

Caracterización bioquímica de lipasas presentes en vísceras del mero rojo (*Epinephelus morio*)

J.C. Arceo-Cabrera*, S.M. Gallegos-Tintoré y M.N. Sánchez-González
Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Ingeniería Química, Periférico Norte Km 33.5, Chuburná de Hidalgo Inn, C.P. 97203, Mérida, Yucatán, México

*Jeaarc1@hotmail.com

RESUMEN

Las actividades lipolíticas, perfil electroforético y estabilidad de la actividad lipolítica fueron estudiadas en los tejidos de páncreas y ciego pilórico de la especie *Epinephelus morio* con el fin de aprovechar los residuos de la industria pesquera. La lipasa se encuentra en un peso molecular estimado de 24.05 kDa para el ciego pilórico y 23.56 kDa para el páncreas y el pH óptimo de actividad fue 8. Considerando estas características los extractos enzimáticos de las vísceras con actividad lipolítica pueden ser candidatos para ciertas industrias como la de detergentes.

Palabras clave: Enzimas, lipasas, vísceras, caracterización, ciego pilórico.

ABSTRACT

The lipolytic activities, electrophoretic profile and stability of lipolytic activity were studied in the pancreas and pyloric caecum tissues of the species *Epinephelus morio* in order to take advantage of the waste from the fishing industry. Lipase was found to have an estimated molecular weight of 24.05 kDa for the pyloric caecum and 23.56 kDa for the pancreas and the optimum pH of activity was 8. Considering these characteristics, enzymatic extracts of viscera with lipolytic activity may be candidates for certain industries such as detergents.

Keywords: Enzymes, lipase, viscera, characterization, pyloric caeca.

INTRODUCCIÓN

Una de las especies de perciformes que es representativa para Yucatán es *Epinephelus morio* ya que se estima que el 80% de la mano de obra en el sector pesquero, tanto de flotas artesanales como de flotas industriales destinan a su captura de *E. morio*, esto ha ocasionado que a través de los años se aporten fluctuaciones del 50 al 60% del volumen total de captura a nivel nacional en México. Considerando el procesamiento de los pescados para la obtención del filete, existe un remanente aproximado del 50% conformado por la cabeza, el esqueleto, aletas y vísceras, esto a su vez representan residuos que tienen impacto ambiental. Dentro de las innovaciones biotecnológicas para el aprovechamiento de estos residuos se pueden obtener extracciones enzimáticas tales como las lipasas sintetizadas en el páncreas y excretadas en el ciego pilórico. Las lipasas se han asociado a severos beneficios en la biotransformación por su selectividad hidrolítica y su capacidad de aplicación en reacciones de síntesis para sustitución de catalizadores contaminantes para el medio ambiente, gracias a esto, se han posicionado el uso de las lipasas en las industrias del 10% del valor global económico de las enzimas. El presente estudio tiene por objetivo analizar las características bioquímicas de las lipasas en las vísceras del mero rojo endémico de Yucatán para aportar mayor información de estas enzimas disponibles en estos residuos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del extracto enzimático

Se llevaron a cabo disecciones para obtener los tejidos de páncreas y ciego pilórico los cuales fueron sometidos a desgrasamiento con el solvente orgánico acetona de acuerdo con la metodología de Kuepethkaew *et al.* (2017); tres volúmenes de acetona a -20°C fueron homogenizados con el tejido durante 30 minutos, posteriormente el tejido fue filtrado en vacío y homogenizado en 2 volúmenes de acetona a -20°C por 30 min. Al término del tiempo fue filtrado y el polvo obtenido se mantuvo a 4°C durante 40 minutos. Posteriormente se homogenizó 5 minutos en buffer de extracción (50 mM Tris-HCl, 5 mM Benzamidina-HCl, pH 8) 1:10 (peso/volumen) y se mantuvo en agitación durante 1 hora y 4°C para luego centrifugarse a 12500 rpm por 25 minutos y 4°C, el sobrenadante se consideró el extracto enzimático y se mantuvo a -20°C para su posterior uso.

Actividad lipolítica

La actividad lipolítica fue determinada espectrofotométricamente acorde a la metodología de Patchimpet *et al.* (2019), como sustrato se utilizó 4-Nitrofenil palmitato (pNFP), previo a las reacciones, 1 ml de 7 mM de pNFP disuelto en isopropanol fueron mezclados con 9 ml de buffer 50 mM Tris-HCl, 0.1% goma arábiga y 0.4% de Triton X-100 e incubado por 5 min a 37°C. La reacción inició al mezclar 0.1 ml del extracto enzimático con 0.9 del buffer de reacción con el sustrato y se midió los cambios de absorbancias durante 5 minutos a 410. Una unidad catalítica se definió como el nitrofenil liberado por unidad de minuto. Para las unidades por miligramo de proteína se llevó a cabo una cuantificación de proteína con el reactivo de Bradford (1976).

Perfil electroforético

Para la determinación de los pesos moleculares estimados se llevó a cabo una electroforesis acorde a la metodología de Laemmli (1970) al 12% del gel separador y 6% del gel concentrador, las muestras fueron calentadas a 90°C durante 5 minutos y se utilizó un marcador de bajo peso molecular (Bio-Rad, Cat: 161-0305). Los geles fueron sometidos a amperaje constante de 30 mA durante 1.5 horas y 4°C. Al término de la electroforesis los geles fueron estabilizados en buffer de extracción durante 15 min para posteriormente teñirse con la solución azul de Coomassie R-250 durante 14 horas para luego desteñirse con lavados de la solución decolorante (10% ácido acético glacial, 40% alcohol metílico).

Para la confirmación de la actividad lipolítica se llevó a cabo una electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes, posterior a la electroforesis el gel fue inmerso en buffer de extracción con 1.5% Triton X-100 durante 25 minutos y 4°C. La mezcla cromogénica consistió en aceite de oliva (20%), agar (1.5%) y Rodamina B (0.02%) en buffer fosfatos (0.2 M, pH 8) y se dejó en incubación a 37°C por 14 horas.

Precipitación con sulfato de amonio

Para la precipitación de las proteínas acorde a su grado de solubilidad se utilizó sulfato de amonio en cuatro fracciones de saturación. El sulfato de amonio fue disuelto en homogenización durante 30 minutos a temperatura ambiente, posterior se dejó reposar a 4°C para luego centrifugarse a 12000 rpm por 30 minutos y 4°C, el pellet fue resuspendido en buffer de extracción y sometido a dialifiltración con unidades Amicon de 10kDa (Millipore) durante 3 lavados con buffer de extracción.

Ultrafiltración

La fracción con mayor actividad lipolítica fue sometida a una ultrafiltración con unidades Amicon de 30kDa (Millipore) durante 25 minutos y 4°C para luego medir la actividad lipolítica.

Estabilidad de pH en la actividad lipolítica

La actividad lipolítica fue medida en un rango de pH de 2-10 de buffer de actividad, para el pH de 2-7 se utilizó buffer fosfatos (0.2M) y para pH de 7 a 10 se utilizó buffer 50mM Tris-HCl.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de la obtención de los extractos enzimáticos se obtuvo que el tejido con mayor actividad lipolítica en la Tabla 1, es el ciego pilórico con 0.18 U/mg de proteína mientras que el páncreas demostró actividad de 0.10 U/mg de proteína, a lo cual el ciego pilórico fue el tejido candidato para los siguientes pasos de purificación. Las actividades lipolíticas obtenidas se encuentran en los rangos reportados en vísceras de otras especies (Kuepethkaew *et al.*, 2017; Patchimpet *et al.*, 2019; Sae-leaw y Benjakul, 2018; Smichi *et al.*, 2013). La actividad no resultó ser muy alta, esto puede estar relacionado a baja afinidad con el sustrato utilizado, ya que es un ácido graso saturado, mientras que en estudios previo se han encontrado que del 80% del estómago de *E. morio* lo conforman crustáceos decápodos indicando la preferencia por insumir estos alimentos, a lo cual, a nivel nutricional los mariscos poseen escasos niveles de grasas saturadas siendo de mayor aporte las grasas insaturadas. A su vez, la reacción de actividad consiste en la transesterificación a etil palmitato resultando que quizá la lipasa no es prometedora en las industrias de biocombustibles.

	Ciego pilórico	Páncreas
Actividad* (U/mg de proteína)	0.18±0.002 ^a	0.10±0.006 ^{b**}

Tabla I. Actividad lipolítica en los tejidos de ciego pilórico y páncreas del mero rojo.

* La actividad fue analizada utilizando p-NPP como sustrato.

**Las diferentes letras indican diferencia significativa (p < 0.05).

Los pesos moleculares estimados obtenidos de actividad lipolítica en el zimograma de la Fig. 1, se encontraron en 24.05 kDa para el ciego pilórico y 23.56 kDa para el páncreas, la proximidad de las bandas podría indicar ser la misma lipasa fundamentando el hecho de que el páncreas es el encargado de sintetizar la enzima para luego depositarla en el ciego pilórico para llevar a cabo la catálisis de los lípidos en la especie.

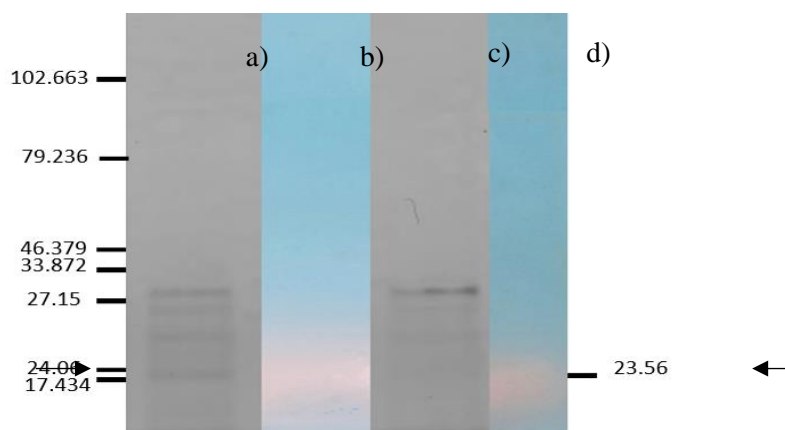


Figura 1. SDS-PAGE al 15% del ciego pilórico (a) y el páncreas (c); Zimografías al 15% utilizando aceite de oliva como sustrato del ciego pilórico (b) y el páncreas (d).

En los pasos de purificación se han obtenido que la mayor actividad lipolítica se encontró en la fracción de saturación de 40-60% mientras que los índices de purificación demuestran un la eficaz purificación de la lipasa.

PASO DE PURIFICACIÓN	PROTEÍNA TOTAL ^a (mg)	ACTIVIDAD TOTAL ^b (U)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg)	RENDIMIENTO	VECES DE PURIFICACIÓN
Extracto crudo	327.3	59.3	0.18±0.002	100%	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ 40-60%	92.1	22.1	0.24±0.008	28.1%	1.3
Ultrafiltración 30K	9	3.1	0.35±0.007	13.4%	1.9

Tabla II. Diagrama de flujo de purificación de lipasa del ciego pilórico del mero rojo.

^a Las proteínas fueron estimadas con el método de Bradford (1976).

^b La actividad fue analizada utilizando p-NPP como sustrato.

Los resultados demostraron que la actividad lipolítica tiene un pH óptimo de 8 (Fig. 2), esto indica la posible ausencia de las enzimas lipasas dentro del estomago debido al pH de los ácidos gástricos, a su vez la tendencia ligeramente alcalina podría ser indicio de su posible uso en industrias tales como la de detergentes donde los pH son alcalinos.

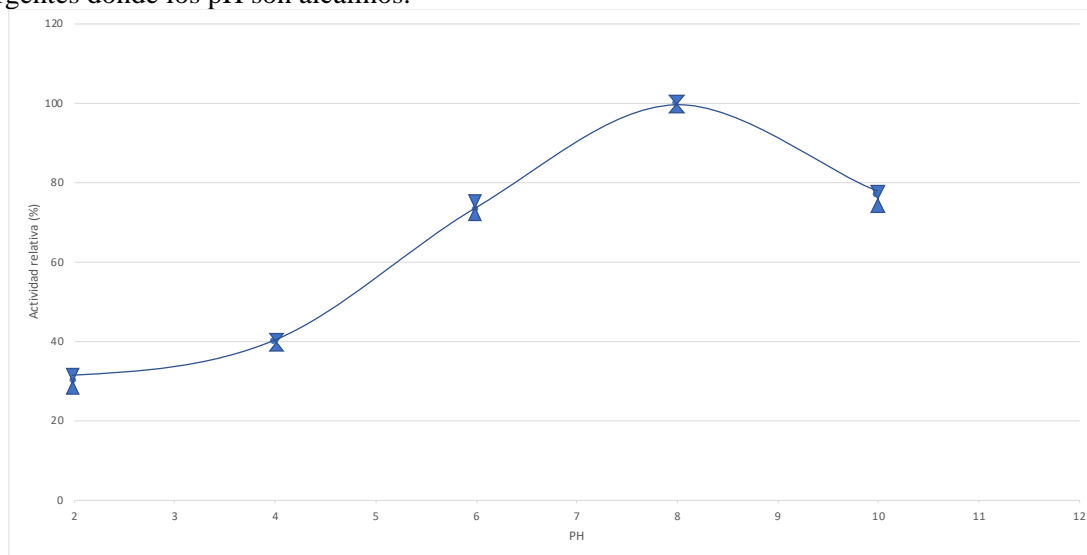


Figura 2. Estabilidad de la actividad lipolítica en distintos rangos de pH.

CONCLUSIÓN

Con base en los análisis de la actividad enzimática y la zimografía se puede concluir que existe presencia de lipasas en el sistema digestivo de *E. morio*. El ciego pilórico y el páncreas presentaron actividad lipolítica; sin embargo, esta fue mayor en el ciego pilórico, el cual es considerado desecho ya que en algunas ocasiones existen otras partes de las vísceras las cuales se tienen a insumir, pero en este caso no tiene hasta el momento algún otro uso ni es consumido por lo tanto es un tejido prometedor para la extracción de estas enzimas. En lo que respecta de la actividad lipolítica sería de interés observar el comportamiento de la lipasas con respecto a otros sustratos para promoverla en otras industrias.

BIBLIOGRAFÍA

- Alfonso Alvarez-González, C., Cuzon, G. Y., & Gaxiola, G. (n.d.). Protein digestibility by *in vitro* and *in vivo* methods in red grouper *Epinephelus morio*. <https://www.researchgate.net/publication/260336458>
- Arvanitoyannis, I. S., & Kassaveti, A. (2008). Fish industry waste: Treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(4), 726–745. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01513>.
- Bradford M.M. (1976) A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-Dye Binding. *Anal Biochem*; 72:248-254
- Castillo, A., Alvarez, A., Cuzon, G., Suárez, J., & Gaxiola, G. (2018). Glycemic response after glucose oral administration of wild juvenile red grouper *Epinephelus morio* fed two different diets. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44(1), 219–226. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0426-4>
- Coleman, F. C., Koenig, C. C., Scanlon, K. M., Heppell, S., Hep-Pell, S., & Miller, M. W. (2010). Benthic Habitat Modification through Excavation by Red Grouper, *Epinephelus morio*, in the Northeastern Gulf of Mexico. In *The Open Fish Science Journal* (Vol. 3).
- Collins, L. A., Fitzhugh, G. R., Lombardi-Carlson, L. A., Lyon, H. M., Walling, W. T., & Oliver, D. W. (2002a). Characterization of red grouper (*Serranidae: Epinephelus morio*) reproduction from the eastern Gulf of Mexico.
- Daboor, S. M., Budge, S. M., Ghaly, A. E., Brooks, M. S., & Dave, D. (2012a). Isolation and activation of collagenase from fish processing waste. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 03(03), 191–203. <https://doi.org/10.4236/abb.2012.33028>
- Echazabal-Salazar, O., Morales-Bojórquez, E., & Arreguín-Sánchez, F. (2021a). Biomass dynamic model for multiple data series: An improved approach for the management of the red grouper (*Epinephelus morio*) fishery of the Campeche Bank, Mexico. *Regional Studies in Marine Science*, 47, 101962. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101962>
- Gajanan, P. G., Elavarasan, K., & Shamasundar, B. A. (2016). Bioactive and functional properties of protein hydrolysates from fish frame processing waste using plant proteases. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(24), 24901–24911. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7618-9>
- Guérard, F., Sellos, D., & le Gal, Y. (2005). Fish and shellfish upgrading, traceability. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Vol. 96, pp. 127–163). <https://doi.org/10.1007/b135783>
- Haard, N. F., & Simpson, B. K. (1994). Proteases from aquatic organisms and their uses in the seafood industry. *Fisheries Processing*, 132–154. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5303-8_6
- Houde, A., Kademi, A., & Leblanc, D. (2004). Lipases and their industrial applications: An overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 118(1–3), 155–170. <https://doi.org/10.1385/ABAB:118:1-3:155>
- Hsieh, C. H., Shiau, C. Y., Su, Y. C., Liu, Y. H., & Huang, Y. R. (2016). Isolation and characterization of collagens from the skin of giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(1), 93–104. <https://doi.org/10.1080/10498850.2013.828145>
- Johnston, M. W., & Bernard, A. M. (2017). A bank divided: quantifying a spatial and temporal connectivity break between the Campeche Bank and the northeastern Gulf of Mexico. *Marine Biology*, 164(1). <https://doi.org/10.1007/s00227-016-3038-0>
- Kuepethkaew, S., Sangkharak, K., Benjakul, S., & Klomkiao, S. (2017). Laundry detergent-stable lipase from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas: Effect of extraction media and biochemical characterization. *International Journal of Food Properties*, 20(4), 769–781. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1180534>

- Kurtovic, I., Marshall, S. N., Zhao, X., & Simpson, B. K. (2009). Lipases from mammals and fishes. *Reviews in Fisheries Science*, 17(1), 18–40. <https://doi.org/10.1080/10641260802031322>
- Nurdiani, R., Dissanayake, M., Street, W. E., Donkor, O. N., Singh, T. K., & Vasiljevic, T. (2015). Sustainable use of marine resources - turning waste into food ingredients. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(11), 2329–2339. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12897>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685
- Patchimpet, J., Sangkharak, K., & Klomklao, S. (2019). Lipolytic activity of viscera extract from three freshwater fish species in Phatthalung, Thailand: Comparative studies and potential use as dishwashing detergent additive. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19(April), 101143. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101143>
- Patton, J. S., Nevenzel, J. C., & Benson, A. A. (1975). Specificity of digestive lipases in hydrolysis of wax esters and triglycerides studied in anchovy and other selected fish. *Lipids*, 10(10), 575–583. <https://doi.org/10.1007/BF02532720>
- Peixoto, S. B., Cladera-Olivera, F., Daroit, D. J., & Brandelli, A. (2011). Cellulase-producing *Bacillus* strains isolated from the intestine of Amazon basin fish. *Aquaculture Research*, 42(6), 887–891. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02727.x>
- Rodriguez, Y. E., Sacristán, H. J., Laitano, M. V., López-Greco, L. S., & Fernández--Gimenez, A. v. (2019). From fish-processing waste to feed additives for crayfish. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50(5), 954–968. <https://doi.org/10.1111/jwas.12585>
- Sae-leaw, T., & Benjakul, S. (2018). Lipase from liver of seabass (*Lates calcarifer*): Characteristics and the use for defatting of fish skin. *Food Chemistry*, 240(February 2017), 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.089>
- Sindhu, R., Shiburaj, S., Sabu, A., Fernandes, P., Singhal, R., Mathew, G. M., Nair, I. C., Jayachandran, K., Vidya, J., de Souza Vandenberghe, L. P., Deniz, I., Madhavan, A., Binod, P., Sukumaran, R. K., Kumar, S. S., Anusree, M., Nagavekar, N., Soumya, M., Jayakumar, A. Pandeyl, A. (2020). Enzyme Technology in Food Processing: Recent Developments and Future Prospects. In *Innovative Food Processing Technologies: A Comprehensive Review* (pp. 191–215). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815781-7.00016-0>
- Smichi, N., Gargouri, Y., Miled, N., & Fendri, A. (2013). A grey mullet enzyme displaying both lipase and phospholipase activities: Purification and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 58, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.056>
- Soldo, B., Šimat, V., Vlahović, J., Skroza, D., Ljubenkov, I., & Generalić Mekinić, I. (2019). High Quality Oil Extracted from Sardine By-Products as an Alternative to Whole Sardines: Production and Refining. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(7). <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800513>