

Caracterización de la actividad α -amilasa en algunos espáridos mediterráneos

I. Fernández, F. J. Moyano, M. Díaz y T. F. Martínez

Departamento de Biología Aplicada. Área de Biología Animal. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Almería. Edificio Científico Técnico II-B. E-04120 La Cañada (Almería), España. Correo electrónico: fjmoyano@ual.es

Recibido en julio de 2001. Aceptado en febrero de 2002.

RESUMEN

La actividad α -amilasa intestinal fue medida y caracterizada en cinco especies de espáridos que habitan en el mar Mediterráneo: *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758), *Pagellus erythrinus* (Linnaeus, 1758), *Pagellus bogaraveo* (Brünnich, 1768), *Boops boops* (Linnaeus, 1758) y *Diplodus annularis* (Linnaeus, 1758). Las principales diferencias fueron observadas en el pH óptimo y en la sensibilidad a la temperatura. La actividad amilasa en *B. boops* demostró ser poco resistente a altas temperaturas, a diferencia de la de *D. annularis*, que resultó ser muy resistente. La separación electroforética en condiciones nativas (PAGE) e isoelectroenfoque (IEF) revelaron la existencia de un número de isoformas de la α -amilasa que osciló entre una y tres fracciones activas en las especies estudiadas. Estas diferencias posiblemente estén relacionadas con los distintos hábitos alimentarios de las especies estudiadas. Esta variedad de amilasas mostrada representa una ventaja ecológica para los animales que la poseen.

Palabras clave: Enzimas, *Pagrus pagrus*, *Pagellus erythrinus*, *Pagellus bogaraveo*, *Boops boops*, *Diplodus annularis*.

ABSTRACT

Characterization of α -amylase activity in five Mediterranean sparids

Alpha-amylase activity was measured and described in five species of Mediterranean sparids: Pagrus pagrus (Linnaeus, 1758), Pagellus erythrinus (Linnaeus, 1758), Pagellus bogaraveo (Brünnich, 1768), Boops boops (Linnaeus, 1758), and Diplodus annularis (Linnaeus, 1758). Major differences were found regarding the optimum pH and thermal sensitivity of this activity. B. boops showed low resistance at high temperatures, compared with D. annularis, which showed a higher thermal tolerance. Electrophoretic separation under native conditions (PAGE) and isoelectrofoc (IEF) revealed the existence of several α -amylase isoforms, ranging from 1-3 active fractions in the species studied. These differences are probably related to differences in their feeding habits, and having a variety of amylases can be considered an ecological advantage for those animals with this characteristic.

Keywords: Enzymes, *Pagrus pagrus*, *Pagellus erythrinus*, *Pagellus bogaraveo*, *Boops boops*, *Diplodus annularis*.

INTRODUCCIÓN

El cultivo industrial de la dorada *Sparus auratus* Linnaeus, 1758, y a escala piloto del dentón *Dentex dentex* (Linnaeus, 1758) y del besugo *Pagellus bogaraveo* (Brünnich, 1768), justifican los estudios orientados hacia la optimización de su alimentación. Las enzimas proteasas desempeñan un papel importante y son conocidas (Moyano, Alarcón y Díaz, 1998; Díaz *et al.*, 1998), pero otras enzimas, como las carbohidrasas, han sido muy poco estudiadas. En este contexto, la actividad enzimática que presenta un mayor interés desde el punto de vista del conocimiento de la capacidad de utilización digestiva de materias primas y piensos es probablemente la actividad amilasa. El objetivo del presente trabajo es caracterizar la actividad α -amilasa en cinco especies de espáridos mediterráneos de interés comercial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Los animales utilizados fueron ejemplares adultos pertenecieron a las especies: *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758), *Pagellus erythrinus* (Linnaeus, 1758), *Pagellus bogaraveo*, *Boops boops* (Linnaeus, 1758) y *Diplodus annularis* (Linnaeus, 1758).

Preparación de los extractos

Los animales fueron diseccionados y sus intestinos extraídos sobre un lecho de hielo picado. Inmediatamente se prepararon los extractos intestinales homogeneizándolos en tampón fosfato 10 mM, pH 8,0, en un vaso Potter, a razón de 200 mg de tejido por ml de tampón. Todo el procedimiento se realizó manteniendo el material en un baño de hielo. A continuación se centrifugó el homogenizado (16 000 G, 30 min, 4 °C), descartando el precipitado y utilizando el sobrenadante como fuente de enzimas para los ensayos.

Pruebas bioquímicas

Se determinó su contenido en proteína soluble mediante el método de Bradford (1976), utilizando seroalbúmina bovina como estándar. La actividad amilasa se determinó según el procedimiento

de Somogy-Nelson modificado por Robyt y Whelan (1972). Básicamente consiste en la medición de la cantidad de azúcares reductores liberados a partir del almidón utilizado como sustrato, mediante la comparación con un estándar de maltosa.

Efecto de distintos factores sobre la actividad amilasa

Para caracterizar el pH y la temperatura óptimos de la actividad amilasa se utilizó un rango de pH entre 2,0 y 12,0, y un rango de temperatura entre 25 y 70 °C. Para la determinación de la estabilidad al pH de la actividad amilasa, los extractos fueron preincubados (90 min, 25 °C) a valores de pH de 2,0, 5,0, 7,0, 9,0 y 12,0, mientras que la estabilidad a la temperatura se determinó mediante la preincubación de los extractos a temperaturas de 30, 40, 50 y 60 °C. La sensibilidad al inhibidor comercial de α -amilasa (de *Triticum aestivum* Linnaeus, 1753, tipo I, Sigma, A1520) fue determinada incubando 100 U de actividad amilasa con 15 U de inhibidor durante 30 min, y comparando la actividad con un control que consistió en una cantidad equivalente de extracto en ausencia de inhibidor.

Electroforesis

La identificación electroforética mediante zimoogramas se llevó a cabo en condiciones nativas, de acuerdo con Davis (1964), dada la sensibilidad de la actividad amilasa al detergente SDS (pérdida del 60-80 % de la actividad), que desaconsejó la electroforesis en condiciones desnaturalizantes según Laemmli (1970). Se utilizaron geles de poliacrilamida (12 % poliacrilamida en el gel separador) sometidos a una diferencia de potencial constante de 100 V por gel, durante un tiempo total de 1 hora. Tras la separación electroforética, los geles fueron incubados en una solución de almidón al 1 % preparada en tampón fosfato citrato 0,1 M, 50 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, pH 8,0, durante 60 min a 37 °C. El revelado de las bandas de actividad se realizó con lugol al 10 %, mostrándose las fracciones activas como bandas de color amarillo claro sobre un fondo marrón oscuro de almidón no hidrolizado. Se determinó el punto isoelectrico (pI) de las fracciones activas mediante isoelectroenfoque (IEF) pH 3-10, utilizando como referencia la α -amilasa porcina comercial. Los resultados fueron tratados

estadísticamente (Anova y test de Tukey, $p < 0,05$) mediante una aplicación informática específica (Statgraphics Plus 4.0, Statistical Graphics Corp., Rockville, Maryland, EE UU).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores obtenidos de actividad amilasa específica de los extractos intestinales de las distintas especies fueron de $40,9 \pm 1,9 \times 10^3$ U/mg proteína soluble para *B. boops*, $19,2 \pm 1,5 \times 10^3$ para *P. erythrinus*, $11,0 \pm 0,4 \times 10^3$ para *P. bogaraveo*, $9,5 \pm 0,2 \times 10^3$ para *P. pagrus* y $6,2 \pm 0,5 \times 10^3$ para *D. annularis*. El porcentaje de inhibición producida por el inhibidor comercial de trigo para *P. pagrus* fue del 30 % y del 61 y 65 % para *D. annularis* y *P. erythrinus*, respectivamente. Dado que tanto el trigo como los subproductos del trigo son empleados en la elaboración de los piensos para acuicultura, ha de ser considerada la evaluación del posible efecto inhibidor de los componentes vegetales sobre las enzimas amilasas de las especies a las que van destinados.

Los óptimos de pH para la actividad amilasa (figura 1) mostraron modelos diferentes: un máximo a pH 7,0 *P. pagrus* y *B. boops*; dos máximos *P. erythrinus* (pH 7,0 y 9,0) y *D. annularis* (pH 6,0 y 9,0), mientras que para *P. bogaraveo* se detectaron tres óptimos a pH 4,0, 6,0 y 8,0. La actividad residual a diferentes pH (figura 2) mostró que las amilasas son poco estables en medio ácido, reduciéndose su actividad en más de un 70 % después de 30 min de incubación en todas las especies estudiadas, a excepción de *D. annularis*. El pH alcalino o neutro no redujo la actividad amilasa, que se mantuvo por encima del 80 % después del mismo tiempo. Con relación a los óptimos de temperatura (figura 3) se detectó en general un comportamiento unimodal (30-45 °C) y bimodal para *D. annularis* y *P. pagrus*. La actividad amilasa de *B. boops* mostró poca estabilidad a la temperatura (figura 4), en contraste con el comportamiento de *P. pagrus* y *D. annularis*, cuya actividad amilasa resultó ser resistente al calentamiento. Los zimogramas PAGE (figura 5) revelaron para todos los espáridos dos isoformas de la α -amilasa. Sin embargo, el isoelectroenfoco

Figura 1. Efecto del pH sobre la actividad amilasa de los extractos de las cinco especies de espáridos estudiadas.

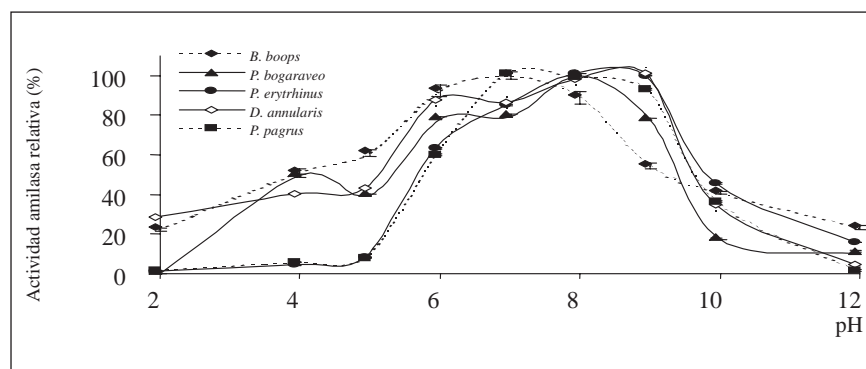
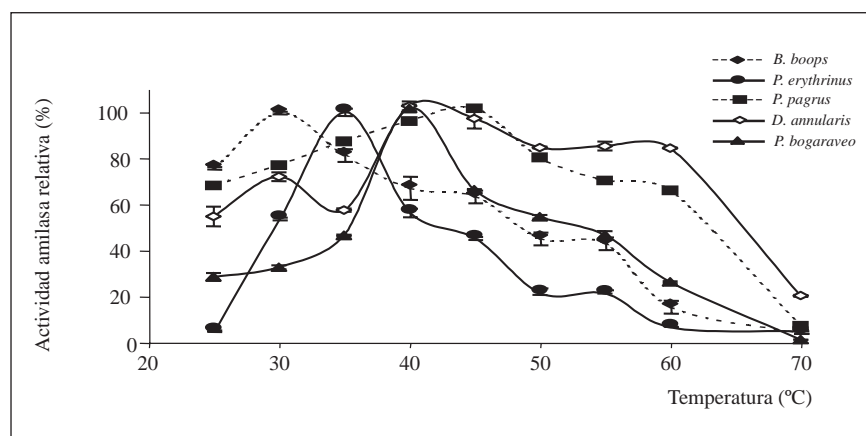


Figura 2. Efecto de la temperatura sobre la actividad amilasa de los extractos enzimáticos de los distintos espáridos estudiados.



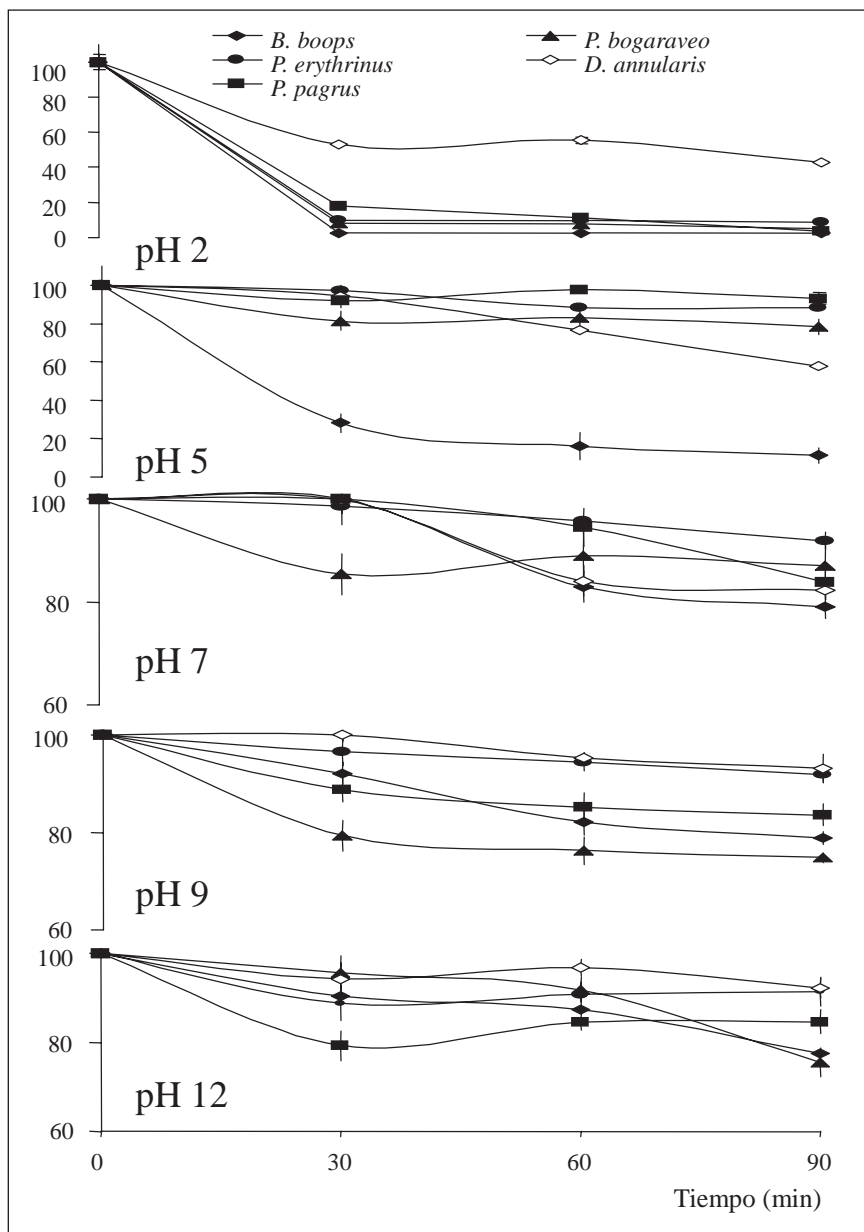


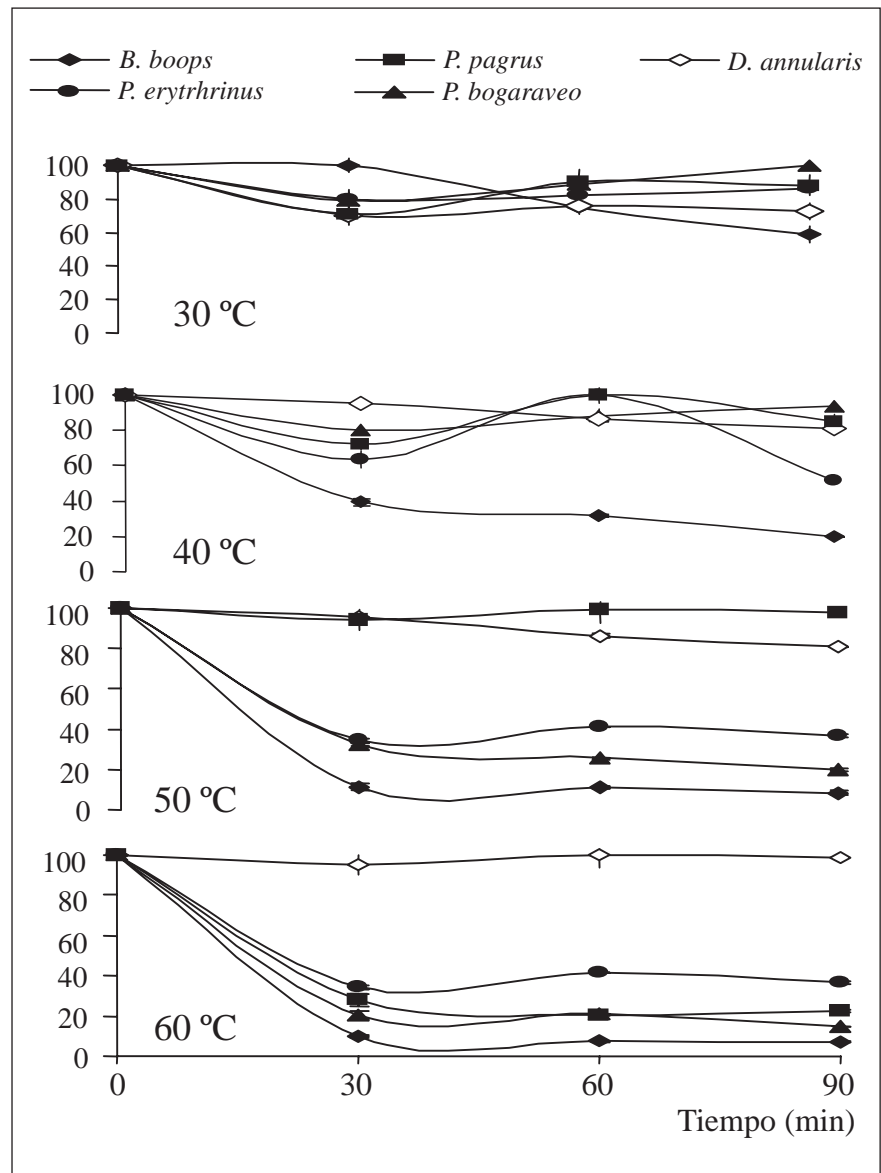
Figura 3. Efecto de los distintos valores de pH mantenidos durante 90 minutos sobre la estabilidad de la actividad amilasa de los extractos enzimáticos.

reveló una única banda activa para *B. boops* y *P. pagrus* (pI 4,0), dos para *D. annularis* (pI 3,3 y 4,0) y tres bandas para *P. erythrinus* (pI 6,5, 7,8 y 8,7). La actividad amilasa específica más elevada se detectó en *B. boops*, especie considerada más herbívora, mientras que las más carnívoras, como *P. erythrinus* y *D. annularis*, mostraron la menor actividad específica, resultado que coincide con observaciones previas (Hofer *et al.*, 1982; Hidalgo, Urea y Sanz, 1999).

Munilla-Morán y Saborido-Rey (1996) describieron el valor neutro de pH óptimo para la actividad amilasa en algunos espáridos. Sin embargo,

los resultados obtenidos en el presente estudio, con la existencia de más de un óptimo en la mayoría de las especies consideradas, apunta a la posible existencia de isoformas de la α -amilasa con valores de pH óptimo más alcalinos (8,0 y 9,0), hecho que se corresponde con la alta sensibilidad a valores de pH ácidos. Estos resultados indican que la digestión de los carbohidratos ocurre fundamentalmente en medio alcalino. No obstante, la reducción de la actividad amilasa a pH 5,0 observada en *B. boops* podría estar asociada a la inexistencia de un estómago bien definido, en contraste con las observaciones de Zemke-White, Clements y

Figura 4. Sensibilidad de la actividad amilasa de los extractos digestivos de los espáridos a las diferentes temperaturas mantenidas durante 90 minutos.



Harris (1999), quienes señalaron la importancia del paso previo por el estómago para la lisis de las algas en los peces herbívoros. Los óptimos de temperatura encontrados para la actividad amilasa en las diferentes especies estudiadas oscilaron entre 30 y 45 °C, detectándose un segundo máximo en *B. boops* y *D. annularis*. El amplio rango de temperatura (25 a 50 °C) ha sido citado para las amilasas en otras especies (Munilla-Morán y Saborido-Rey, 1996). Las respuestas desiguales ante el inhibidor comercial de α -amilasas observadas en las especies estudiadas, junto con el resto de los resultados obtenidos, avalan la presencia de diferentes isoformas. En los zimogramas PAGE, se detectaron dos

bandas activas en todas las especies (figura 5). Sin embargo, el IEF reveló importantes diferencias entre especies, y así *B. boops* presentó una sola fracción activa, muy sensible al pH y la temperatura, mientras que el resto de especies presentaron dos o tres fracciones activas. De forma general, la presencia de diferentes isoformas de amilasa, unida a la alta resistencia a los cambios de pH y temperatura (por ejemplo, en *D. annularis*), representa una ventaja ecológica frente a la existencia de una única fracción activa, que parece ser responsable de una mayor sensibilidad a los cambios de pH y temperatura del medio (por ejemplo, en *B. boops*).

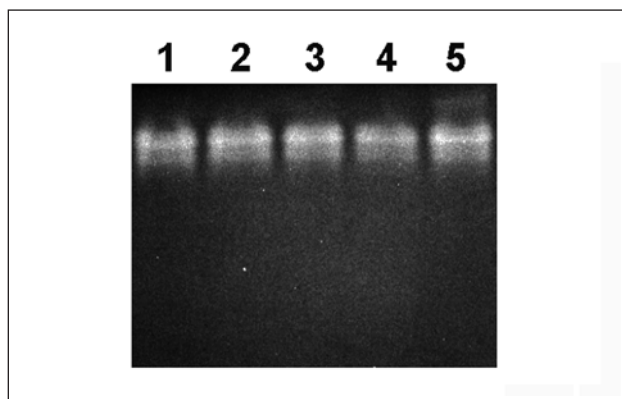


Figura 5. Identificación electroforética (PAGE) de las fracciones activas de las distintas especies. Carril 1: *Boops boops*; carril 2: *Diplodus annularis*; carril 3: *Pagellus bogaraveo*; carril 4: *Pagellus erythrinus*; carril 5: *Pagrus pagrus*.

BIBLIOGRAFÍA

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Davis, B. J. 1964. Description of discontinuous buffer system for non-denaturing gels in electrophoresis. *Ann. NY. Acad. Sci.* 209: 373-381.
- Díaz, M., F. J. Moyano, F. J. Alarcón, F. L. García-Carreño y M. A. Navarrete del Toro. 1998. Characterization of fish acid proteases by substrate-gel electrophoresis. *Comp. Biochem. Physiol.* 121 (B): 369-377.
- Hidalgo, M. C., E. Urea y A. Sanz. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170: 267-283.
- Hofer, R., G. dalla Via, J. Troppmair y G. Giussani. 1982. Differences in digestive enzymes between cyprinid and non-cyprinid fish. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.* 40: 201-208.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Moyano, F. J., F. J. Alarcón y M. Díaz. 1998. Comparative biochemistry of fish digestive proteases applied to the development of *in vitro* digestibility assays. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 5: 135-143.
- Munilla-Morán, R. y F. Saborido-Rey. 1996. Digestive enzymes in marine species. II. Amylase activities in gut from seabream (*Sparus aurata*), turbot (*Scophthalmus maximus*) and redfish (*Sebastes mentella*). *Comp. Biochem. Physiol.* 113 B (4): 827-834.
- Robyt, J. F. y W. J. Whelan. 1972. Reducing value methods for maltodextrins: I. Chain-length dependence of alkaline 3,5-dinitrosalicylate and chain-length independence of alkaline copper. *Anal. Biochem.* 45: 510-516.
- Zemke-White, W. L., K. D. Clements y P. J. Harris. 1999. Acid lysis of macroalgae by marine herbivorous fishes: myth or digestive mechanism. *J. Experim. Mar. Biol. Ecol.* 233: 95-113.