas		Página
Tabla 1.	Clasificación de las proteasas por familia (Tomada de Alarcón, 1997 y modificado de Neurath, 1989).	62
Tabla 2.	Clasificación de inhibidores empleados en la caracterización de proteasas en función del mecanismo de acción y peso molecular (modificado por García-Carreño, 1992).	63
Tabla 3.	Concentración promedio de proteína soluble en machos y hembras adultos de <i>Macrobrachium carcinus</i>	64
Tabla 4.	Actividad de enzimas digestivas (Promedio \pm EE) de adultos de <i>Macrobrachium carcinus</i> .	65
Tabla 5.	Comparación del grado de hidrólisis (GH %) y porcentaje de digestibilidad <i>in vitro</i> de diversos ingredientes de origen proteínico, utilizando los extractos multienzimáticos de los adultos de <i>M. carcinus</i>	66
Tabla 6.	Concentración de aminoácidos liberados a partir de la digestión alcalina <i>in vitro</i> de los ingredientes proteicos utilizando extractos multienzimáticos de adultos de la pigua ($\mu\text{g/ml}$)	67

RESUMEN

El presente trabajo se dividió en dos partes: la primera parte comprende la caracterización de enzimas digestivas presentes en crustáceos adultos de *Macrobrachium carcinus*. La segunda parte consistió en la evaluación *in vitro* de la digestibilidad alcalina usando extractos multienzimáticos de *M. carcinus* mediante el método de pH-Stat de 10 ingredientes de origen animal y vegetal con diferentes porcentajes de proteína cruda, utilizadas en la elaboración de dietas para crustáceos, se utilizó como control la caseína de Hammerstein, se cuantificaron los aminoácidos liberados durante la hidrólisis y el seguimiento de hidrólisis proteica mediante la técnica de SDS-PAGE. Se aplicó análisis de varianza de una vía, pruebas de Kruskal-Wallis y Tukey. La tasa de liberación de aminoácidos se calculó por medio del programa estadístico STATISTICA v 7.0. La representación gráfica de los resultados en las actividades enzimáticas se realizó mediante el programa Sigma Plot versión 10.0. La actividad proteolítica de *M. carcinus* se lleva a cabo de manera óptima a rango de pH de 8 a 10 y una temperatura de 45°C, actividad que es inhibida totalmente por PMSF (inhibidor general de proteasas alcalinas) y en su mayoría por SBT1 (inhibidor tripsico de soya), lo que indica que la actividad proteolítica en los extractos de *M. carcinus* se da debido a la tripsina. Los ingredientes alimenticios utilizados, especialmente los de origen animal marino, mostraron alto grado de hidrólisis ($P=0.05$) utilizando los extractos enzimáticos de adultos, además se mostró buena afinidad para la hidrólisis de ingredientes de origen animal terrestre y ligeramente más bajo los de origen vegetal. La electroforesis y la cuantificación de aminoácidos libres denotaron las mayores concentraciones en el hidrolizado de pescado; sin embargo, el mejor ingrediente fue la levadura para panadería por ser el que presentó el mayor grado de hidrólisis y debido también a que fue uno de los que proporcionó la mayor cantidad de aminoácidos libres totales, solo precedido por el hidrolizado de pescado. La combinación de estudios de caracterización enzimática con las pruebas de digestibilidad *in vitro* pueden contribuir al diseño de dietas adecuadas para la reproducción y cultivo intensivo de *M. carcinus*.

ABSTRACT

The present research work was divided in two parts: The first part, understands the presence and characterization of digestive enzymes in *Macrobrachium carcinus* adults. In the second part, we studied the in vitro digestibility of several protein sources (animal, microorganisms, and vegetable meals) using the pH-Stat system from hepatopancreas digestive multienzymatic extracts. We evaluated 10 different meals used in the manufacture of aquafeeds with different percentage of crude protein content in alkaline face using casein as a control ingredient. The hydrolysis degree was tested during 45 min (2700 seg), taking samples for the evaluation of total amino acid concentration and SDS-PAGE technique from each hydrolysis at 0, 100, 250, 500, 1000, 1500, 1750, 2000, 2500, and 2700 seg. All hydrolysis degree and amino acid concentration from the ingredients were compared with a non-parametric multiple Kruskal-Wallis test and differences between ingredients were detected with Nemenyi test using a significance of 0.05 with the software Statistica v 7.0. Graphic representation was done with the software Sigma Plot V. 10. Our results showed that the alkaline proteolytic activity from males and females are similar between them and the optimum pH is around 8 and 10, and is very stable to changes in pH (6, 8, and 10) for 90 min of pre-incubation. The optimum temperature for alkaline proteases is 45°C and is stable with pre-incubation in 25, 35, and 45°C. The activity was inhibited totally when PMSF was used; additionally, the inhibition with SBT1 (Soybean trypsin inhibitor), which remarks that the mainly alkaline protease in *M. carcinus* hepatopancreas is trypsin. On the other hand, the hydrolysis of the protein sources showed that fish meal and bakery yeast had the statistically highest values ($P < 0.05$) compared with other animal ingredients and vegetable meals. Total amino acid concentration was statistically highest ($P < 0.05$) for fish hydrolyzed compared with the rest of ingredients. We conclude that *M. carcinus* is an omnivorous crustacean with high capacity to digest several animal and some vegetable ingredients. Moreover, the characterization of proteases and in vitro digestibility are an important tool for selection of ingredients that can be used for the manufacture of an artificial diet for this species under culture.