

Perfil de pH en la actividad proteolítica digestiva de *Odontesthes bonariensis* y *Odontesthes argentinensis*

Fredy GUARDIOLA^{a,b,*}, Mariano SORICETTI^b, Santiago MORAWICKI^{a,b}, Catalina GUIDI^{a,b}, Daniel BARRIO^{a,b} y Patricio SOLIMANO^b

^a Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

^b Universidad Nacional de Río Negro. Centro de Investigaciones y Transferencia de Río Negro.

*Correspondencia a los autores, E-mail: fguardiola@unrn.edu.ar

Eje temático: Ecotoxicología, biomarcadores, contaminantes y estresores múltiples.

Resumen

El pejerrey es el principal recurso pesquero en la región pampeana Argentina. *Odontesthes bonariensis* es un pez eurihalino de agua dulce considerado de alto valor nutricional y comercial en Suramérica. *Odontesthes argentinensis* se encuentra comúnmente en aguas costeras desde el sur de Brasil hasta Argentina, es considerada una nueva especie para la acuicultura. Este trabajo busca identificar el pH óptimo para la actividad proteolítica presente en *Odontesthes bonariensis* y *Odontesthes*. Se obtuvo el extracto multienzimático de los peces y se evaluó la actividad proteolítica total y la de tripsina a diferentes pH. Los resultados muestran que para la actividad proteolítica total el rango para *O. argentinensis* es 0,5979 a 0,8516 U/ml y para *O. bonariensis* 0,7954 a 0,9698 U/ml. En cuanto al pH óptimo la actividad proteolítica en esta actividad. *O. argentinensis* tiene un pH óptimo de 9, mientras que *O. bonariensis* de 8,5. La actividad proteolítica de tripsina el rango para *O. argentinensis* es 0,4431 a 0,8734 U/ml y para *O. bonariensis* 0,4912 a 0,7262 U/ml. En cuanto al pH óptimo la actividad proteolítica de la tripsina se observan para *O. argentinensis* un pH óptimo de 9,5 mientras que *O. bonariensis* de 9,0. *O. argentinensis* es más susceptible a los cambios de pH en la dieta que *O. bonariensis*. *O. bonariensis* demuestra platisidad en actividad proteolítica lo que seguramente es conveniente al vivir en ambiente con mayor incidencia de disturbios

Palabras clave: PEJERREY; ACTIVIDAD ENZIMÁTICA; TRIPSINA; ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA.

1 Introducción

El pejerrey es el principal recurso pesquero en la región pampeana Argentina (Baigun et al., 2009; Baigun and Anderson, 1993; Colautti et al., 2010). El pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) es un pez eurihalino (Gómez-Requeni et al., 2013) zooplantívoro de agua dulce (García de Souza et al., 2017). Es una especie considerada de alto valor nutricional y comercial en Suramérica (Rearters, 1995; Somoza et al., 2008). El pejerrey marino *Odontesthes argentinensis* (Valenciennes, 1835) se encuentra comúnmente en aguas costeras desde el sur de Brasil hasta Argentina (Dyer, 1994), mientras que *O. argentinensis* es considerada una nueva especie para la acuicultura (Sampaio, 2006) y es una especie de gran importancia a nivel pesquero y socio-económico-cultural dado que ha generado toda una pesquería recreacional que provoca desplazamiento de personas con el fin de su captura (Guidi et al., 2021). Las proteínas son el principal macrocomponente del alimento de los pejerreyes por lo que la digestibilidad proteica es un indicador de la calidad de la dieta. Este parámetro varía notablemente entre especies dado que las proteasas digestivas son

diferentes. Por esta razón se debe evaluar antes de implementar el cultivo y decidir la composición de la dieta a emplear (Malca et al., 2006). A priori se deberían esperar valores muy distintos en las especies carnívoras, omnívoras o herbívoras (Manríquez, 1994). Las enzimas digestivas poseen un pH característico en el que cual su actividad es máxima. A este pH óptimo el sitio activo de la enzima y el sustrato presentan una adecuada conformación de cargas que permite que la catálisis se dé con máxima eficiencia. Cuando el pH del medio de reacción esta por fuera del intervalo fisiológico su estabilidad conformacional es comprometida pudiendo sufrir desnaturalizaciones que afecta su actividad (Ásgeirsson et al., 1995).

Este trabajo busca identificar el pH óptimo para la actividad proteolítica presente en *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) y *Odontesthes argentinensis* (Valenciennes, 1835).

2 Materiales y Métodos

2.1 Individuos utilizados y extracción de enzimas.

Los especímenes de *O. argentinensis* fueron obtenidos de la costa atlántica rionegrina, en el sector denominado Balneario El Cóndor (41°01'20.3"S 62°47'44.8"W) y los especímenes de *O. bonariensis* fueron suministrados por pescadores deportivos del río Negro (40°43'27.4"S 63°16'00.5"W). Los especímenes de *O. argentinensis* (n=9) presentaron una longitud total media de 347 mm y *O. bonariensis* (n=9) una longitud total media de 297 mm. A los individuos capturados se les extrajeron los tractos digestivos, realizando un corte desde la cloaca hasta...con una tijera de disección. *Ni bien los peces fueron muestreados, se les midió el pH dentro del tracto digestivo por medio de una sonda de pH. Se formaron tres pules de tres individuos cada uno. El extracto multi-enzimático fue obtenido mediante molienda con un homogeneizador de tejidos tipo ultraturax en buffer TRIS-HCl 0,1 M pH 7 durante 20 minutos a 4°C, en una proporción 1:3 (Tejido: Buffer). El extracto multi-enzimático fue centrifugado a 15000 rpm a 4°C por 15 minutos.*

2.2 Cálculo de las actividades.

La actividad del extracto multienzimático se cuantificó utilizando las ecuaciones 1 y 2, donde; **Abs** es la absorbancia a longitud de onda; **V_{final(ml)}** es volumen final de la reacción, **ε** el coeficiente de extinción molar; **m** pendiente de regresión.

$$\mu\text{mol}/\text{ml}_{\text{extrac}} = \frac{\text{Abs} * \text{Po}(\text{cm}) * V_{\text{final}(\text{ml})} * \text{factor de dilución}}{\epsilon \left(\frac{\text{ml}}{\mu\text{mol}} \cdot \text{cm} \right) * V_{\text{extrac}(\text{ml})}} \quad (1)$$

$$U/\text{ml}_{\text{extrac}} = m \left(\frac{\mu\text{mol}/\text{ml}_{\text{extrac}}}{t_{\text{min}}} \right) \quad (2)$$

2.3 pH óptimo actividad proteolítica total

Se realizó una mezcla de caseína al 1 % (5 mL) y buffer Tris-HCl 100 mM a diferentes pHs (5 mL) y 0,5 mL del extracto enzimático. Luego, cada 5 minutos y durante media hora, se

tomaron alícuotas de 1 mL y se le agragaron 0,5 mL de Acido tricloroacético al 32 % p/v. Posteriormente, se midió la absorbancia a 280 nm. La actividad proteolítica se cuantificó según (Vizcaíno et al., 2019). Dado que durante la medición del pH en los diferentes tramos del tracto digestivo solo se obtuvieron valores entre 7,5 y 9,0 se evaluó la actividad proteolítica entre los valores de pH de 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0 y 9,5 a una temperatura de 25 °C. La actividad proteolítica total se calculo usando el coeficiente de extinción molar de la tirocina (ϵ : 1,48 $\mu\text{mol}^{-1} \text{ml cm}^{-1}$).

2.4 pH óptimo actividad Tripsina

Se utilizó la metodología descrita por Erlanger et al. (1961) con algunas modificaciones. En una celda de cuarzo se mezcló a 25°C una alícuota de 50 μl de extracto multienzimático con 500 μl de BAPNA 1 mM disuelto en DMSO y 450 μl de buffer (TRIS·HCl 50 mM con CaCl_2 10 mM a diferentes pHs). Se registró la producción de p-nitroanilina (producto de la hidrólisis de BAPNA) monitoreando el incremento en la absorbancia a 410nm durante 1,5 min, tomando mediciones cada 15 segundos. La actividad de la tripsina se calculo usando el coeficiente de extinción molar de la p-nitroanilina (ϵ : 8,8 $\mu\text{mol}^{-1} \text{ml cm}^{-1}$).

3 Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se muestra la actividad proteolítica total a todos los pHs evaluados para ambas especies. El rango para *O. argentinensis* es de 0,5979 a 0,8516 U/ml y para *O. bonariensis* de 0,7954 a 0,9698 U/ml.

<i>O. argentinensis</i>		<i>O. bonariensis</i>	
pH	Velocidad(U/ml)	Ph	Velocidad(U/ml)
7	0,5979	7	0,8318
7,5	0,6613	7,5	0,7954
8	0,6935	8	0,9015
8,5	0,7581	8,5	0,9698
9	0,8516	9	0,8480
9,5	0,7533	9,5	0,9385

Tabla 1. Perfil de pH de la actividad proteolítica total.

La mayor diferencia obserbada en las magnitudes de la actividad enzimática total para *O. bonariensis* puede deberse a diferencias en el comportamiento alimentario o la disponibilidad de presas al momento de la captura, tales factores pueden afectar la secreción de enzimas digestivas (Uys et al., 1987).

La actividad proteolítica de *O. argentinensis* tiene un pH óptimo de 9,0 (Grafico 1), mientras que las proteasas de *O. bonariensis* poseen un pH óptimo de 8,5 (Grafico 2).

En la Tabla 2 Se muestra la actividad proteolítica de la tripsina para todos los pHs ensayados y para las dos especies de pejerrey estudiadas. El rango para *O. argentinensis* es de 0,4431 a 0,8734 U/ml y para *O. bonariensis* de 0,4912 a 0,7262 U/ml.

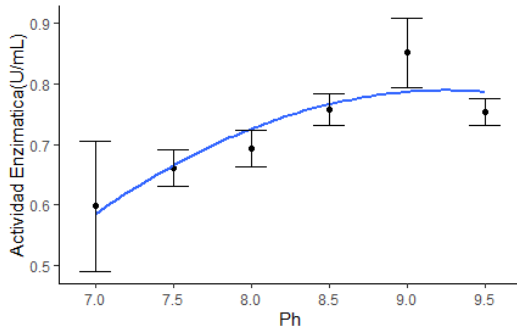


Grafico 1. Actividad proteolítica total Vs pH *O. argentinensis*

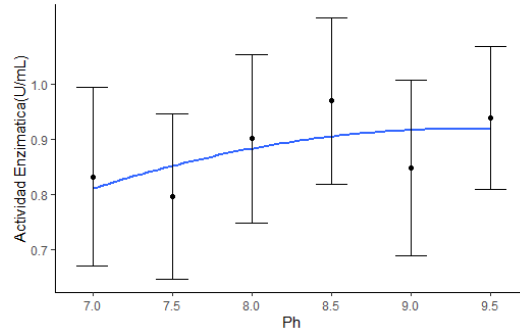


Grafico 2. Actividad proteolítica total Vs pH *O. bonariensis*

<i>O. argentinensis</i>		<i>O. bonariensis</i>	
pH	Velocidad(U/ml)	pH	Velocidad(U/ml)
7	0,4431	7	0,4912
7,5	0,7085	7,5	0,6549
8	0,5396	8	0,5950
8,5	0,5876	8,5	0,7011
9	0,8734	9	0,6840
9,5	0,6678	9,5	0,7262

Tabla 2. perfil de pH de la actividad de tripsina

La actividad proteolítica de la tripsina de *O. argentinensis* tiene un pH óptimo de 9,5 (Grafico 3), mientras que la actividad de tripsina de *O. bonariensis* poseen un pH óptimo de 9,0 (Grafico 4).

El comportamiento de la actividad de la tripsina es similar a la actividad proteolítica total, por lo que se deduce que los mecanismos de adaptación son los mismos.

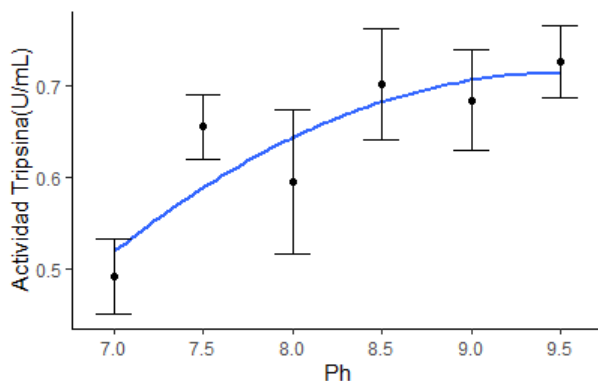


Grafico 3. Actividad proteolítica tripsina Vs pH *O. argentinensis*.

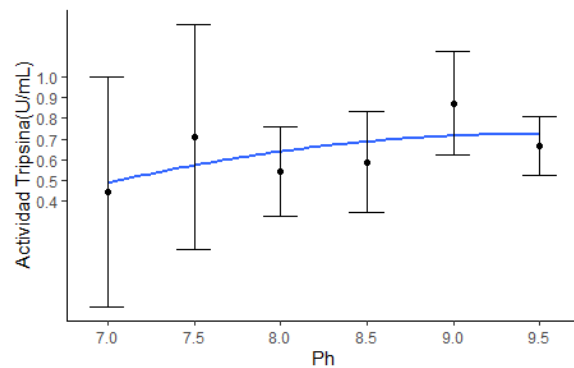


Grafico 4. Actividad proteolítica tripsina Vs pH *O. bonariensis*.

4 Conclusiones

- El pH óptimo para las enzimas proteolíticas de *O. argentinensis* es de 9,0, mientras que para *O. bonariensis* es de 8,5.
- La actividad proteolítica de las enzimas digestivas de *O. argentinensis* es mas suseptible a los cambios de pH

- Las enzimas digestivas de *O. bonariensis* muestran una mayor actividad proteolítica que *O. argentinesis*.

5 Referencias bibliográficas

- Ásgeirsson, B., Hartemink, R., Chlebowski, J.F., 1995. Alkaline phosphatase from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Kinetic and structural properties which indicate adaptation to low temperatures. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 110, 315–329.
- Colautti, D.C., Garcia de Souza, J.R., Balboni, L., Baigún, C.R.M., 2010. Extensive cage culture of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) in a shallow pampean lake in Argentina. *Aquac. Res.* 41, e376–e384.
- Dyer, B., 1994. Phylogenetic Systematics of the South American Silverside Genus *Odontesthes* Evermann & Kendall, 1906 (Teleostei, Atheriniformes, Atherinopsinae).
- Garcia de Souza, J.R., Solimano, P.J., Maiztegui, T., Baigún, C.R.M., Claps, M.C., Colautti, D.C., 2017. Seasonality effects over the ecological aquaculture of the native zooplanktivorous fish from South America *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture* 471, 19–27.
- Gómez-Requeni, P., Bedolla-Cázares, F., Montecchia, C., Zorrilla, J., Villian, M., Toledo-Cuevas, E.M., Canosa, F., 2013. Effects of increasing the dietary lipid levels on the growth performance, body composition and digestive enzyme activities of the teleost pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Aquaculture* 416–417, 15–22.
- Guidi, C., Baigún, C.R.M., Ginter, L.G., Soricetti, M., Rivas, F.G., Morawicki, S., Quezada, F., Bazzani, J.L., Solimano, P.J., 2021. Characteristics, preferences and perceptions of recreational fishers in northern Patagonia, Argentina. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 45, 101828.
- Malca, O., Lucas, A., Arbaiza, F., Carcelén, C., San Martín, H., 2006. Comparación de dos técnicas para determinar la digestibilidad proteica de insumos y alimentos comerciales para caninos. *Rev. Investig. Vet. Perú* 17, 96–103.
- Sampaio, L.A., 2006. Production of "pejerrey" *Odontesthes argentinensis* fingerlings: A review of current techniques. *Biocell* 30, 121–123.
- Somoza, G.M., Miranda, L.A., Berasain, G.E., Colautti, D., Remes Lenicov, M., Strüssmann, C.A., 2008. Historical aspects, current status and prospects of pejerrey aquaculture in South America. *Aquac. Res.* 39, 784–793.
- Uys, W., Hecht, T., Walters, M., 1987. Changes in digestive enzyme activities of *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae) after feeding. *Cult. Clarias Species* 63, 243–250.
- Vizcaíno, A.J., Sáez, M.I., Martínez, T.F., Acién, F.G., Alarcón, F.J., 2019. Differential hydrolysis of proteins of four microalgae by the digestive enzymes of gilthead sea bream and Senegalese sole. *Algal Res.* 37, 145–153.