



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISION ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



LABORATORIO DE ACUICULTURA TROPICAL

“EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DE TRIPSINA DE PEJELAGARTO
(*Atractosteus tropicus*, Gill 1863)”

TESIS:

**Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias
en
Ecología y Manejo de Sistemas Tropicales**

Presenta:

M.C. Kristal de María Jesús de la Cruz

Director:

Dr. Carlos Alfonso Álvarez González

Co-Directora:

Dra. Ángela Ávila Fernández

Villahermosa Tabasco, México

Mayo 2018



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN**

Villahermosa, Tab., a 28 de Mayo de 2018

ASUNTO: Autorización de Modalidad de Titulación

**C. LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON
JEFE DEL DEPTO. DE CERTIFICACIÓN Y TITULACION
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
PRESENTE**

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del interesado, informo a usted, que en base al reglamento de titulación vigente en esta Universidad, ésta Dirección a mi cargo, autoriza a la **C. KRISTAL DE MARÍA JESÚS DE LA CRUZ** egresada del Doctorado en **CIENCIAS EN ECOLOGÍA Y MANEJO DE SISTEMAS TROPICALES** de la División Académica de **CIENCIAS BIOLÓGICAS** la opción de titularse bajo la modalidad de Tesis de Doctorado denominado: **"EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TRIPSINA DE PEJELAGARTO (*Atractosteus tropicus*, Gill 1863)"**.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para saludarle afectuosamente.

A T E N T A M E N T E

**M. EN C. ROSA MARTHA PADRON LOPEZ
DIRECTORA DE LA DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

C.c.p.- Expediente Alumno de la División Académica
C.c.p.- Interesado

**UJAT
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



DIRECCIÓN



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN**



MAYO 28 DE 2018

**C. KRISTAL DE MARÍA JESÚS DE LA CRUZ
PAS. DEL DOCTORADO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA Y
MANEJO DE SISTEMAS TROPICALES
P R E S E N T E**

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Doctorado en Ciencias en Ecología y Manejo de Sistemas Tropicales titulado: **"EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TRIPSINA DE PEJELAGARTO (*Atractosteus tropicus*, Gill 1863)"**, asesorado por el Dr. Carlos Alfonso Álvarez González y Dra. Ángela Ávila Fernández sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado está integrado por Dr. Rafael Martínez García, Dra. Ángela Ávila Fernández, Dr. Carlos Alfonso Álvarez González, Dr. Nicolás Álvarez Pliego, Dra. Susana Camarillo Coop, Dra. Susana del Carmen de la Rosa García y Dra. Ena Edith Mata Zayas

Por lo cual puede proceder a concluir con los trámites finales para fijar la fecha de examen.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
ESTUDIO EN LA DUDA, ACCIÓN EN LA FE

**M. EN C. ROSA MARTHA PADRON LOPEZ
DIRECTORA**

C.c.p.- Expediente del Alumno.
C.c.p.- Archivo

UJAT
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN

Miembro CUMEX desde 2008
Consortio de
Universidades
Mexicanas
UNA ALIANZA DE CALIDAD POR LA EDUCACIÓN SUPERIOR

KM. 0.5 CARR. VILLAHERMOSA-CÁRDENAS ENTRONQUE A BOSQUES DE SALOYA
Tel. (993) 358-1500 Ext. 6400 y 6401, 337-9611, 337-9706, Fax (993) 354-4308 y 358-1579
Usar papel reciclado economiza energía, evita contaminación y despilfarro de agua y ayuda a conservar los bosques

www.ujat.mx

CARTA AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis de doctorado denominado: **“EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TRIPSINA DE PEJELAGARTO (*Atractosteus tropicus*, Gill 1863)”**, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el Trabajo Recepcional antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en éste documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco a los 28 Días del mes de Mayo de 2018.

AUTORIZO

Kristal de María
Jesús de la Cruz

KRISTAL DE MARÍA JESÚS DE LA CRUZ

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio Laboratorio de Acuicultura Tropical, en la División Académica de Ciencias Biológicas, bajo la dirección del Dr. Carlos Alfonso Álvarez González, y en el Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología, de la División Académica de Ciencias de la Salud, bajo la dirección de la Dra. Ángela Ávila Fernández, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

EL PROYECTO FUE FINANCIADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT: BECA 173065) Y POR EL PROYECTO INSTITUCIONAL UJAT-2016-PFI-DACS-07 Y EL PROYECTO SAGARPA-2011-08-164673.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la Beca de Manutención otorgada durante la realización de mis estudios (CONACYT: BECA 173065).

Al Dr. Carlos Alfonso Álvarez González y la Dra. Ángela Ávila Fernández por haber asesorado este trabajo, por su compromiso y apoyo durante el desarrollo de este proyecto

A los Miembros del Comité Predoctoral: Dra. Judith Andrea Rangel Mendoza, Dr. Emyr Saúl Peña Marín, Dra. Sugely López Martínez, Dr. Dariel Tovar Martínez y Dr. Raúl Antonio Llera Herrera, por sus valiosas contribuciones para la realización de este proyecto.

A los Integrantes del Jurado: Dr. Rafael Martínez García, Dra. Ángela Ávila Fernández, Dr. Carlos Alfonso Álvarez González, Dr. Nicolás Álvarez Pliego, Dra. Susana Camarillo Coop, Dra. Susana del Carmen de la Rosa García y Dra. Ena Edith Mata Zayas por sus comentarios y aportaciones durante la revisión de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Alfonso Frías Quintana, Dr. Luis Daniel Jiménez Martínez y Med. José Antonio Morales Contreras, por el apoyo técnico proporcionado a lo largo del proyecto.

Al Dr. Agustín López Munguía, del Instituto de Biotecnología de la UNAM, por permitirme realizar mi Estancia Académica en el Laboratorio a su cargo, y hacerme parte de su equipo de trabajo durante el tiempo de realización de la misma, a la M.C. María Elena Rodríguez por el apoyo en el desarrollo de las técnicas cromatográficas.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Acuicultura Tropical (DACBiol-UJAT), Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología (DACS-UJAT), Laboratorio del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Laboratorio de Biotecnología (DACBiol-UJAT), Laboratorio de Genómica (DACBiol-UJAT), al igual que a mis compañeros de Generación y otros más que conocí durante estos cuatro años de estudio, los cuales fueron parte muy importante de esta gran etapa, por todos esos momentos compartidos muchas gracias.

Dedicatorias

A DIOS por permitirme ver cumplida una meta más, en mi Desarrollo Profesional, iluminarme en cada uno de mis pasos, y alentarme en los momentos difíciles.

A mis Padres, por ser un ejemplo, por el Amor, el apoyo y los cuidados que me han otorgado siempre, por la dicha de tenerlos como mis Padres, porque me enseñaron, entre muchas cosas a luchar por alcanzar los sueños.

A mis Hermanos Miriam Elizabeth, Iris Nohemí e Hiram, por ser parte importante de mi vida, y estar ahí para mí, cuando más los necesito, están siempre en mi Corazón.

“La disciplina es no perder de vista lo que se desea alcanzar”

Dedico esta Tesis a todas esas personas que directa o indirectamente fueron parte fundamental para mi formación y éxito, en especial a mi Esposo por el apoyo recibido a lo largo de este increíble proyecto, y a la persona más importante de mi vida mi hijo

RAMSÉS

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS EN PECES	2
2.2 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN	3
2.3 USOS DE LAS TRIPSINAS Y PERSPECTIVAS PARA SU PRODUCCIÓN	4
3. JUSTIFICACIÓN	8
4. OBJETIVOS	9
4.1 OBJETIVO GENERAL	9
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
5. CAPÍTULOS	10
5.1 CAPÍTULO I: EXPRESSION OF TRYPSIN IN ADULTS AND LARVAE OF TROPICAL GAR <i>TRACTOSTEUS TROPICUS</i>	11
5.2 CAPÍTULO II: FISH TRYPSINS: POTENTIAL APPLICATIONS IN BIOMEDICINE AND PROSPECTS FOR PRODUCTION	43
5.3 CAPÍTULO III: CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LA TRIPSINA RECOMBINANTE DE <i>A. TROPICUS</i> (AT1)	58
<i>Introducción</i>	60
<i>Materiales y Métodos</i>	62
<i>Resultados</i>	65
<i>Discusión</i>	67
<i>Agradecimientos</i>	70
<i>Conflicto de intereses</i>	70
<i>Referencias</i>	70
<i>Leyenda de Tabla</i>	72
<i>Leyendas de Figuras</i>	74
6. CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN GENERAL	81
NIVELES DE EXPRESIÓN DE TRIPSINA EN DIFERENTES TEJIDOS EN ADULTOS DE <i>A. TROPICUS</i>	81
NIVELES DE EXPRESIÓN DE TRY EN LARVAS DE <i>A. TROPICUS</i>	83
PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE DE <i>A. TROPICUS</i>	86
7. CONCLUSIÓN GENERAL	87
8. PERSPECTIVAS	89
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
10. ANEXOS	102
ANEXO I. CARTA DE ACEPTACIÓN IV ENCUENTRO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGÍA.....	103
ANEXO II. CARTEL PRESENTADO EN EL IV ENCUENTRO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGÍA	104
ANEXO III. CONSTANCIA DE PARTICIPACIÓN IV ENCUENTRO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGÍA	105

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, en la División Académica de Ciencias Biológicas (DACBiol), dentro de la Línea de Investigación de Manejo y Conservación de Recursos Acuáticos, se han realizado diversas investigaciones de fisiología, bioquímica digestiva y requerimientos de nutrientes tanto en larvas, como en juveniles de especies nativas de peces como la tenguayaca (*Petenia splendida*) (Perales-García 2009; Uscanga-Martínez et al. 2011), castarrica (*Cichlasoma urophthlamus*) (López-Ramírez et al. 2011), paleta (*Vieja bifasciata*) (Ramírez-Custodio 2013), tahuina (*Cichlasoma trimaculatum*) (Cruz-Herrera 2013; Toledo-Solís 2013) y pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) (Guerrero-Zárate et al. 2014; Huerta-Ortíz 2008; Aguilera et al. 2012; Frías-Quintana et al. 2015b; Jesús-Contreras 2008). Dichas investigaciones han permitido comprender sus procesos digestivos a lo largo de sus etapas de desarrollo y potenciar su cultivo al desarrollar alimentos balanceados en función de su fisiología digestiva, en particular en el pejelagarto (Frías-Quintana et al. 2010; Aguilar-Tellez 2013; Domínguez-Lorenzo 2014; Frías-Quintana et al. 2015a; Frías-Quintana et al. 2017). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es aislar el gen que codifica para la tripsina de pejelagarto (*A. tropicus*) y realizar estudios de expresión génica, durante la ontogenia inicial y en diferentes tejidos tanto en individuos de vida libre como de cautiverio. Hasta el momento para la caracterización enzimática de *A. tropicus* se han realizado extractos a partir de diferentes tejidos. Hasta el momento éstas enzimas no han sido producidas ni caracterizadas en sistemas recombinantes, por lo que resulta interesante poder expresar la tripsina de *A. tropicus* en un hospedero heterólogo y caracterizar la enzima recombinante, para conocer posibles aplicaciones.

2. ANTECEDENTES

2.1 Digestión de proteínas en peces

Los peces pueden llevar a cabo la digestión de diferentes nutrientes, gracias al complejo paquete enzimático que poseen, que incluye gran variedad de proteasas, lipasas y carbohidrasas (Peña-Marín 2016). Dentro de las enzimas digestivas, las proteasas juegan un papel fundamental en la digestión, lo que se traduce en un crecimiento y supervivencia altos. Las proteasas encontradas dentro de los órganos digestivos de peces, son las responsables de catalizar la hidrólisis de los enlaces peptídicos (Klomklao 2008), donde se incluye pepsina, gastrinas, tripsinas, quimotripsinas, colagenasas, elastasas, carboxipeptidasas y carboxilesterasas (Haard y Simpson 1994; Simpson 2000; Bougatef 2013) de las cuales tripsina (Villalba-Villalba et al. 2011; Castillo-Yáñez et al. 2005; Klomklao et al. 2004), quimotripsina (Villalba-Villalba et al. 2011; Castillo-Yáñez et al. 2006) y pepsina (Lo y Weng 2006; Klomklao et al. 2007b; Castillo-Yáñez et al. 2004) son las enzimas digestivas más importantes debido a su abundancia y alta actividad proteolítica de acuerdo a estudios de caracterización de enzimas digestivas reportados en diferentes peces (Klomklao 2008; Shahidi y Janak Kamil 2001)

La tripsina es una endopeptidasa digestiva, miembro de la familia de las serinproteasas (EC 3.4.21.4), la cual se caracteriza por un mecanismo catalítico común, que involucra la presencia de una tríada catalítica compuesta por residuos de serina, histidina y ácido aspártico. Las tripsinas actúan mediante la hidrólisis específica de los enlaces éster y los enlaces peptídicos que implican los grupos carboxilo de Arginina (Arg) o Lisina (Lys) (Zamani y Benjakul 2016; Bougatef 2013). Esta enzima proteolítica en los mamíferos es sintetizada en el páncreas y secretada en el intestino delgado como un precursor inactivo (zimógeno) llamado tripsinógeno, el cual mediante la pérdida de los primeros siete aminoácidos por corte proteolítico origina la tripsina activa (Rønnestad et al. 2013).

2.2 Análisis de expresión

Los genes de algunas tripsinas de peces han sido parcial o totalmente aislados para su caracterización molecular y su posterior utilización en la determinación de los niveles de expresión de estas enzimas como un efecto del tipo de dieta que se administra a estos organismos. De esta forma se han realizado análisis de expresión de tripsinas en peces marinos como el Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Rungruangsak-Torrissen y Sundby 2000; Martin et al. 2002; Rungruangsak-Torrissen et al. 2006; Lilleeng et al. 2007), Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) (Ahsan et al. 2001), Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) (Castillo-Yáñez et al. 2005), true sardine (*Sardinops melanostictus*) (Kishimura et al. 2006), skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) (Klomklao et al. 2007a), orange-spotted (*Epinephelus coioides*) (Liu et al. 2012; Liu et al. 2013), mientras que en peces dulceacuícolas sólo destacan en especies como common carp (*Cyprinus carpio*) (Cao et al. 2000), *Pelteobagrus fulvidraco* (Wang et al. 2006) y snakehead (*Channa argus*) (Zhou et al. 2012).

Por otro lado, se ha analizado la expresión de la tripsina durante la ontogenia inicial en larvas de bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*) (García-Gasca et al. 2006), totoaba (*Totoaba macdonaldi*) (Galaviz et al. 2015), spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) (Galaviz et al. 2012), sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Cahu et al. 2004; Péres et al. 1998), Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) (Murray et al. 2006), winter flounder (*Pleuronectes americanus*) (Murray et al. 2004), grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) (Ruan et al. 2010), Japanese eel (*Anguilla japonica*) (Kurokawa et al. 2002; Murashita et al. 2013), con la finalidad de detectar el momento en el que el aparato digestivo del pez esta preparado para ser alimentado con formulaciones. Es por ello que parte de los objetivos de este trabajo están destinados a generar este conocimiento una especie de importancia comercial en la región (*A. tropicus*).

2.3 Usos de las tripsinas y perspectivas para su producción

De forma industrial, las tripsinas de peces se obtienen actualmente de ciegos pilóricos (Kurtovic et al. 2006; Pálsdóttir y Gudmundsdóttir 2008; Khantaphant y Benjakul 2010; Freitas et al. 2012b), vísceras (Klomklao et al. 2011; Sila et al. 2012) e intestinos (Souza et al. 2007; Jellouli et al. 2009; Unajak et al. 2012). Sin embargo, el proceso de obtención de las enzimas implica varias limitantes, tales como: a) la disponibilidad estacional de materias primas (Simpson et al. 1992; Bougatef 2013); b) la heterogeneidad en el rendimiento y/o actividad enzimática debido al estado nutricional de la especie y la degradación de los tejidos utilizados como materia prima (Simpson et al. 1992; Espósito et al. 2010); c) los costos de producción (Espósito et al. 2009; Bougatef 2013); y d) los bajos rendimientos asociados con los procesos de purificación utilizados.

Las características de las tripsinas de peces son diferentes dependiendo de la especie y en consecuencia, sus posibles aplicaciones en diferentes tipos de industrias. Las aplicaciones de tripsinas de peces incluyen las siguientes: como ingredientes en detergentes (Espósito et al. 2009, Espósito et al. 2010; Jellouli et al. 2009; Ktari et al. 2012; Nasri et al. 2012; Younes, et al. 2015; Bkhairia et al. 2016), en la extracción de carotenoproteínas a partir de desechos de camarón (Simpson et al. 1992; Klomklao et al. 2009; Sila et al. 2012; Younes, et al. 2015; Poosin et al. 2017), en la producción de hidrolizados de proteína, como ingredientes alimenticios (Kristinsson y Rasco 2000; He et al. 2013; Tavano 2013; Ketnawa et al. 2016; Villamil et al. 2017) y diversas aplicaciones en la industria alimentaria (Bougatef et al. 2007; Balti et al. 2009; Freitas et al. 2012a).

Además, en los últimos años se ha propuesto una posible aplicación para las tripsinas de peces como agente antipatógeno. Esto con base en ensayos *in vitro*, donde se ha observado que la tripsina del bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) ha demostrado una alta eficacia antipatogénica contra el VHS-1 y el virus sincicial respiratorio (VRS), los dos virus patógenos más prevalentes en las infecciones del tracto respiratorio superior. Por otro lado, los ensayos *in vivo* han mostrado resultados favorables usando tripsina de bacalao del Atlántico en formulaciones para curar heridas. En ambos casos, la alta capacidad digestiva de la enzima juega un papel importante en su efectividad contra los patógenos. Además, esta enzima fue de 3 a 12 veces más efectiva en la degradación de proteínas nativas grandes que la tripsina bovina (Gudmundsdóttir et al. 2013).

La tripsina del bacalao del Atlántico se ha propuesto también para el desarrollo de cosméticos y medicamentos, dado que estas enzimas inactivan enterotoxinas bacterianas, citoquinas inflamatorias y receptores de superficie celular implicados en la adhesión celular. Lo que permite su uso terapéutico como agente tópico contra el dolor, inflamación aguda y crónica, enfermedades reumáticas y autoinmunes, alergias, infecciones microbianas (Clarsund y Blom 2015 a,b), dermatopatías y removedor de placa dental (Bjarnason, 2000). Se han registrado seis patentes relacionadas con su producción y uso, para la prevención y el tratamiento de enfermedades (WO2000078332A2; WO2015114343A1; WO2015150799A1; WO2017017027A1; EP3120866A1; WO2017017012A1).

Aunque las tripsinas de peces pueden obtenerse a partir de fuentes naturales, es necesario explorar fuentes alternativas para reducir los costos de producción debidos a las limitaciones mencionadas anteriormente, particularmente para el uso de estas enzimas en la biomedicina (Fornbacke y Clarsund 2013; Gudmundsdóttir et al. 2013).

Es por ello que la producción de tripsinas recombinantes es una alternativa que ofrece algunas ventajas: a) este método es independiente de la estacionalidad de las materias primas, b) las tripsinas recombinantes pueden obtenerse utilizando un sistema controlado que puede optimizarse para aumentar los rendimientos de producción, y c) se pueden usar algunas estrategias de purificación diseñadas específicamente para sistemas de producción de proteínas recombinantes. Hasta la fecha, ha habido poca investigación en profundidad sobre la viabilidad de producir tripsinas de peces en sistemas heterólogos, sin embargo, se han caracterizado algunas propiedades bioquímicas de tripsinas recombinantes de peces producidas en los sistemas de expresión *Escherichia coli* y *Pichia pastoris* (Ansan y Watabe 2005; Macouzet et al. 2005; Jónsdóttir y Gudmundsdóttir 2004; Pálsdóttir y Gudmundsdóttir, 2004, 2007, 2008).

El uso de proteínas recombinantes en la nutrición de organismos acuáticos todavía es reducido. Sin embargo existe un gran potencial para su aplicación en el procesamiento de alimentos, utilizándolas como aditivos, para incrementar la eficiencia de asimilación y sus características nutricionales (Guerrero-Olazarán et al. 2004). Antes de llevar a cabo la síntesis de una proteína recombinante se debe tomar en consideración algunos factores, que nos permitirán elegir el sistema de expresión más adecuado. Hoy en día existe una diversidad de vectores de expresión disponibles comercialmente (Guevara-Hernández et al. 2013) además de que si se requiere, existe la posibilidad de diseñar y posteriormente enviar a sintetizar vectores con características específicas (Guerrero-Olazarán et al. 2004). Entre los factores a tomar en cuenta de manera general es necesario conocer su origen (procariota o eucariota) (Basile y Peticca 2009), las propiedades de la proteína que vamos a expresar, ya que de éstas dependerá el método de purificación que se deberá usar (Guevara-Hernández et al. 2013; Reece 2004), una vez expresada que aplicación se le dará, y las condiciones o variables a controlar durante su cultivo (Holmes et al. 2009).

Generalmente los sistemas de expresión para eucariotas son más eficientes llevando a cabo la síntesis de una proteína específica que un sistema procarionta (Pálsdóttir y Gudmundsdóttir 2004). También es necesario conocer la secuencia de nucleótidos codificantes, además de ser necesario, se deberá optar por el uso de codones preferenciales (Lara 2011). Dentro de la gran diversidad de sistemas de expresión que podemos utilizar para la síntesis de proteínas recombinantes, *E. coli*, es el más utilizado; sin embargo, en la práctica uno de los cuellos de botella que se presentan durante el proceso de expresión de proteínas recombinantes son los bajos niveles de expresión de algunas proteínas de eucariotes, esto puede explicarse basándonos en el conocimiento de que existen codones preferenciales que son usados en las proteínas que expresan en gran cantidad, mientras que para las proteínas que expresan en menor cantidad utilizan codones menos comunes, y más aún el hecho de que los organismos procariontas utilizan diferentes codones que los eucariotas (Pérez 2015).

Es por esa razón que en la búsqueda de solucionar esa problemática, y gracias a la aplicación de herramientas biotecnológicas es posible la síntesis de vectores que contienen el gen de la proteína, a la cual se le realiza la modificación, en busca de mejorar los niveles de expresión y por ende el rendimiento obtenido de la proteína de interés (Guevara-Hernández et al. 2013; Lara 2011). Otra alternativa es el uso de sistemas para la expresión con cepas de bacterias como Rosetta™ que expresa los ARNt de AGG, AGA, AUA, CUA, CCC y GGA de otras moléculas de ARNt que se usan raramente en *E. coli* pero se producen frecuentemente en la secuencia de codificación de mamíferos (Reece 2004). Hasta el momento, no ha sido estudiada ninguna tripsina purificada de Pejelagarto (*A. tropicus*) o producida mediante el uso de sistemas recombinantes. Por tal motivo, algunos de los objetivos específicos de este trabajo están enfocados a obtener el gen que codifica para una tripsina de *A. tropicus* para realizar su caracterización molecular y en un futuro su producción en sistemas heterólogos.

3. JUSTIFICACIÓN

Es importante medir la expresión génica de tripsina durante la ontogenia inicial de *A. tropicus*, ya que nos permite obtener información valiosa acerca de los cambios morfofisiológicos que ocurren durante esta etapa, y de esta manera podemos contribuir a complementar los trabajos que hasta el momento se han venido realizando, además el complementar esta información con la expresión de la tripsina en diferentes tejidos digestivos, de organismos silvestres y de cautiverio, estudio que anteriormente no se había realizado en *A. tropicus* brinda una oportunidad interesante para comprender con mayor profundidad, el efecto que el hábitat, la frecuencia y tipo de alimentación, entre otros factores, pudieran tener en la expresión de esta proteasa.

Además, hasta el momento, no ha sido caracterizada ninguna tripsina purificada de *A. tropicus*, no se conocen sus propiedades bioquímicas y no sabemos si pudieran tener características que pudieran ser aprovechadas por algún sector industrial. Por ello, resulta interesante aislar el gen que codifica para la tripsina de pejelagarto (*A. tropicus*) para caracterizarlo y en un futuro expresarlo en un hospedero heterólogo y caracterizar las propiedades de la enzima recombinante.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar los niveles de expresión de tripsina (TRY) en diferentes tejidos y durante la ontogenia de *Atractosteus tropicus* y aislar el gen que la codifica para expresarlo en un hospedero heterólogo.

4.2 Objetivos Específicos

-Aislar el gen que codifica para la tripsina de pejelagarto (*A. tropicus*) y realizar su caracterización molecular.

-Cuantificar la expresión del gen que codifica para la tripsina de *A. tropicus* en diferentes tejidos de organismos adultos silvestres y de cautiverio

-Cuantificar la expresión del gen que codifica para la tripsina durante la ontogenia inicial 0 (embrión), 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días después de la eclosión (DAH) de *A. tropicus*.

-Clonar y expresar la tripsina de pejelagarto (*A. tropicus*) en un hospedero heterólogo

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

5. CAPÍTULOS

5.1 **CAPÍTULO I: Expression of trypsin in adults and larvae of tropical gar *Atractosteus tropicus***

Capítulo por someter:

Jesús de la Cruz, K. de M., Álvarez González, C. A., Ávila Fernández, Á, Tovar Ramírez, D., Jiménez Martínez, L.D., & Peña, E. (2018). Expression of Trypsin in adults and larvae of tropical gar *Atractosteus tropicus*. Sometido a la revista *Fish Physiology and Biochemistry*.

Runnig headline: Expresión génica de tripsina en tropical gar

Expresión de tripsina en adultos y larvas de *Atractosteus tropicus*

Kristal de M. Jesús de la Cruz¹, Carlos Alfonso Álvarez González^{1*}, Ángela Ávila Fernández², Dariel Tovar Ramírez³, Luis Daniel Jiménez Martínez¹, Emyr Saúl Peña Marín¹.

Todos los autores contribuyeron equitativamente en el estudio

C. A. Álvarez González^{1*}, K. M. Jesús de la Cruz¹, L. D. Jiménez Martínez¹,

E. S. Peña Marín¹

¹ Laboratorio de Acuicultura Tropical, DACBiol-UJAT, Carretera Villahermosa-Cárdenas Km 0.5, C.P.86139 Villahermosa, Tabasco, México.

*e-mail: alvarez_alfonso@hotmail.com

Á. Ávila Fernández²

²Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología. DACS-UJAT, Avenida Gregorio Méndez 2838-A Col. Tamulté, C.P. 86100 Villahermosa, Tabasco, México.

D. Tovar Ramírez³

³Laboratorio de Fisiología Comparada y Genómica Funcional, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Instituto Politécnico Nacional 195, Colonia Playa Palo de Santa Rita Sur, C.P.23096 La Paz, B.C.S. México.

Resumen Se determinaron los niveles de expresión de tripsina (TRY) en diferentes tejidos de organismos adultos silvestres y de cautiverio, así como los cambios en la expresión durante la ontogenia inicial de *Atractosteus tropicus*. Se realizó extracción de RNA y síntesis de cDNA a partir de páncreas, posteriormente se amplificó por PCR punto final empleando oligonucleótidos diseñados a partir de diferentes secuencias de TRY de peces registradas en el GenBank. Posteriormente, se diseñaron oligonucleótidos específicos a partir de la secuencia parcial de TRY y se realizó la extracción de RNA y síntesis del cDNA de los 11 tejidos: hígado, páncreas, estómago, esófago, intestino, ciegos pilóricos, cerebro, músculo, branquias, testículo y riñón de individuos de cautiverio y silvestres de *A. tropicus*. Asimismo, se tomaron muestras de larvas de *A. tropicus* los días 0 (embrión), 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días después de la eclosión (DAH) a las cuales se les extrajo el ARN y se realizó la síntesis de cDNA para medir la expresión en tiempo real. Los resultados muestran que la mayor expresión relativa de TRY se dio en el páncreas y en los tejidos digestivos en los organismos silvestres y de cautiverio; sin embargo, éstos últimos presentaron una mayor expresión de TRY comparados con los silvestres. Mientras que la expresión relativa de TRY durante la ontogenia inicial se mostró desde los embriones (0 DAH), para alcanzar el máximo valor a los 15 DAH, y posteriormente disminuyó. Se concluye que los niveles de expresión de TRY en los adultos de cautiverio, se deben al alto contenido de proteína que proporciona el alimento balanceado. Mientras que la mayor expresión de TRY se detectó a los 15 DAH lo que indica que a esta edad el sistema digestivo de las larvas de *A. tropicus* está totalmente desarrollado y es capaz de hidrolizar totalmente cualquier tipo de alimento que se les proporcione.

Palabras clave Tripsina, Gen, Expresión, *Atractosteus tropicus*

Introducción

El pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) es una especie que habita en cuerpos de agua con abundante vegetación acuática (Aguilera et al. 2002; Márquez-Couturier et al. 2015c), sin embargo en los últimos años las poblaciones naturales han disminuido considerablemente como consecuencia de la sobreexplotación, pérdida y/o alteración de su hábitat y sitios de desove; poco conocimiento de su biología, la ignorancia sobre su importancia ecológica, y distribución actual (Aguilera et al. 2002; Mendoza et al. 2008; Arias-Rodríguez et al. 2009; Márquez-Couturier et al. 2015c).

Desde hace más de 30 años esta especie ha sido ampliamente estudiada, su reproducción en cautiverio, y su larvicultivo se ha logrado utilizando presas vivas y alimentos balanceados, al grado que actualmente existen granjas comerciales para la producción de crías y engorda en diversos sistemas (Márquez-Couturier & Vázquez-Navarrete, 2015 a, b; Márquez-Couturier et al. 2015c).

De igual manera en los últimos años se han realizado estudios sobre la fisiología digestiva en *A. tropicus* tanto en larvas (Aguilera et al. 2012; Frías-Quintana et al. 2015b), como juveniles (Guerrero-Zárate et al. 2014), los cuales han permitido comprender los procesos digestivos a lo largo de sus etapas de desarrollo y potenciar el cultivo al desarrollar alimentos balanceados en función de su fisiología digestiva (Frías-Quintana et al. 2010; Frías-Quintana et al. 2015a; Frías-Quintana et al. 2017).

De esta manera, el complementar esta información con la expresión génica de enzimas digestivas, particularmente proteasas (Darias et al. 2005; Galaviz et al. 2012, Galaviz et al. 2015), permitirá comprender con mayor profundidad la hidrólisis de las proteínas y la biodisponibilidad de nutrientes en los alimentos balanceados para mejorar el diseño de las formulaciones (Kolkovski 2001; Zambonino-Infante and Cahu 2007; Rønnestad et al. 2013).

En este aspecto, la tripsina (TRY, EC 3.4.21.4.) es una enzima digestiva importante en la fisiología digestiva (Moyano et al. 1996; De la Parra et al. 2007; Rungruangsak-Torrissen 2012), debido a que escinde cadenas de péptidos principalmente en el lado carboxilo de lisina y arginina, excepto cuando es seguido por la prolina, liberando péptidos más pequeños para que otras proteasas digestivas intestinales continúen el proceso de hidrólisis (Sastre et al. 2005; Sanz 2009). La TRY se sintetiza en el páncreas como tripsinógeno y se almacena en gránulos de zimógeno, luego es secretada al tracto digestivo (Chen et al. 2010; Hirota et al. 2006; Raraty et al. 2000) y activada por una enteroquinasa a TRY, la que a su vez, activa a la quimotripsina, elastasa, colagenasa y lipasa (Sastre et al. 2005; Thrower et al. 2006).

En este sentido, los genes de algunas tripsinas de peces han sido parcial o totalmente aislados para su caracterización molecular y su posterior utilización en la determinación de los niveles de expresión de estas enzimas como un efecto del tipo de dieta que se administra a estos organismos.

De esta forma se han realizado análisis de expresión de tripsinas en peces marinos como el Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Rungruangsak-Torrissen and Sundby 2000; Martin et al. 2002; Rungruangsak-Torrissen et al. 2006; Lilleeng et al. 2007), Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) (Ahsan et al. 2001), Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) (Castillo-Yáñez et al. 2005), true sardine (*Sardinops melanostictus*) (Kishimura et al. 2006), skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) (Klomklao et al. 2007), orange-spotted (*Epinephelus coioides*) (Liu et al. 2012; Liu et al. 2013), mientras que en peces dulceacuícolas sólo destacan en especies como common carp (*Cyprinus carpio*) (Cao et al. 2000), *Pelteobagrus fulvidraco* (Wang et al. 2006) y snakehead (*Channa argus*) (Zhou et al. 2012).

Por otro lado, se ha analizado la expresión de la TRY durante la ontogenia en larvas de bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*) (García-Gasca et al. 2006), totoaba (*Totoaba macdonaldi*) (Galaviz et al. 2015), spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) (Galaviz et al. 2012), sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Cahu et al. 2004; Péres et al. 1998), Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) (Murray et al. 2006), winter flounder (*Pleuronectes americanus*) (Murray et al. 2004), grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) (Ruan et al. 2010), Japanese eel (*Anguilla japonica*) (Kurokawa et al. 2002; Murashita et al. 2013). Es por ello que el objetivo es contribuir en el conocimiento de los cambios de expresión relativa de TRY en diversos tejidos de individuos adultos y durante la ontogenia inicial en una especie de importancia comercial en la región (*A. tropicus*).

Materiales y Métodos

Para la realización del presente estudio se obtuvieron un total de 20 ejemplares machos de *A. tropicus*, de los cuales 10 individuos (400-520 g and 32 to 34 cm total length) fueron capturados en la Laguna El horizonte de la comunidad el Espino localizada a 32 km de la ciudad de Villahermosa, Tabasco, con coordenadas geográficas 18° 14' 50" latitud norte y 92° 49' 58" latitud oeste y 10 individuos (550-580 g and 30 to 35 cm total length) en cautiverio, los cuales fueron obtenidos de las instalaciones del Laboratorio de Acuicultura Tropical de la DACBiol -UJAT. Los organismos se mantuvieron en tanques de polietileno con medidas de 1.94 m de diámetro por 0.70 m de altura. La alimentación que se les suministró fue basada en alimento balanceado para trucha con 46 % de proteína y 16 % de lípidos con tamaños que variaron de 5.5 a 9.0 mm (El Pedregal® Silver Cup, Toluca, México).

Larvicultura y muestreo

Para este estudio, se obtuvieron un total de 450 embriones de *A. tropicus* de una reproducción inducida (de hembras de 3.5 kg y tres machos de 1.5 kg de peso promedio) usando inducción con LHRHa (35 $\mu\text{g pez}^{-1}$) y se mantuvieron en un tanque plástico redondo de 2000-L (2 m de diámetro) en el Laboratorio de Acuicultura Tropical (DACBiol-UJAT). Después del desove (16 h post- inducción hormonal), los reproductores fueron retirados para mantener los huevos adhesivos hasta la eclosión (3 días después de la fertilización a 29 °C, 0 días después del desove). Los embriones con saco vitelino fueron transferidos a tres tanques de plástico de 70-L (150 larvas por tanque) conectados a un

sistema de recirculación con un depósito de 1500-L compuesto por un filtro biológico, bomba centrífuga de 3/4 HP (Jacuzzi, JWPA5D-230A, Delavan, WI, EE.UU.), filtro de arena (STA-RITE, S166T, Delavan WI, EE.UU.) y un calentador de titanio (PSA, R9CE371, Delavan, WI, EE.UU.). La calidad del agua del sistema se midió diariamente con un oxímetro (YSI-85, Ohio, EE.UU.) y un medidor de pH (HANNA HI 991001, Romania, EU) y se mantuvo durante 30 días de larvicultura de la siguiente manera: registro de temperatura (29.0 ± 1.0 °C), oxígeno disuelto (6.4 ± 0.5 mg L⁻¹) y pH (6.7 ± 0.2). Después de la absorción del saco vitelino (2 días después de la eclosión, DAH por sus siglas en Inglés), las larvas se transfirieron al sistema de recirculación para iniciar la etapa de alimentación, realizada cinco veces al día (08:00, 11:00, 13:00, 15:00 y 18:00 h) comenzando con nauplios de *Artemia* (AN, 2-5 nauplios mL⁻¹) desde la apertura de la boca hasta 17 DAH.

Posteriormente, se proporcionó alimento de trucha (TD, Silver Cup[®] 46 % protein and 16 % lipids) hasta 31 DAH. A este respecto, el tamaño de partícula del alimento que se les proporcionó fue de acuerdo al crecimiento de las larvas (de 250-500, 500-750 and >750 μm). Durante la larvicultura, el muestreo se realizó en diferentes días después de la eclosión del embrión: 0, 5 y 10 DAH con 48 organismos (16 por tanque) y 15, 20, 25 y 30 DAH (10 por tanque) por triplicado. Las larvas se sacrificaron en primer lugar en agua (-4 °C), y se recolectaron antes de la primera alimentación y cada réplica se enjuagó con agua destilada y se transfirió a tubos Eppendorf de 1.0 to 1.5 mL con RNA-Later (Life technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) y almacenados a -80 °C hasta su análisis posterior.

Muestreo y análisis de ARN

Posteriormente, los individuos de *A. tropicus* silvestres y de cautiverio fueron sacrificados por choque térmico (-4 °C) y diseccionados para obtener 11 tejidos: hígado, páncreas, esófago, estómago, intestino, ciego pilórico, cerebro, músculo, branquias, testículo y riñón. La extracción de ARN se realizó a partir de un pool de cada tejido y de las larvas respectivamente, por el método de Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Posteriormente, la concentración de ARN y la pureza se estimaron mediante la relación 260/280 usando el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Para determinar la integridad de los ácidos nucleicos, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 % utilizando una alícuota de 5 µL de muestra mezclada con 2 µL de buffer de corrida de cada una de las muestras a 70 voltios en una cámara de electroforesis Mini Sub Cell GT (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) por 45 minutos; las bandas resultantes se visualizaron con el sistema de imágenes Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Una vez que se evaluó la integridad del material genético de cada una de las muestras, se realizaron alícuotas de acuerdo con su concentración.

ADNc de tripsina de *A. tropicus* (TRY)

Se usó un microgramo de ARN para la transcripción inversa con el kit de síntesis de ADNc iScript™ Select 170-8896 (Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU.). Posteriormente, se usó 2 µL de ADNc para la PCR punto final, y qPCR respectivamente.

PCR Punto final

Para obtener la secuencia parcial de TRY se empleó un termociclador MasterCycler® nexus de 96 pocillos (Eppendorf AG, GSX1, HSV, DE), utilizando la Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) en un volumen final de reacción de 20 µL, la cual contenía: 2 µL de Buffer 10x, 1 µL de 50 mmol L⁻¹ MgCl₂, 2 µL of dNTPs, 0.2 µL de cada oligonucleótido a una concentración de 15 mmol L⁻¹, 0.1 µL of Platinum Taq y 12.5 µL de H₂O. La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones 30 s a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 60 s, 58 °C durante 60 s y 72 °C durante 60 s con un proceso de extensión de 5 min a 72 °C.

Asimismo, se diseñaron oligonucleótidos específicos a partir de las regiones conservadas observadas en el alineamiento de las secuencias de TRY de las siguientes especies de peces: red seabream (*Pagrus major*, Temminck and Schegel, 1843), Japanese anchovy (*E. japonicus*, Temminck and Schegel, 1846), zebra fish (*Danio rerio*, Hamilton 1822), Japanese amberjack (*Seriola quinqueradiata*, Temminck and Schegel, 1845), white seabream (*Diplodus sargus*, Linnaeus, 1758), gilthead seabream (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758), Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*, Temminck and Schegel, 1846), Japanese eel (*A. japonica*, Temminck and Schegel, 1846) y grass carp (*C. idella*, Valenciennes, 1844) disponibles en la base de datos GenBank (Tabla 1).

Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa al 1.2 % teñido con bromuro de etidio usando un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, Madison, WI, EE.UU.), las bandas fueron observadas en un UV translucido (UVP, Canadá), se cortaron del gel y se purificaron usando el kit PureLink[®] PCR Purification Kit, (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Las bandas purificadas fueron enviadas a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México para su procesamiento.

Análisis de secuencia

La secuencia parcial obtenida (Fig. 1) se analizó, tradujo y comparó con las secuencias ya reportadas en la base de datos GenBank por BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). El árbol filogenético se generó usando métodos de neighbor-joining (NJ) basados en la secuencia de aminoácidos usando el software MEGA 7.0.

Diseño de primers qPCR

Los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de la secuencia parcial de tripsina de *A. tropicus* obtenida como se describe en la sección anterior, empleando el software Primer 3 Plus versión 4.0.0 (https://primer3plus.com/primer3web/primer3web_input.htm) (Tabla 1).

Los oligonucleótidos diseñados cumplieron con las siguientes características: longitud de 20 nucleótidos, temperatura de alineación de 60 °C, conteniendo un porcentaje 50-55 % de CG (Guanina-Citosina) y no forman estructuras secundarias de acuerdo al análisis en el

software Oligo Calculator versión 3.27

(<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>).

Reacción cuantitativa en cadena de la Polimerasa (qPCR) en diferentes tejidos en individuos silvestres y en cautiverio de *A. tropicus* y larvas

El análisis de expresión de TRY de los diferentes tejidos y durante la ontogenia inicial de *A. tropicus*, se realizó por medio de qPCR, para lo cual se emplearon los ADNc de los 11 tejidos de los individuos silvestres y cautiverio de *A. tropicus*, para lo cual se utilizó el páncreas de *A. tropicus* como tejido blanco, realizando un pool del tejido de los individuos silvestres y de cautiverio para la obtención de la secuencia de TRY y los ADNc de los días 0 (embrión), 5, 10, 15, 20, 25 y 30 DAH.

Empleando los oligonucleótidos específicos de TRY en un Termociclador Tiempo Real 96-well CFX96 (Model C1000, California, EE.UU.). La mezcla de reacción fue de 20 μ L, incluidos 5 μ L de Eva Green, 2 μ L de cDNA, 12.2 μ L de H₂O y 0.4 μ L de cada primer. La qPCR se realizó en condiciones de 30 min a 95 °C, seguida de 39 ciclos de 95 °C durante 5 s, 60 °C durante 5 s. Para la normalización de ADNc, se usó el gen EF1- α (número de acceso: KT351350) como gen constitutivo y se llevó a cabo en paralelo con todas las muestras. Se generó una curva estándar para cada par de para estimar las eficiencias de amplificación basadas en cantidades conocidas de ADNc (diluciones en serie cuatro veces correspondientes a ADNc transcrito de 100 a 0.1 ng de ARN total).

La expresión relativa de los genes entre los tejidos y el crecimiento de las larvas se calculó mediante el método delta-delta Ct (Pfaffl 2001)

Análisis Estadístico

Las expresiones relativas de tripsina (TRY) entre los diferentes tejidos en adultos de cautiverio y silvestres así como los diferentes días después de la eclosión de las larvas se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Se realizó una prueba Nemenyi *a posteriori* con diferencias significativas entre los niveles de expresión, utilizando un valor de significación de 0.05. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software STATISTICA™ v. 7.0 (Statsoft, Tulsa, OK, EE.UU.), y se graficó con el software Sigma Plot 12.3.

Resultados

PCR Amplifications and Sequencing Analysis

La amplificación por PCR empleando los oligonucleótidos específicos diseñados con base en el alineamiento de secuencias de tripsinas (TRY) de diferentes especies de peces dió como resultado una secuencia de nucleótidos parcial de 419 pb (número de acceso: KX882028) que fue reportada en el GenBank y que codifica para un fragmento de 139 aminoácidos (Fig. 1).

Análisis de la distancia filogenética entre secuencias

En el análisis filogenético la secuencia de aminoácidos parcial de tripsina (TRY) de *A. tropicus* forma un clado con *C. idella* mostrando un bootstrap value del 59 %. Estas especies forman un clado con blacktail snapper (*Lutjanus fulvus*, Forster, 1801) con un bootstrap value of 86 %, mostrando una alta identidad con la isoforma tripsina 3 (Fig. 2).

Expresión relativa de tejidos

Los niveles de expresión de tripsina (TRY) en los peces silvestres muestran el mayor nivel de expresión en el páncreas, seguida de intestino, ciegos pilóricos, estómago, esófago e hígado, mientras que el músculo, cerebro, riñón, testículo y branquia obtuvieron los menores niveles de expresión. En el caso de los peces de cautiverio se observó la misma tendencia, pero en estos peces se detectó un mayor nivel de expresión relativa de TRY en los tejidos de intestino, ciegos pilóricos, estómago, esófago e hígado en comparación con los silvestres (Fig. 3).

Expresión relativa en larvas

En relación a los niveles de expresión de tripsina (TRY) durante la ontogenia inicial se observa un incremento en los embriones (0 DAH), que decrece hacia el día 10 DAH y nuevamente incrementa para alcanzar su nivel máximo a los 15 DAH. Finalmente la expresión relativa decrece en los días posteriores (Fig. 4).

Discusión

Niveles de expresión de tripsina en diferentes tejidos en adultos de *A. tropicus*.

De acuerdo con los resultados obtenidos sobre los niveles de expresión de tripsina (TRY) en los once tejidos analizados en los organismos adultos silvestres y de cautiverio de *A. tropicus*, se presentan los mayores niveles en los tejidos digestivos como páncreas, intestino, ciegos pilóricos, estómago, esófago e hígado. Esto es similar a lo obtenido en especies como *S. salar* (Rungruangsak-Torrissen and Sundby 2000; Rungruangsak-Torrissen et al. 2006; Lilleeng et al. 2007), *D. labrax* (Cahu et al. 2004; Péres et al. 1998), *E. japonicus* (Ahsan et al. 2001), *S. sagax caerulea* (Castillo-Yáñez et al. 2005), *S. melanostictus* (Kishimura et al. 2006), *K. pelamis* (Klomklao et al. 2007), *P. fulvidraco* (Wang et al. 2006), *C. argus* (Zhou et al. 2012), *C. carpio* (Cao et al. 2000).

La mayor expresión de TRY fue detectada en el páncreas tanto en individuos silvestres como de cautiverio, lo que se explica ya que la tripsina se sintetiza en dicho órgano como proenzima y se activa al escindir un propéptido corto del extremo N del zimógeno inactivo, con lo cual la tripsina se activa a la luz del tubo digestivo para iniciar la hidrólisis de las proteínas, además de ser responsable de activar a otras enzimas (Sunde et al. 2004; Zhou et al. 2012; Guerrero-Zárate et al. 2014). Por otra parte, se han detectado varias isoformas de TRY en peces (Cao et al. 2000; Rungruangsak-Torrissen et al. 2006; Lu et al. 2008), por lo que para dilucidar dichas isoformas ha sido necesario clonar las secuencias completas (Zhou et al. 2012; Ahsan et al. 2001).

En este sentido, el análisis filogenético de la TRY de *A. tropicus* en comparación a otras especies de peces muestra la mayor identidad con la isoforma TRY 3, lo que se refuerza con la investigación de Lilleeng et al. (2007), en *S. salar*, quienes muestran que la mayor expresión de TRY 3 se da en el páncreas, intestino y ciegos pilóricos, mientras que las TRY 1 y 2 se encuentran en otros tejidos, como esófago y estómago, entre otros e incluso cerebro, en donde la abundancia del transcrito de TRY 2 también fue reportada para Senegalese sole (*Solea senegalensis Kaup*) (Manchado et al. 2008).

Está amplia distribución de tripsinas en otros tejidos no digestivos, respalda la hipótesis de Koshikawa et al. 1998, de que algunas isoformas además pueden estar implicadas en procesos relacionados con el mantenimiento de las funciones de las células epiteliales, sistema inmunológico y sistema nervioso central, quienes detectaron por medio de técnicas de hibridación in situ e inmunohistoquímica una isoforma cerebral específica (TRY4), en las células nerviosas del hipocampo y la corteza cerebral en humanos y ratones. Debemos mencionar que la expresión de TRY en intestino, ciegos pilóricos, estómago, esófago e hígado es mayor en los adultos de *A. tropicus* de cautiverio que en los adultos silvestres, esto puede deberse a que los individuos en cautiverio están bajo condiciones controladas con una mayor frecuencia alimentaria y sobre todo por el alimento comercial empleado para su mantenimiento, el cual contiene 46 % de proteína, lo que refleja un mayor gasto energético, ya que la tripsina juega un papel importante en la especificidad hacia los aminoácidos básicos esenciales en la nutrición, resaltando la calidad de proteínas que es administrada en dicho alimento que permite una hidrólisis rápida de proteínas (Rungruangsak-Torrissen and Sunby 2000; Rungruangsak-Torrissen et al. 2006).

Niveles de expresión de tripsin TRY en larvas *A. tropicus*.

Como se mencionó anteriormente TRY se sintetiza en el páncreas como la proenzima tripsinógeno y se almacena en gránulos de zimógeno (Murray et al. 2004; García-Gasca et al. 2006). El análisis de expresión de TRY realizado durante la ontogenia inicial en *A. tropicus* se detectó desde el embrión, presentando la máxima expresión al día 15 DAH. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Frías-Quintana et al. (2015b), quienes determinaron que las larvas de *A. tropicus* pueden ser considerados juveniles a partir de los 15 DAH ya que presentan el pico máximo de las actividades de proteasas digestivas intestinales (tripsina y quimotripsina), además que histológicamente está totalmente desarrollado el intestino. De igual manera, en otras especies como *D. labrax* (Cahu et al. 2004), *S. annulatus* (García-Gasca et al. 2006), *S. salar* (Rungruangsak-Torrissen et al. 2006), *L. guttatus* (Galaviz et al. 2012) y *T. macdonaldi* (Galaviz et al. 2015), se ha detectado la expresión de tripsinógeno desde el huevo. En este sentido, los autores mencionan que la expresión de TRY en los primeros días del desarrollo larval esta programada genéticamente para aprovechar los componentes del vitelo (alimentación endógena), y los incrementos de la expresión se relacionan al proceso de primera alimentación, así como a los cambios de alimentos vivos o inertes, además de la maduración del sistema digestivo (Gawlicka and Horn 2006). Por otra parte, la expresión de TRY se ha detectado en el embrión y en el momento de la eclosión en especies como *Melanogrammus aeglefinus* y el bacalao del atlántico *Gadus morhua* (Perez-Casanova et al. 2006), durante la primer alimentación en la anguila japonesa *A. japonica* (Kurokawa et al. 2002), Japanese flounder *P. olivaceus* (Suzuki et al. 2002), Atlantic halibut *H. hippoglossus* (Murray et al. 2006), tilapia *Oreochromis mossambicus* (Lo and Weng 2006)

y pargo rojo *Pagrus pagrus* (Darias et al. 2005) y desde el momento de la apertura de la boca y ano en winter flounder (*P. americanus*) (Murray et al. 2004) *P. fulvidraco* (Wang et al. 2006) y *C. idella* (Ruan et al. 2010). Por lo anterior, se considera que la expresión de TRY varía entre las larvas de especies de peces en función del desarrollo ontogenético y del tipo de alimentación exógena (García-Gasca et al. 2006; Kurokawa et al. 2002). Por otra parte, es probable que la expresión de TRY en el embrión de *A. tropicus*, se deba al mRNA que proporcionó la madre en el momento de desarrollo, y dicha expresión comienza antes de la eclosión (García-Gasca et al. 2006), y se incrementa cuando el tejido pancreático inicia su desarrollo, lo que fue detectado a los 3 DAH (momento de la primera alimentación) en *A. tropicus* (Frías-Quintana et al. 2015), e inclusive si no esta completamente diferenciado, como ha sido reportado en *L. guttatus* y *S. annulatus* (Galaviz et al. 2012; García-Gasca et al. 2006). Por otra parte, la mayor expresión de TRY presentada en el día 15 DAH en las larvas de *A. tropicus*, concuerda con el trabajo de Frías-Quintana et al. (2015b), quienes indican que desde los 15 DAH inicia el periodo juvenil, y el páncreas y el sistema digestivo están totalmente maduros y ya no se presentan cambios morfofisiológicos, por lo que las larvas son capaces de digerir y absorber los nutrientes de forma totalmente eficiente. Es importante recalcar que a los 15 DAH, las larvas de *A. tropicus* ya cuentan con la fisiología digestiva de un juvenil y son consideradas carnívoros oportunistas con un desarrollo ontogenético inicial precoz, lo que ha permitido realizar el destete de forma rápida utilizando una dieta comercial para trucha, aunque actualmente, se ha diseñado un alimento balanceado más adecuado para su cultivo, con lo que se ha logrado mejores crecimientos y supervivencias mayores al 90 % en la etapa larval, además de disminuir el canibalismo (Frías-Quintana et al. 2015a).

Es así que *A. tropicus* es una especie que puede ser considerada de desarrollo ontogenético transicional (alimentación endo-exotrófica) desde el punto de vista de su fisiología digestiva (Mendoza et al. 2002; Aguilera et al. 2002), lo cual es diferente a lo reportado en larvas de otras especies marinas como *S. salar*. (Lilleeng et al. 2007; Martin et al. 2002; Rungruangsak-Torrissen et al. 2006; Rungruangsak-Torrissen and Sundby 2000), *D. labrax* (Zambonino-Infante and Cahu 2007; Zambonino-Infante et al. 2008) y *T. macdonaldi* (Galaviz et al. 2015), las cuales, aunque presentan mayores niveles de expresión de TRY, requieren ser alimentadas con presas vivas (rotíferos y nauplios de *Artemia*) (García-Gasca et al. 2006) por más tiempo, ya que son consideradas especies que presentan ontogenia indirecta, por lo que la máxima eficiencia en la síntesis y secreción de los gránulos de zimógeno pancreático de las proteasas digestivas requiere más tiempo (Zambonino-Infante et al. 2008).

En conclusión, la detección del gen de TRY, inclusive antes de la eclosión de las larvas (embriones), muestra la capacidad de la larva para digerir proteínas tan pronto como se da la apertura de la boca, además, que las fluctuaciones de este gen son indicativos de los cambios morfofisiológicos que se dan a lo largo de la ontogenia en *A. tropicus*. De igual manera, el uso del gen TRY permite determinar los cambios en la síntesis de la enzima, ya sea en su forma activa o como zimógeno, por lo que es un excelente bioindicador para evaluar los cambios durante el desarrollo del sistema digestivo y determinar si los protocolos de alimentación o sus modificaciones tienen un efecto directo sobre la expresión y por consecuencia el estado nutricional de las larvas de *A. tropicus*.

Agradecimientos

El estudio fue apoyado financieramente por el Proyecto SAGARPA-2011-08-164673. Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT: beca 173065) y al Programa Institucional de Superación Académica y Fortalecimiento del Posgrado (UJAT) por las becas otorgadas.

Referencias

- Aguilera C, Mendoza R, Iracheta I, & Marquez G (2012). Digestive enzymatic activity on Tropical gar (*Atractosteus tropicus*) larvae fed different diets. *Fish Physiol Biochem* 38:679–691. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9550-8>
- Aguilera C, Mendoza R, Rodríguez G, & Márquez G (2002). Morphological Description of Alligator Gar and Tropical Gar Larvae, with an Emphasis on Growth Indicators. *Trans Am Fish Soc* 131(5):899–909. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(2002\)131<0899:MDOAGA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(2002)131<0899:MDOAGA>2.0.CO;2)
- Ahsan N, Funabara D, & Watabe S (2001). Molecular Cloning and Characterization of Two Isoforms of Trypsinogen from Anchovy Pyloric Ceca. *Mar Biotechnol (New York, N.Y.)*, 3:80–90. <https://doi.org/10.1007/s101260000055>
- Arias-Rodríguez L, Páramo-Delgadillo S, Contreras-Sánchez WM, & Álvarez-González CA (2009). Cariotipo del pejelagarto tropical *Atractosteus tropicus* (Lepisosteiformes : Lepisosteidae) y variación cromosómica en sus larvas y adultos. *Rev Biol Trop* 57(3): 529–539. <https://doi.org/https://doi.org/10.15517/rbt.v57i3.5473>
- Cahu C, Rønnestad I, Grangier V, & Zambonino Infante JL (2004). Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin. *Aquaculture* 238:295–308. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.04.013>
- Cao MJ, Osatomi K, Suzuki M, Hara K, Tachibana K, & Ishihara T (2000). Purification and characterization of two anionic trypsins from the hepatopancreas of carp. *J Fish Sci* 66:1172–1179. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2000.00185.x>
- Castillo-Yáñez FJ, Pacheco-Aguilar R, García-Carreño FL, & Navarrete-Del Toro M. de LÁ (2005). Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comp Biochem Phys B* 140(1):91–98. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.09.031>
- Chen N, Zou J, Wang S, Ye Y, Huang Y, Gadda G, & Yang J (2010). Designing Protease Sensors for Real-time Imaging of Trypsin Activation in Pancreatic Cancer Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48(15): 3519–3526. <https://doi.org/10.1021/bi802289v>
- Darias MJ, Murray HM, Martínez-Rodríguez G, Cárdenas S, & Yúfera M (2005). Gene expression of pepsinogen during the larval development of red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture* 248:245–252. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.044>

- De la Parra AM, Rosas A, Lazo JP, & Viana MT (2007). Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. *Fish Physiol Biochem* 33:223–231. <https://doi.org/10.1007/s10695-007-9134-9>
- Frías-Quintana CA, Álvarez-González CA, & Márquez-Couturier G (2010). Diseño de microdietas para el larvicultivo de pejelagarto *Atractosteus tropicus*, Gill 1863. *Universidad y Ciencia* 26(2):265–282. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792010000300006&lng=es&tlng=es.
- Frías-Quintana CA, Álvarez-González CA, Tovar-Ramírez D, Martínez-García R, Camarillo-Coop, S., Peña, E., & Galaviz, M. A. (2017). Use of Potato Starch in Diets of Tropical Gar (*Atractosteus tropicus*, Gill 1863) Larvae. *Fishes* 2(1):1–11. <https://doi.org/10.3390/fishes2010003>
- Frías-Quintana CA, Domínguez-Lorenzo J, Álvarez-González CA, Tovar-Ramírez D, & Martínez-García R (2015a). Using cornstarch in microparticulate diets for larvicultured tropical gar (*Atractosteus tropicus*). *Fish Physiol Biochem* 42(2):517–528. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0156-4>
- Frías-Quintana CA, Márquez-Couturier G, Álvarez-González CA, Tovar-Ramírez D, Nolasco-Soria H, Galaviz-Espinosa MA, Gisbert E et al (2015b). Development of digestive tract and enzyme activities during the early ontogeny of the tropical gar *Atractosteus tropicus*. *Fish Physiol Biochem* 41(5):1075–1091. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0070-9>
- Galaviz MA, García-Ortega A, Gisbert E, López LM, & García Gasca A (2012). Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Comp Biochem Physiol B* 161(1):9–16. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.09.001>
- Galaviz MA, López LM, García Gasca A, Álvarez González CA, True CD, & Gisbert, E. (2015). Digestive system development and study of acid and alkaline protease digestive capacities using biochemical and molecular approaches in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larvae. *Fish Physiol Biochem* 41(5):1117–1130. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0073-6>
- García-Gasca A, Galaviz MA, Gutiérrez JN, & García-Ortega A (2006). Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Aquaculture* 251:366–376. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.05.029>
- Gawlicka AK & Horn MH (2006). Trypsin Gene Expression by Quantitative In Situ Hybridization in Carnivorous and Herbivorous Prickleback Fishes (Teleostei: Stichaeidae): Ontogenetic, Dietary, and Phylogenetic Effects. *Physiol Biochem Zool* 79(1): 120–132. <https://doi.org/10.1086/498289>
- Guerrero-Zarate R, Álvarez-González CA, Olvera-Novoa MA, Perales-García N, Frías-Quintana CA, Martínez-García R, & Contreras-Sánchez WM (2014). Partial characterization of digestive proteases in tropical gar *Atractosteus tropicus* juveniles. *Fish Physiol Biochem* 40(4):1021–1029. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9902-7>
- Hirota M, Ohmuraya M, & Baba H (2006). The role of trypsin, trypsin inhibitor, and trypsin receptor in the onset and aggravation of pancreatitis. *J Gastroenterol* 41:832–836. <https://doi.org/10.1007/s00535-006-1874-2>

- Kishimura H, Hayashi K, Miyashita Y, & Nonami Y (2006). Characteristics of trypsins from the viscera of true sardine (*Sardinops melanostictus*) and the pyloric ceca of arabesque greenling (*Pleuroprammus azonus*). *Food Chem* 97(1): 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.008>
- Klomklao S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H, & Simpson BK (2007). Purification and characterisation of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chem* 100(4):1580–1589. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.001>
- Kolkovski S (2001). Digestive enzymes in fish larvae and juveniles — implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200(1–2):181–201. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00700-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00700-1)
- Koshikawa N, Hasegawa S, Nagashima Y, Mitsuhashi K, Tsubota Y, Miyata S, Miyazaki, K et al (1998). Expression of Trypsin by Epithelial Cells of Various Tissues, Leukocytes, and Neurons in Human and Mouse. *Am J Pathol* 153(3):937–944. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65635-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65635-0)
- Kurokawa T, Suzuki, T, Ohta H, Kagawa H, & Tanaka H (2002). Expression of pancreatic enzyme genes during the early larval stage of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish Sci* 68:736–744. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2002.00487.x>
- Lilleeng E, Froystad MK, Ostby GC, Valen EC, & Krogdahl A (2007). Effects of diets containing soybean meal on trypsin mRNA expression and activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Comp Biochem Physiol A* 147:25–36. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.10.043>
- Liu CH, Chen YH, & Shiu YL (2013). Molecular characterization of two trypsinogens in the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, and their expression in tissues during early development. *Fish Physiol Biochem* 39:201–214. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9691-4>
- Liu CH, Shiu YL, & Jue-Liang H (2012). Purification and characterization of trypsin from the pyloric ceca of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish Physiol Biochem* 38:837–848. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9571-3>
- Lo MJ, & Weng CF (2006). Developmental regulation of gastric pepsin and pancreatic serine protease in larvae of the euryhaline teleost, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture* 261:1403–1412. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.016>
- Lu BJ, Zhou LG, Cai QF, Hara K, Maeda A, Su WJ, & Cao MJ (2008). Purification and characterisation of trypsins from the pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Food Chem* 110(2):352–360. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.010>
- Manchado M, Infante C, Asensio E, Crespo A, Zuasti E, & José Pedro C. (2008). Molecular characterization and gene expression of six trypsinogens in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup) during larval development and in tissues. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 149:334–344. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.10.005>
- Márquez-Couturier G, & Vásquez-Navarrete CJ (2015a). Empoderamiento de las organizaciones sociales en el cultivo de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) en el sureste de México. *Agroproductividad* 8(3): 38–43.

- Márquez-Couturier G, & Vázquez-Navarrete CJ (2015b). Estado de arte de la biología y cultivo de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). *Agroproductividad* 8(3):44–51.
- Márquez-Couturier G, Vázquez-Navarrete CJ, Contreras-Sánchez WM, & Álvarez-González CA (2015c). *Acuicultura tropical sustentable: Una estrategia para la producción y conservación del pejelagarto (Atractosteus tropicus) en Tabasco, México* (Segunda Ed). Villahermosa.
- Martin SA, Caplice NC, Davey GC, & Powell R (2002). EST-based identification of genes expressed in the liver of adult Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Biochem Biophys Res Commun* 293:578–585. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00263-2](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00263-2)
- Mendoza R, Aguilera C, Rodríguez G, González M, & Castro R (2002). Morphophysiological studies on alligator gar (*Atractosteus spatula*) larval development as a basis for their culture and repopulation of their natural habitats. *Rev Fish Biol Fish* 12:133–142. [https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1025047914814](https://doi.org/10.1023/A:1025047914814)
- Mendoza-Alfaro R, Aguilera-González C, & Ferrara AM (2008). Gar biology and culture: Status and prospects. *Aquac Res* 39:748–763. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01927.x>
- Moyano FJ, Díaz M, Alarcón FJ, & Sarasquete MC (1996). Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol Biochem* 15(2): 121–130. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01875591](https://doi.org/10.1007/BF01875591)
- Murashita K, Furuita H, Matsunari H, Yamamoto T, Awaji M, Nomura K, Tanaka H et al. (2013). Partial characterization and ontogenetic development of pancreatic digestive enzymes in Japanese eel *Anguilla japonica* larvae. *Fish Physiol Biochem* 39:895–905. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9749-3>
- Murray HM, Gallant JW, Johnson SC, & Douglas SE (2006). Cloning and expression analysis of three digestive enzymes from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) during early development: Predicting gastrointestinal functionality. *Aquaculture* 252: 394–408. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.030>
- Murray HM, Pérez-Casanova JC, Gallant, JW, Johnson SC, & Douglas SE (2004). Trypsinogen expression during the development of the exocrine pancreas in winter flounder (*Pleuronectes americanus*). *Comp Biochem Physiol A* 138:53–59. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.02.020>
- Péres A, Zambonino Infante JL, & Cahu C (1998). Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol Biochem* 19:145–152. [https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1007775501340](https://doi.org/10.1023/A:1007775501340)
- Perez-Casanova, JC, Murray HM, Gallant, JW, Ross NW, Douglas SE, & Johnson SC. (2006). Development of the digestive capacity in larvae of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 251:377–401. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.06.007>
- Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): 2002–2007. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Raraty M, Ward J, Erdemli G, Vaillant C, Neoptolemos JP, Sutton R, & Petersen OH (2000). Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical

- granular region of pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(24):13126–13131.
- Rønnestad I, Yúfera M, Ueberschär B, Ribeiro L, Saele Ø, & Boglione C (2013). Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. *Rev Aquac* 5(1):559–598. <https://doi.org/10.1111/raq.12010>
- Ruan GL, Li Y, Gao ZX, Wang HL, & Wang WM (2010). Molecular characterization of trypsinogens and development of trypsinogen gene expression and tryptic activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and topmouth culter (*Culter alburnus*). *Comp Biochem Physiol B* 155(1):77–85. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.10.005>
- Rungruangsak-Torrissen K (2012). Trypsin and its implementations for growth, maturation, and dietary quality assessment. In W. Kirk & K. Clayton (Eds.), *Trypsin: Structure, Biosynthesis and Functions* (pp. 1–59). Nova Science Publishers, Inc. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/230640208>
- Rungruangsak-Torrissen K, & Sundby A (2000). Protease activities, plasma free amino acids and insulin at different ages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with genetically different trypsin isozymes. *Fish Physiol Biochem* 22:337–347. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1007864413112>
- Rungruangsak-Torrissen K, Moss R, Andresen LH, Berg A, & Waagbø R (2006). Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol Biochem* 32(1):7–23. <https://doi.org/10.1007/s10695-005-0630-5>
- Sanz F (2009). *La nutrición y alimentación en piscicultura*. Madrid: Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Retrieved from <http://www.observatorio-acuicultura.es/recursos/publicaciones/la-nutricion-y-alimentacion-en-piscicultura>
- Sastre J, Sabater L, & Aparisi L (2005). Fisiología de la secreción pancreática. *Gastroenterol Hepatol* 28(Supl 2): 3–9. Retrieved from www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-pdf-13071380-S300
- Sunde J, Eiane SA, Rustad A, Jensen HB, Opstvedt J, Nygård E, Rungruangsak-Torrissen K et al. (2004). Effect of fish feed processing conditions on digestive protease activities, free amino acid pools, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac Nutr* 10:261–277. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00300.x>
- Suzuki T, Srivastava AS, & Kurokawa T (2002). cDNA cloning and phylogenetic analysis of pancreatic serine proteases from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comp Biochem Physiol B* 131:63–70. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00487-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00487-0)
- Thrower EC, Diaz De Villalvilla, APE, Kolodecik, TR, & Gorelick FS (2006). Zymogen activation in a reconstituted pancreatic acinar cell system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(5):1–25. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00373.2005>. Zymogen
- Wang C, Xie S, Zhu X, Lei W, Yang Y, & Liu J (2006). Effects of age and dietary protein level on digestive enzyme activity and gene expression of *Pelteobagrus fulvidraco* larvae, 254:554–562. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.036>

- Zambonino Infante JL, & Cahu CL (2007). Dietary modulation of some digestive enzymes and Metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. *Aquaculture*, 268:98–105. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.032>
- Zambonino-Infante JL, Gisbert E, Sarasquete C, Navarro I, Gutiérrez J, & Cahu, CL (2008). Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In J. E. P. Cyrino, D. P. Bureau, & B. G. Kapoor (Eds.), *Feeding and Digestive Functions of Fishes* (1st ed., pp. 281–348). Enfield, N.H. : Science Publishers, 2008. Retrieved from <http://archimer.ifremer.fr/doc/00086/19684/>
- Zhou LZ, Ruan MM, Cai QF, Liu GM, Sun, LC, Su WJ, & Cao MJ (2012). Purification, characterization and cDNA cloning of a trypsin from the hepatopancreas of snakehead (*Channa argus*). *Comp Biochem Physiol B* 161(3):247–254. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.11.012>

México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación y RT-PCR y qPCR en *A. tropicus*.

Primer	Primer sentido (5'-3')	Primer antisentido (5'-3')	Tamaño, pb	Paso
TRIPSINA	TGTCTGCTGCTCACTGCTACA	AGGACACAACACCCTGCA	465	RT-PCR
EF1- α	CCTGCAGGACGTCTACAAGATCG	GACCTCAGTGGTCACGTTGGA	120	q-PCR
TRIPSINA	AGCACAACATCGCTGTCAAC	CTTCCAGAGCTGCTGGTGT	232	q-PCR

Pie de tabla

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación y RT-PCR y qPCR en *A. tropicus*.

Pie de figura

Fig. 1 Secuencia parcial de nucleótidos de TRY en *A. tropicus*

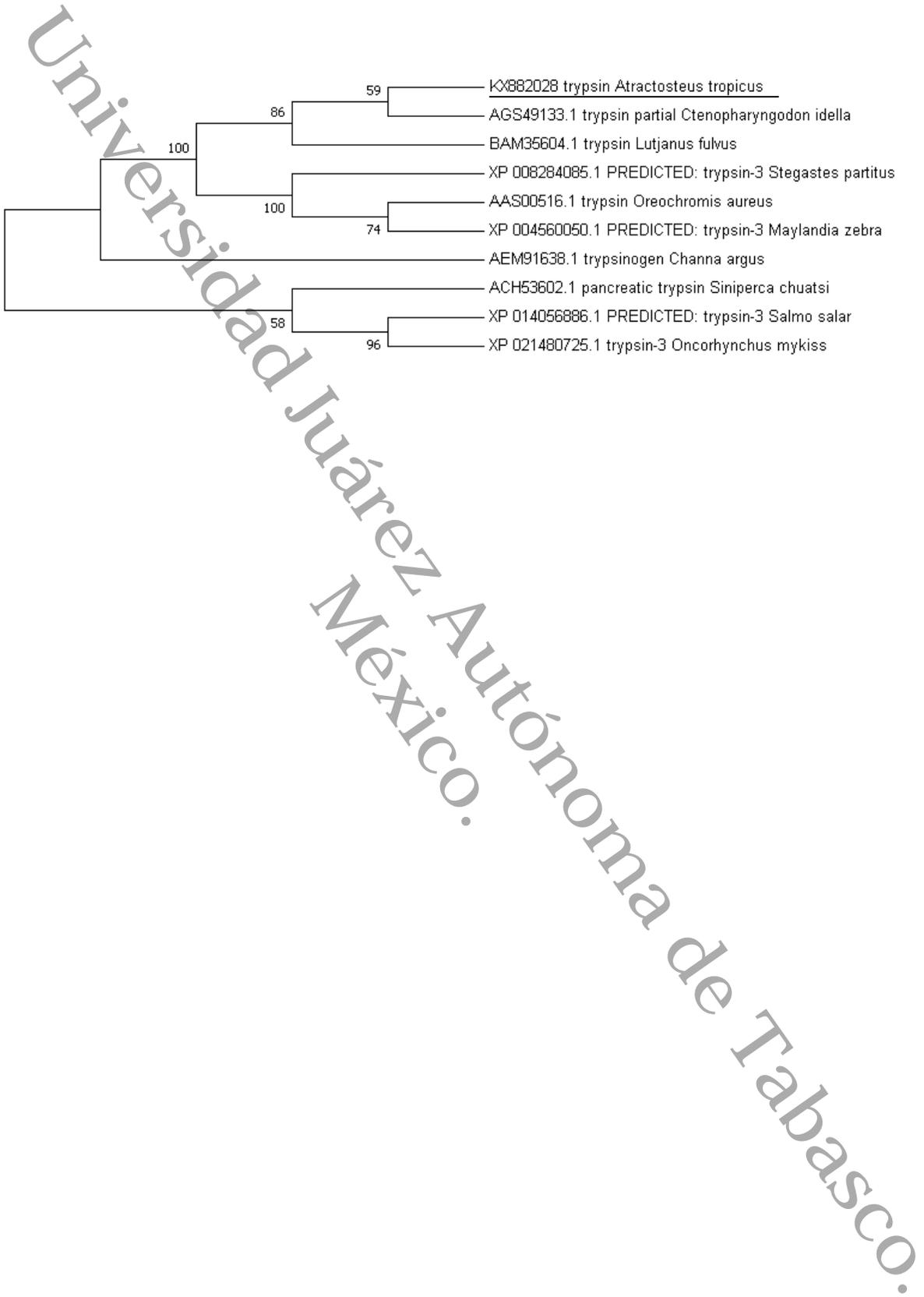
Fig. 2 Árbol filogenético basado en las secuencias de proteínas de TRY de *Atractosteus tropicus* y de otras especies de vertebrados usando el método de neighbor-joining (NJ). Los valores en los puntos de branch representaron las frecuencias porcentuales para la topología de árbol después de 1000 interacciones

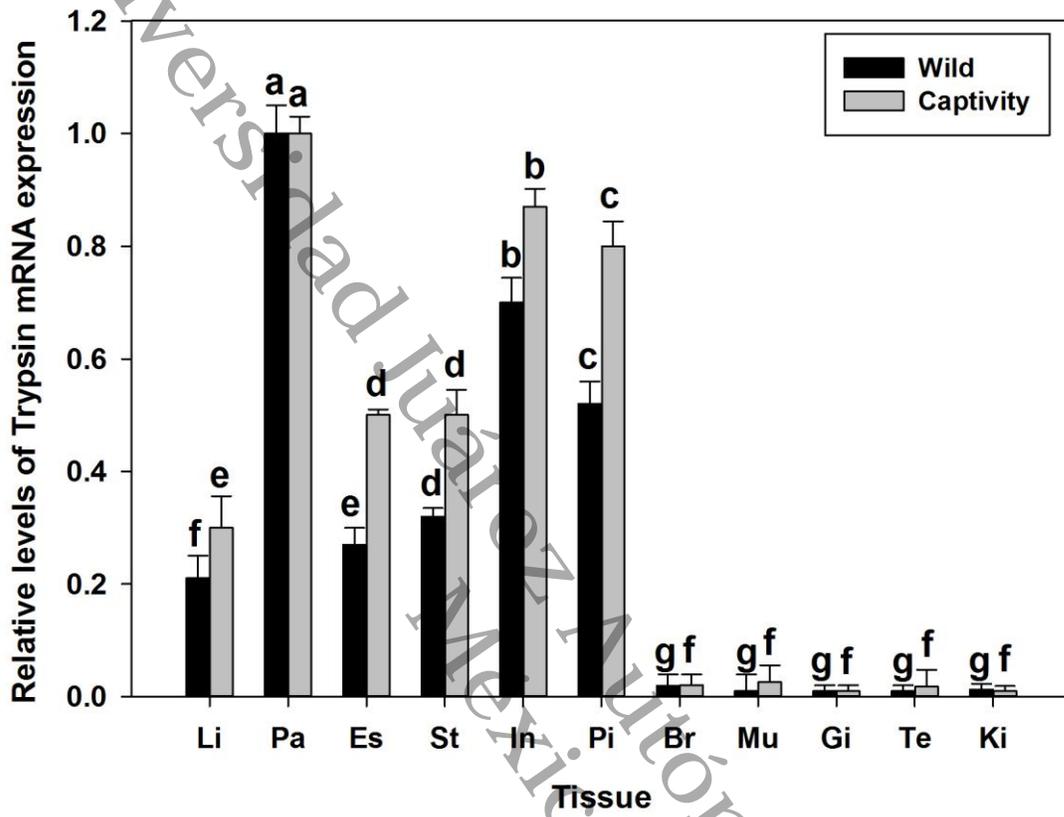
Fig. 3 Expresión relativa de TRY en tejido de hígado (Li), páncreas (Pa), esófago (Es), estómago (St), intestino (In), ciegos pilóricos (Pi), cerebro (Br), músculo (Mu), branquia (Gi), testículos (Te) y riñón (Ki) de adultos de *A. tropicus*

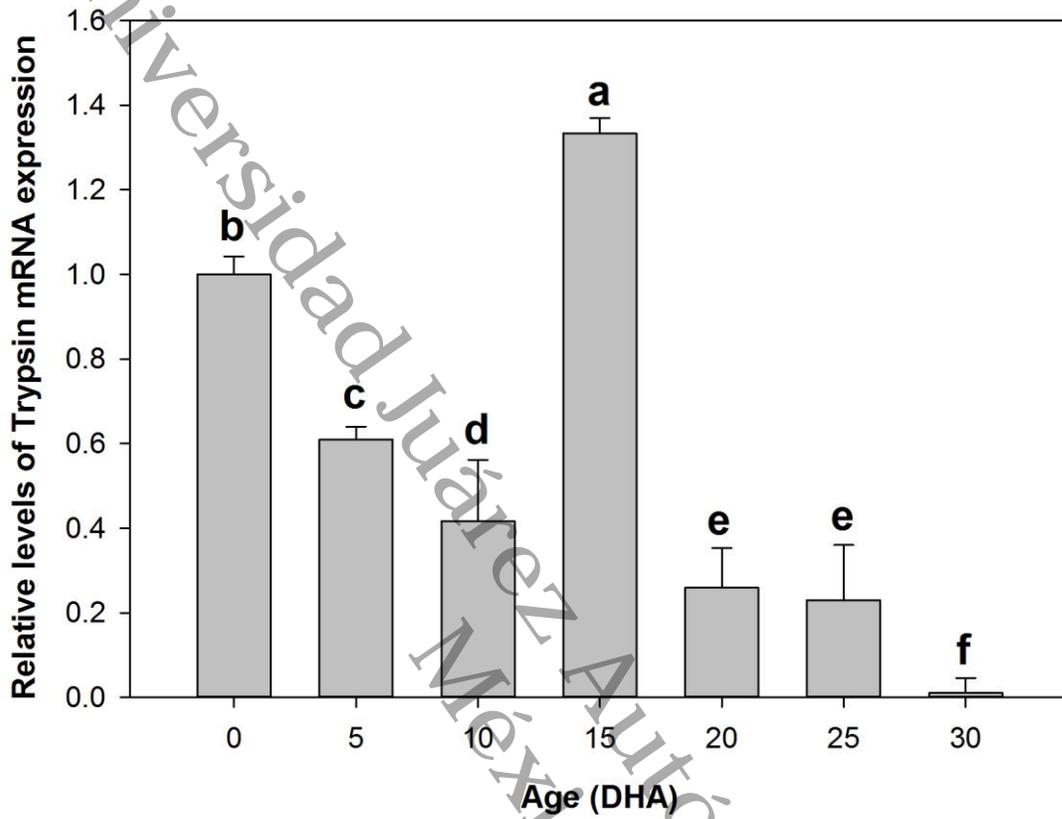
Fig. 4 Expresión relativa de TRY en *A. tropicus*

ctgctasaagtcccgcgtccaggtgcgtccttggtg**agcacaacatcgctgtcaac**gagggc
C Y K S R V Q V R L G E H N I A V N E G
acagagcagttcatcaactctgccaaggtcatccgtcaccacagatacagcagccgcaac
T E Q F I N S A K V I R H P R Y S S R N
ctggacaatcacatcatgatgatcaagctgagcaagaacgccaccctgaacaaccacgtc
L D N H I M M I K L S K N A T L N N H V
cgcaccgtttcccttcacatccagctgcgccagctctggcgcccgctgtctgatctctgga
R T V S L P S S C A S S G A R C L I S G
tggggc**aacaccagcagctctggaag**caactaccgggacaacctgaggtgtctggatgtc
W G N T S S S G S N Y R D N L R C L D V
cccatcctgagcgcagcagctgcaggagctcctaccctggacagatcacctccaacatg
P I L S D S S G R S S Y P G Q I T S N M
ttctgtgctggattcctcgaggaggcaaggactcctgccagggtgactctgtgtctc
F C A G F L E G G K D S C Q G D S V S

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.







Villahermosa, Tabasco a 29 de Mayo de 2018

M.A.E.E. CAROLINA GONZÁLEZ CONSTANTINO
DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES
PRESENTE

Hago de su conocimiento que el artículo enviado a la revista FISH PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, como requisito para la titulación de la alumna Kristal de María Jesús de la Cruz del Doctorado en Ciencias en Ecología y Manejo de Sistemas Tropicales y que tiene como nombre "Expresión de tripsina en adultos y larvas de *Atractosteus tropicus*" tiene como autores de la siguiente forma:

Primer Autor: Kristal de María Jesús de la Cruz

Segundo Autor: Carlos Alfonso Álvarez González

Tercer Autor: Ángela Ávila Fernández

Cuarto Autor: Dariel Tovar Ramírez

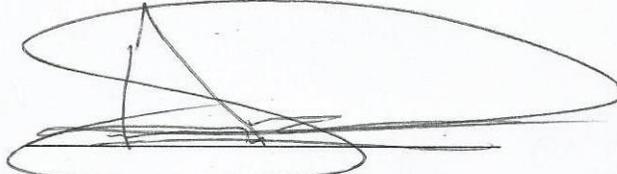
Quinto Autor: Luis Daniel Jiménez Martínez

Sexto Autor: Emyr Saúl Peña Marín

Así mismo un servidor funge como autor de correspondencia.

Sin más por el momento me despido de usted con un afectuoso saludo.

Atentamente



Dr. Carlos Alfonso Álvarez González

c.c.p. interesado

5.2 CAPÍTULO II:

Fish trypsins: Potential applications in biomedicine and prospects for production

Publicado

Jesús de la Cruz, K. de M., Álvarez González, C. A., Peña, E., Contreras Morales, J. A., & Ávila Fernández, Á. (2018). Fish trypsins: potential applications in biomedicine and prospects for production. *3 Biotech*, 8(186), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1208-0>



Fish trypsins: potential applications in biomedicine and prospects for production

Kristal Jesús-de la Cruz¹ · Carlos Alfonso Álvarez-González¹ · Emyr Peña^{1,3} · José Antonio Morales-Contreras² · Ángela Ávila-Fernández²

Received: 29 July 2017 / Accepted: 9 March 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

In fishes, trypsins are adapted to different environmental conditions, and the biochemical and kinetic properties of a broad variety of native isoforms have been studied. Proteolytic enzymes remain in high demand in the detergent, food, and feed industries; however, our analysis of the literature showed that, in the last decade, some fish trypsins have been studied for the synthesis of industrial peptides and for specific biomedical uses as antipathogenic agents against viruses and bacteria, which have been recently patented. In addition, innovative strategies of trypsin administration have been studied to ensure that trypsins retain their properties until they exert their action. Biomedical uses require the production of high-quality enzymes. In this context, the production of recombinant trypsins is an alternative. For this purpose, *E. coli*-based systems have been tested for the production of fish trypsins; however, *P. pastoris*-based systems also seem to show great potential in the production of fish trypsins with higher production quality. On the other hand, there is a lack of information regarding the specific structures, biochemical and kinetic properties, and characteristics of trypsins produced using heterologous systems. This review describes the potential uses of fish trypsins in biomedicine and the enzymatic and structural properties of native and recombinant fish trypsins obtained to date, outlining some prospects for their study.

Keywords Fish trypsins · Recombinant enzymes · Aquaculture · Trypsin applications · Trypsin structure

Introduction

Potential applications of fish trypsins in biomedicine

Features of fish trypsins from different species and their potential applications in different kinds of industries have been widely reported. The applications of fish trypsins include the following: as ingredients in detergents (Espósito

et al. 2009, 2010; Jellouli et al. 2009; Ktari et al. 2012; Nasri et al. 2012; Younes et al. 2015; Bkhairia et al. 2016), in the extraction of carotenoproteins from shrimp waste (Simpson et al. 1992; Klomklao et al. 2009a; Sila et al. 2012; Younes et al. 2015; Poonsin et al. 2017), in the production of protein hydrolysates as food ingredients (Kristinsson and Rasco 2000; He et al. 2013; Tavano 2013; Ketnawa et al. 2016; Villamil et al. 2017), and various applications in the food industry (Bougatef et al. 2007; Balti et al. 2009; Freitas et al. 2012).

The cold-adapted trypsin of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) has been proposed as an alternative to bovine trypsin in the synthesis of industrial peptides as its catalytic efficiency is 35 times greater than that of bovine trypsin (Fuchise et al. 2011). Both natural peptides and their synthetic analogues have interesting biological properties (stability, potency of action, biological specificity, etc.) and are useful in different fields as therapeutic agents, synthetic analogues of peptide hormones, and in pharmacological applications, among others (Korhonen and Pihlanto 2006).

✉ Ángela Ávila-Fernández
angela.avila@ujat.mx

¹ Laboratorio de Acuacultura, DACBiol-UJAT, Carr. Villahermosa-Cárdenas Km 0.5, 86139 Villahermosa, Tabasco, México

² Centro de Investigación, DACS-Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Av. Gregorio Méndez No. 2838-A. Col. Tamulté, 86150 Villahermosa, Tabasco, México

³ Cátedra Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-UJAT, Villahermosa, Tabasco, México

A potential application for fish trypsins is as an antipathogenic agent. In *in vitro* assays, the trypsin of Atlantic cod (*Gadus morhua*) has shown a high antipathogenic efficacy against HSV-1 and respiratory syncytial virus (RSV), the two most prevalent pathogenic viruses in upper respiratory tract infections. In addition, *in vivo* assays have shown favorable results using Atlantic cod trypsin in formulations to heal wounds. In both cases, the high digestive capacity of the enzyme plays an important role in its effectiveness against pathogens. Furthermore, this enzyme was 3–12 times more effective in the degradation of large native proteins than bovine trypsin (Gudmundsdóttir et al. 2013). The trypsin from Atlantic cod has been proposed for the development of cosmetics and medicines and six patents related to its production and use for the prevention and treatment of diseases has been registered. Since these enzymes inactivate bacterial enterotoxins, inflammatory cytokines, and cell-surface receptors involved in cell adhesion, their therapeutic use as a topical agent against pain, acute and chronic inflammation, rheumatic and autoimmune diseases, allergies, microbial infections, dermatopathies, and dental plaque remover has been described in the patent WO2000078332A2 (Bjarnason 2000). In 2015, their use was extended as adjuvant in the prevention and treatment of microbial infections in people with an immunodeficiency and patented as a novel treatment (Clarsund and Blom 2015). In addition, novel trypsin isoforms called ZT have been described and patented. These isoforms preferentially hydrolyze Arg residues and are more efficient to cleave peptides that contain consecutive basic amino acid residues (Arg/Lys), which are frequently found in proteins involved in the pathogenicity of viruses, parasites and bacteria (Gudmundsdóttir et al. 2017). Finally, a synergistic effect of Atlantic cod trypsin and conventional antibiotics for prevention, inhibition, and removal of bacterial biofilm in patients with recurrent and nosocomial infections has been described as a result of the ability of the trypsins to weaken the biofilm and allow the antibiotics to exert their function on bacteria (Gudmundsdóttir and Scheving 2017; Gudmundsdóttir et al. 2015).

Recently, innovative strategies of trypsin administration have been studied to ensure that trypsins retain their properties until they exert their action. To achieve this, trypsin was nano-encapsulated with chitosan and supplied to *Labeo rohita*, which led to an increase in the efficiencies of productive fish compared to the control fed with unencapsulated trypsin. A similar administration in humans could contribute to the treatment of some health disorders related to the deficiency of pancreatic enzymes, and in animals, this administration strategy could facilitate the digestion of feeds based on vegetable proteins (Kumari et al. 2013).

Sources and enzymatic properties of native fish trypsins

Fish trypsins are currently obtained from pyloric caeca (Kurtovic et al. 2006; Pálsdóttir and Gudmundsdóttir 2008; Khantaphant and Benjakul 2010; Freitas-Júnior et al. 2012), viscera (Klomklao et al. 2011; Sila et al. 2012) and intestines (Souza et al. 2007; Jellouli et al. 2009; Unajak et al. 2012). However, the process of obtaining the enzymes involves several constraints, such as (a) seasonal availability of raw materials (Simpson et al. 1992; Bougatef 2013); (b) heterogeneity in yield and/or enzymatic activity due to the nutritional status of the species and the degradation of tissues used as raw material (Simpson et al. 1992; Espósito et al. 2010); (c) production costs (Espósito et al. 2009; Bougatef 2013); and (d) low yields associated with the purification processes used. In addition, several steps are required for purification; for example, the use of affinity chromatography (Marcuschi et al. 2010; Fuchise et al. 2011), ion-exchange chromatography (Khngembam and Chakrabarti 2015; Bkhairia et al. 2016), and/or gel filtration (Bougatef et al. 2007; Silva et al. 2011; Costa et al. 2013) are usually employed; however, an optimal methodology has not been established and novel purification methods such as the use of ferromagnetic particles and the partitioning in aqueous two-phase system (ATPS) are being studied. The first one achieved about 60 times of purification from the crude extract, in a single step of purification (Menezes Estevam Alves et al. 2017; Poonsin et al. 2017).

The biochemical and kinetic properties of several native fish trypsins of different species have been reviewed by Bougatef (2013). In this context, the molecular weight of the enzymes reported was in the range of 22–30 kDa, while the optimum temperature was between 40 and 65 °C and the optimum pH was in the range of 8–11. The trypsins have esterase and amidase activity; in both cases, the mechanism involves the transfer of the acyl group to water. On their natural substrate, the trypsins catalyze the hydrolysis of peptide bonds at the carboxyl side of the lysine or arginine residues. Therefore, the most common substrates used for the kinetic characterization of fish trypsins are synthetic arginine substrates as *N*- α -benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) and *N*- α -tosyl-L-arginine methyl ester (TAME), which are used to measure amidase and esterase activity, respectively. However, some alternative substrates, such as, carbobenzoxy-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (*z*-FR-MCA), casein, and azocasein have been used. The kinetic properties of the enzymes are analyzed in terms of K_m , the affinity of the enzyme for the substrate; k_{cat} , the number of substrate molecules that each enzyme converts per unit time; and k_{cat}/K_m .

the rate of the reaction at negligible substrate concentration commonly named the catalytic efficiency. In the fish trypsin reviewed by Bougatef (2013), the K_m on the BAPNA substrate varies in the range of 0.068–1.67 mM, while the catalytic efficiency ($k_{cat} K_m^{-1}$) varies in the range of 2.3–40.58 $s^{-1} mM^{-1}$. The highest affinity and catalytic efficiency were found for the trypsin from grey triggerfish (0.068 mM and 40.58 $s^{-1} mM^{-1}$, respectively) (Bougatef 2013).

In the last 12 years, some other native fish trypsin have been characterized and are summarized in Table 1. BAPNA and TAME remain the preferred substrates for the enzymatic characterization; however, alternative synthetic substrates, such as t-butyloxy-carbonyl-Phe-Ser-Arg-4-methyl-coumaryl-7-amide (Boc-Phe-Ser-Arg-MCA), *N*-benzoyl-L-arginine ethyl ester HCl (BAEE), and benzoyloxycarbonyl-L-Phe-L-Arg-*p*-nitroanilide (CBZ-FR-pNA) and benzoyloxycarbonyl-Gly-Pro-Arg *p*-nitroanilide acetate salt (CBZ-GPR-pNA), have been recently assayed (Liu et al. 2007; Lu et al. 2008; Cai et al. 2011; Stefansson et al. 2017). These fluorogenic substrates facilitate the quantification of enzymatic activity; however, it is unknown whether the features observed using these synthetic substrates resemble those that would be obtained using natural substrates.

The optimal temperature of trypsin from cold-zone fishes, such as Pacific cod (*G. macrocephalus*), saffron cod (*Eleginus gracilis*), walleye pollock (*Theragra chalcogramma*), and arabesque greenling (*Pleurogrammus azonus*), is, in general, around 50 °C, while the optimal temperature of temperate-zone fish trypsin, such as those obtained from jacobever (*Sebastes schlegelii*), spotted mackerel (*Scomber australasicus*), true sardine (*Sardinops melanostictus*), yellow tail (*Seriola quinqueradiata*), and Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*), is slightly higher (60 °C). The optimal temperature of the temperate-zone trypsin is similar to those of tropical fish trypsin from Nile tilapia (*O. niloticus*), Atlantic bonito (*Sarda sarda*), skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), bluefish (*Pomatomus saltatrix*), tongol tuna (*Thunnus tonggol*), and yellowfin tuna (*Thunnus albacores*), which have an optimal temperature of 55–65 °C (Kishimura et al. 2005, 2006b, c, 2007, Klomklao et al. 2006a, b, 2007a); some of these are reported in Table 1 and the others have been summarized by Bougatef (2013). Even though the optimal temperatures for cold-zone fish trypsin are high compared to the temperatures in which these organisms live (Kishimura et al. 2008), their thermal stabilities are lower and, in general, are less than 40 °C. Interestingly, the fish trypsin with the highest optimal temperature (80 °C) belongs to the Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*), a cold-zone fish, and its temperature stability drops to 60 °C (Desrosiers et al. 2008). Cold-adapted fishes have been found some trypsin isoforms that work at high temperature and are classified within the mesophilic group. Another example is the

cationic salmon (*Salmo salar*) trypsin isoform (PDB: 1A0J) (Schröder et al. 1998; Gorfe et al. 2000). On the other hand, the trypsin I proteins of the cold-zone fishes Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Atlantic cod (*G. morhua*) have low thermal stability compared to bovine trypsin (Smalas et al. 1994; Outzen et al. 1996; Stefansson et al. 2010) and the skipjack tuna trypsin have lower stabilities than porcine trypsin. Studies have suggested the presence of stronger hydrophobic interactions that stabilize the structure and contribute to the increased stabilities of the enzymes (Klomklao et al. 2009b).

In general, fish trypsin have an optimal pH in the range of 7–11 and are stable at alkaline pH (7–9), but their stability decreases in acidic pH (less than 6) (Khandagale et al. 2017; Bougatef et al. 2010). However, some fish trypsin are stable over a wider pH range, such is the case of the Tunisian barbel (*Barbus callensis*) and striped seabream (*Lithognathus mormyrus*) trypsin that preserve above 90% of the enzymatic activity in a pH range of 5–12 (Sila et al. 2012; Elhadj-Ali et al. 2009); the zebra blenny trypsin (*Salaria basilisca*) that conserves 100% of the enzymatic activity in a pH range of 7.0–12.0; and the trypsin of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*) and Bogue (*Boops boops*) that conserve above 70% of the enzymatic activity in a pH range of 6–11 (Ktari et al. 2012; Klomklao et al. 2009c; Barkia et al. 2010). In all of them, the stability test was carried out at 40 °C for 1 h. It has been proposed that the pH stability is related to the charge that the enzyme acquires at different pH values. In particular, the acidic conditions lead to a conformational change in the active site that cause an effect on substrate affinity, weakening the binding of the substrate to the active site, which is observed as low activity (Castillo-Yáñez et al. 2005; Bougatef et al. 2010; Klomklao et al. 2006b). This agrees with the biological activity of the enzyme, since trypsin is released in the small intestine, which has an alkaline environment, to carry out the hydrolysis of its specific substrates.

Some authors have mentioned that psychrophilic trypsin have higher catalytic efficiency than mesophilic ones, which could be due to the distribution of charged residues that favors a higher affinity towards the substrate (Smalas et al. 1994) or the structural flexibility that these enzymes have acquired as a result of the cold adaptation (Gudmundsdóttir et al. 2013). However, results are not consistent to this regard, as previously mentioned by Bougatef (2013). As shown in Table 2, the highest catalytic efficiency of fish trypsin on the BAPNA substrate was reported in 2012 for the carp *Catla catla* trypsin (310.16 $s^{-1} mM^{-1}$), which are not considered a psychrophilic trypsin. In contrast, the typical cold-adapted Atlantic cod trypsin X had a catalytic efficiency about nine times lower (3.5 $s^{-1} mM^{-1}$) on the same substrate (Stefansson et al. 2017). On the other hand, higher catalytic efficiencies have been reported for trypsin on esterase substrates. For example, the highest catalytic

Table 1 Properties and kinetic constants of native fish trypsins

Species	Molecular weight (kDa)	Optimum temperature (°C)	pH	Substrate assayed	Km (mM)	Kcat (s ⁻¹)	kcat Km ⁻¹ (s ⁻¹ mM ⁻¹)	References
Oil sardine (<i>Sardinella longiceps</i>)	24	60	8	BAPNA	0.0206	1.19	57.76	Khandagale et al. (2017)
Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>) trypsin X-variant 7	25	65	8.5–11	BAPNA CBZ-FR-pNA CBZ-GPR-pNA	3.9 0.050 0.008	13.0 25.9 64.9	3.5 520 8210	Stefansson et al. (2017)
Golden grey mullet (<i>Liza aurata</i>)	23	50	10	BAPNA	0.43	4.04	9.39	Bkhairia et al. (2016)
<i>Lophosilurus alexandri</i>	24	50	9	BAPNA	0.517	5	9.67	Dos Santos et al. (2016)
Unicorn leatherjacket (<i>Aluterus monoceros</i>)	23.5	55	8	BAPNA	–	–	–	Zamani and Benjakul (2016)
<i>Cirrhinus mrigala</i>	21.7	30–40	7.6	BAPNA	0.0672	6.17	92.09	Khangembam and Chakrabarti (2015)
Thornback ray (<i>Raja clavata</i>)	–	50	8	CASEIN	–	–	–	Lassoued et al. (2015)
Scorpionfish (<i>Scorpaena scrofa</i>)	–	55	10	CASEIN	–	–	–	Younes et al. (2015)
Pacific saury (<i>Cololabis saira</i>)	24	55	8.5	TAME	0.19	210	1105	Klomklao et al. (2014)
Common killa (<i>Clupeonella cultriventris caspia</i>)	23.2	60	8	BAPNA TAME	0.10 0.07	7.93 28.5	79.3 407.1	Zamani et al. (2014)
Crevalle jack (<i>Caranx hippos</i>)	27.5	50	8	BAPNA	0.689	6.9	10	Costa et al. (2013)
Catshark (<i>Scyliorhinus canicula</i>)	28	55	8	BAPNA	0.104	0.23	2.21	Blanco et al. (2014)
Indian mackerel (<i>Rastrelliger kanagurta</i>)	26	50	9	BAPNA	0.430	0.77	1.78	Khandagale et al. (2013)
Sailfin Catfish (<i>Pterygoplichthys disjunctivus</i>)	27.5	40	9.5	BAPNA	0.13	1.46	11.24	Villalba-Villalba et al. (2013)
Nile Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) genetically improved	28	60	8	TAME	0.036	152	4242	Zhou et al. (2013)
Flatfish (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	29.6	70	7.5	BAPNA	0.017	0.024	1.422	Kim and Jeong (2013)
Carp (<i>Catla catla</i>)	20.2	40	7	BAPNA	0.062	19.23	310.16	Khangembam et al. (2012)

Table 1 (continued)

Species	Molecular weight (kDa)	Optimum temperature (°C)	pH	Substrate assayed	K _m (mM)	K _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} K _m ⁻¹ (s ⁻¹ mM ⁻¹)	References
Goby (<i>Zosterisessor ophiocephalus</i>)	23.2	60	9	BAPNA	0.312	2.03	6.51	Nasri et al. (2012)
Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i> L.)	22.39	55–60	9	BAPNA	0.16	23.8	238	Unajak et al. (2012)
Piracucu (<i>Arapaima gigas</i>)	28.0	65	9	BAPNA	0.47	1.33	2.82	Freitas-Júnior et al. (2012)
Tropical sierra (<i>Scomberomorus sierra</i>)	25.4	60	9	BAPNA	–	–	–	Valdez-Melchor et al. (2013)
Japanese sea bass (<i>Lateolabrax japonicus</i>)	21.0 (trypsin A) 21.5 (trypsin B)	40	9	Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	1.12 0.70	72.08 67.79	64.16 92.55	Cai et al. (2011)
Silver mojarra (<i>Diapterus rhombeus</i>)	26.5	50–55	8.5	BAPNA	0.266	0.93	3.48	Silva et al. (2011)
Hybrid catfish (<i>Clarias macrocephalus/Clarias gariepinus</i>)	24	60	8	TAME	0.30	92.1	307	Klomklao et al. (2011)
Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>)	24.0 (trypsin I)	–	8	CBZ-Gly-Pro-Arg-pNA	0.007	53.1	7590	Stefansson et al. (2010)
Smooth hound (<i>Mustelus mustelus</i>)	24	50	8.5	BAPNA TAME	0.387 0.156	2.62 59.15	6.77 379.16	Bougatef et al. (2010)
Skipjack tuna (<i>Katsuwonus pelamis</i>)	24	55 (trypsin A) 60 (trypsin B)	9	TAME	0.22 0.31	82.5 69.5	266.13 315.91	Klomklao et al. (2009b)
Pacific cod (<i>Gadus macrocephalus</i>)	24	50	8	TAME	–	–	–	Fuchise et al. (2009)
Saffron cod (<i>Eleginus gracilis</i>)	24	50	8	TAME	–	–	–	Fuchise et al. (2009)
Sardinelle (<i>Sardinella aurita</i>)	24	55	8	BAPNA	1.67	3.87	2.31	Ben Khaled et al. (2008)
Mandarin fish (<i>Siniperca chuatsi</i>)	21.0 (trypsin A) 21.5 (trypsin B)	35 (A) 40 (B)	8.5	Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	0.00218 0.00188	81.6 111.3	37431.19 59202.12	Lu et al. (2008)
Atlantic wolffish (<i>Anarhichas lupus</i>)	–	> 80	9	BAPNA	0.55 0.56	–	–	Desrosiers et al. (2008)
Walleye pollock (<i>Theragra chalcogramma</i>)	24	50	8	TAME	–	–	–	Kishimura et al. (2008)
Atlantic bonito (<i>Sarda sarda</i>)	29	65	9	BAPNA	–	–	–	Klomklao et al. (2007b)
Skipjack tuna (<i>Katsuwonus pelamis</i>)	24	60	8.5	TAME	0.29 (trypsin A) 0.20 (trypsin B) 0.11 (trypsin C)	114 61.5 57.1	393.10 307.50 519.09	Klomklao et al. (2007c)

Table 1 (continued)

Species	Molecular weight (kDa)	Optimum temperature (°C)	pH	Substrate assayed	K _m (mM)	K _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} K _m ⁻¹ (s ⁻¹ mM ⁻¹)	References
Grass carp (<i>Ctenopharyngodon idellus</i>)	30.7 (trypsin A)	38.5	8.0	BAEE	0.0212	33.3	1572.32	Liu et al. (2007)
	26.4 (trypsin B)	44.0	8.5		0.0317	55.0	1735.01	
Hoki fish (<i>Macruronus novaezelandiae</i>)	26	60	9	BAPNA	0.06	0.33	5.50	Shi et al. (2007)
				TAME	2.08	19.00	9.13	
Spotted goatfish (<i>Pseudupeneus maculatus</i>)	24.5	55	9	BAPNA	1.82	–	–	Souza et al. (2007)
True sardine (<i>Sardinops melanostictus</i>)	24	60	8	TAME	–	–	–	Kishimura et al. (2006a)
Arabesque greenling (<i>Pleurogrammus azonus</i>)	24	50	8	TAME	–	–	–	Kishimura et al. (2006a)
Monterey sardine (<i>Sardinops Sagax Caerulea</i>)	25	50	8	BAPNA	0.051	2.12	41.0	Castillo-Yáñez et al. (2005)
Anchoa (<i>Engraulis japonicus</i>)	24.5 (trypsin II)	60	9.5	BAEE	0.014	42.09	3006	Ahsan and Watabe (2001)
				BAPNA	0.033	3.70	112	
Anchoa (<i>Engraulis japonicus</i>)	24.5 (trypsin I)	60	9.5	BAEE	0.031	34.56	1114	Ahsan and Watabe (2001)
				BAPNA	0.037	1.94	52	

Table 2 Crystallographic structures of fish trypsins

Enzyme	Species	X-ray resolution (Å)	PDB code	References
Trypsin isoform 1	Chum Salmon (<i>Oncorhynchus keta</i>)	1.9	2ZPQ	Toyota et al. (2009)
Trypsin isoform 2		1.75	2ZPR	
Trypsin isoform 3		1.55	2ZPS	
Trypsin	Chum Salmon (<i>Oncorhynchus keta</i>)	1.8	1MBQ	Toyota et al. (2002)
Trypsin I	Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	1.83	1UTJ	Leiros et al. (2004)
		1.53	1UTK	
		1.7	1UTL	
		1.5	1UTM	
Trypsin I	Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	1.0	1HJ8	Leiros et al. (2001)
Anionic salmon trypsin in complex with squash seed inhibitor (<i>Cucurbita pepo</i> trypsin inhibitor II)	Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	1.8	2STB	Helland et al. (1999)
			2STA	
Anionic salmon trypsin in complex with squash seed inhibitor (<i>Cucurbita maxima</i> trypsin inhibitor I)				
Anionic salmon trypsin in complex with bovine pancreatic trypsin inhibitor	Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	2.1	1BZX	Helland et al. (1998)
Trypsin	Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	1.7	1A0J	Schröder et al. (1998)
Trypsin	Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	1.83	1BIT	Berglund et al. (1995)
Trypsin	Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	1.8	2TBS	Smalas et al. (1994)
Trypsin-I	Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>)	1.85	2EEK	Unpublished

efficiency for the Atlantic cod trypsin X using CBZ-GPR-pNA as a substrate was $8210 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (Stefansson et al. 2017), while that for the trypsin of the genetically improved Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) was $4242 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ using TAME as substrate (Zhou et al. 2013). The trypsins have higher esterase than amidase activity; therefore, assays on esterase substrates are more sensitive. However, unless the enzymes are characterized on a common substrate, it will be difficult to establish, which of the enzymes has the best characteristics and whether the kinetic properties of fish trypsins and their biochemical features are interrelated.

The inhibitors are widely used for the characterization and differentiation among the different kind of proteases. The phenyl-methyl-sulfonyl fluoride inhibitor (PMSF) identifies the serine proteases; however, it does not discriminate between trypsins, chymotrypsins, and elastases. For this reason, specific inhibitors such as tosyl-lysine-chloromethyl ketone (TLCK) and tryptic soy inhibitor (SBTI) are used for identifying trypsin activity (Klomklao et al. 2006b). On the other hand, metalloprotease inhibitors, such as EDTA, identify enzymes whose activity depends on some metallic ions. The effect of these inhibitors on native fish trypsins activity has been assayed at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ for 30 min. The 5 mM PMSE achieved an inhibition in the range of 31–81%, whereas the specific inhibitor for trypsin, SBTI 1 mg ml^{-1} , inhibited in the range of 72–100% (Khandagale et al. 2017; Bkhairia et al. 2016; Lassoued et al. 2015; Blanco et al. 2014). On the other hand, the EDTA achieved an inhibition in the range of 5–63.75% (Bkhairia et al. 2016; Khangembam and Chakrabarti 2015); however, the reaction conditions such as temperature and time of incubation and concentration of EDTA in the assays involving fish trypsins are heterogeneous.

The effect of metal ions, including Ca^{2+} , has been studied in numerous fish trypsins. Some authors suggest that the calcium-binding site in the fish trypsins has a stabilizing effect on the thermal denaturation and autolysis, probably because the Ca^{2+} increases the intramolecular interactions, binds to the autolysis sites, and results in a compact structure that favors optimal catalytic activity (Kim et al. 1994; Klomklao et al. 2004; Khangembam and Chakrabarti 2015; Blanco et al. 2014; Kishimura et al. 2007). This stabilizing effect has been observed in the true sardine (*S. melanostictus*), greenling arabesque (*P. azonus*) (Kishimura et al. 2006a), golden grey mullet (*Liza aurata*) (Bkhairia et al. 2016), and scorpionfish trypsin (*Scorpaena scrofa*) (Younes et al. 2015).

As has been reported, after the trypsinogen is proteolyzed to constitute the active form of the enzyme, the N-terminal of fish trypsins begins with seven conserved amino acid residues (IVGGYEC) (Bougatef 2013). Recently, some hypothetical sequences of fish trypsins, which have, in the N-terminal region, the conserved IIGG sequence instead of IVGG, have been reported in the database. Such is the

case of the anionic trypsin 2 of yellow croaker (*Larimichthys crocea*), the anionic trypsin 1 of the European seabass (*Dicentrarchus labrax*), the Trypsin-3-like of the dragonfish (*Scleropages formosus*), and the trypsin of spotted gar (*Lepisosteus oculatus*). Among the fish trypsins characterized, the Atlantic cod (*G. morhua*) recombinant trypsin is the only one with the IIGG sequence as N-terminal. The biochemical properties of this enzyme have been characterized; however, its kinetic properties are unknown (Palsdottir and Gudmundsdottir 2004). Interestingly, this enzyme has dual activity as trypsin and chymotrypsin. Therefore, it would be interesting to know if these characteristics are conserved in the enzymes that have the N-terminal region IIGG and if their kinetic properties are different from the other fish trypsins reported.

Structural features of fish trypsins

Most trypsins can be classified into three basic groups (I, II, and III) based on the identity in their amino acid sequences. The three groups share the catalytic triad of His, Asp, and Ser (Gudmundsdottir and Palsdottir 2005). To date, psychrophilic fish trypsins have shown high catalytic efficiency and high thermal sensitivity (Genicot et al. 1988; Smalas et al. 1994; Fuchise et al. 2011). In this context, Genicot et al. (1996) constructed a three-dimensional model of the trypsin from the Antarctic fish *Paranotothenia magellanica* to explain the structural parameters involved in the cold adaptation of this enzyme by comparing their model to the crystallographic structure of bovine trypsin. Some differences such as an increased hydrophilic surface, a consequently lower hydrophobicity, a decreased number of salt bridges, and an absence of Tyr residues in the substrate-binding pocket, among others, probably affect both the features and the flexibility of this enzyme (Genicot et al. 1996).

In the last 20 years, the crystallographic structures of fish trypsins, their isoforms and the complexes that fish trypsins form with their inhibitors have been reported and compared with the well-characterized structure of bovine trypsin (PDB: 1HJ9) to understand their reaction mechanisms and their affinities for certain substrates and to propose the reasons for their cold adaptation (Smalas et al. 1994; Gerday et al. 2000; Schröder Leiros et al. 2000). The crystallographic structures of fish trypsins reported to date are summarized in Table 2.

The first reported crystallographic structure of a fish trypsin was that of the native Atlantic salmon (*S. salar*) trypsin. This protein sequence has an identity of 65% with the bovine trypsin. This trypsin form (STIIA) comprised 222 residues, one less than bovine trypsin; the missing residue is a Tyr located in the autolysis loop, a region composed of approximately 11 residues, which is a relatively sensitive structure that is considered a primary autolysis target. The

six-disulfide bridges present in bovine trypsin are conserved in salmon trypsin; however, the distribution of charged residues is different. Electrostatic interactions are an important feature of the cold adaptation of the anionic form of salmon trypsin (Smålas et al. 1994). Other studies of trypsins from organisms adapted to a wide range of environments have revealed some general patterns of variations in sequence and structure that enable the enzymes to perform similar catalytic functions under different environmental conditions (Leiros et al. 2001; Toyota et al. 2002). Leiros et al. (2001) obtained two trypsin structures of the anionic form of salmon and assessed the structural damage caused by radiation during X-ray crystallography. Both trypsin structures had broken disulfide bonds, demonstrating the particular sensitivity of some trypsins to the high intensity of X-rays. Hence, experimental conditions that minimize the damage to the protein crystal are necessary. When the crystal structure of chum salmon trypsin (CST) was studied, the primary structure was found to differ by only seven residues from the Atlantic salmon anionic trypsin (AST). The most notable difference was the absence of the last two residues in the C-terminus of the CST; this probably increases the flexibility of the enzyme due to the loss of important interactions between the N- and C-terminal domains (Leiros et al. 2001).

Similarly, compared to bovine trypsin, the absence of a Tyr residue in the autolysis loop probably increases the accessibility of the substrate to the binding pocket, while an Lys residue contributes to stabilize the loop. The comparison of CST, AST, and bovine trypsin structures has contributed to the understanding of the structural basis for differences in enzymatic activity between the enzymes of cold-adapted fish species and mammals. The reasons for cold adaptation could be diverse. For example, high molecular flexibility could be a strategy to increase the specificity of the enzyme at low temperatures (Gerday et al. 2000; Schröder Leiros et al. 2000; Toyota et al. 2002).

Features of recombinant fish trypsins

Although fish trypsins can be obtained from natural sources, it is necessary to explore alternative sources to reduce production costs and due to the limitations mentioned above, particularly for the use of these enzymes in the food industry, in cosmetics and in biomedicine (Espósito et al. 2009; Bougateg 2013; Fornbacke and Clarsund 2013; Gudmundsdóttir et al. 2013). The production of recombinant trypsins is an alternative that offers some advantages: (a) this method is independent of the seasonality of the raw materials, (b) recombinant trypsins can be obtained using a controlled system that can be optimized to increase production yields, and (c) some purification strategies specifically designed for recombinant protein production systems can be used. To date, there has been little in-depth research on the feasibility

of producing fish trypsins in heterologous systems. Some recombinant fish trypsins have been obtained using protein expression systems based on *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* and are summarized in Table 3. The precursor form of Atlantic cod trypsin I was produced in soluble form as a thioredoxin fusion protein linked to the trypsin zymogen in the His-Patch ThioFusion *E. coli* expression system, and the active recombinant trypsin was obtained by cleavage of the purified fusion protein using a small amount of native trypsin I. The active enzyme was obtained at a low yield, probably due to poor folding of the enzyme or due to problems with autolysis during the excision of thioredoxin and the precursor form of recombinant trypsin I. However, the amount of enzyme obtained was enough to characterize the enzyme (Jónsdóttir et al. 2004). On the other hand, trypsinogen from *E. japonicus* was initially produced using the pETBlue-1 vector in the *E. coli* strain Tuner (DE3) pLacI. Preliminary assays showed a very low expression level in this strain even after optimization of the experimental conditions; however, when the plasmid was expressed in a different strain [Rosetta (DE3) pLacI], an increase was observed in the amount of enzyme obtained (Ahsan et al. 2005). Another fish trypsin that was successfully produced in *E. coli* was the trypsin Y of *G. morhua* (Pálsdóttir and Gudmundsdóttir 2007). This enzyme has been previously produced in the yeast *P. pastoris* system with satisfactory results (Pálsdóttir and Gudmundsdóttir 2004); however, this system could not be used to produce Trypsin I of Atlantic cod due to unsuccessful enzyme purification and activation (Jónsdóttir et al. 2004). On the other hand, the trypsin of cunner (*Tautoglabrus adspersus*) produced in *P. pastoris* was active, although a low yield was obtained. The molecular weight (45 kDa) of the enzyme was almost double that obtained for recombinant fish trypsins produced in *E. coli* (≈ 25 kDa), suggesting that the enzyme was glycosylated when produced in *P. pastoris*; however, the effect of glycosylation on enzyme activity is unknown (Macouzet et al. 2005).

The production of cold-adapted trypsins I and Y of Atlantic cod as soluble proteins in the *E. coli* expression system was made possible by the His-Patch ThioFusion system. In addition, heterologous expression systems require mild environmental conditions for trypsin production; compared to *P. pastoris*, the *E. coli* expression system requires a shorter growing time; induction times of 10–12 h are used in *E. coli*; and 3–5 days are required in *P. pastoris*. Heterologous expression systems also facilitate enzyme detection by western blotting using polyclonal or monoclonal antibodies directed against thioredoxin, His-tag or any other fusion protein, or by simple polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) when a clear overexpression is achieved (Jónsdóttir et al. 2004; Pálsdóttir and Gudmundsdóttir 2004; Gudmundsdóttir and Pálsdóttir 2005; Macouzet et al. 2005; Pálsdóttir and Gudmundsdóttir 2007). Some problems in

Table 3 Recombinant fish trypsins obtained in different expression systems

Species	Enzyme	Expression vector	Expression system	Yield	Molecular weight (kDa)	Substrates assayed	References
Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	Trypsin	pET30a (Novagen, Madison, WI)	<i>E. coli</i>	–	38 Trypsinogen fusion protein 24	Boc-Gln-Ala-Arg-MCA	Rajapakse et al. (2014)
<i>Engraulis japonicus</i> (Anchoa)	Trypsin	pETBlue1	<i>E. coli</i> Rosetta (DE3) pLacI Tuner (DE3) pLacI	12 mg L ⁻¹	24	BAPNA	Ahsan et al. (2005)
<i>Tautoga americana/cunner-fish</i> (<i>Tautoglabrus adspersus</i>)	Trypsin	pPICZγ pPICZα	<i>Pichia pastoris</i> Cepa X-33 (<i>mut⁺his⁺</i>)	Low (NE)	45 (glycosylation) 35.4 (rCFT fused to the myc epitope)	BAPNA	Macouzet et al. (2005)
Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>)	Trypsin Y	pThioHis A	<i>E. coli</i> TOP10	0.15 mg L ⁻¹ (Mono Q)	40 (HP-thiore-doxin-trypsin Y) 25	N-CBZ-Gly-Pro-Arg-pNA Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	Pálsdóttir and Gudmundsdóttir (2007)
Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>)	Trypsin Y	pPicZα A	<i>Pichia pastoris</i> Cepa X-33 (<i>mut⁺his⁺</i>)	300 mg L ⁻¹ (Fermentor)	30 (r-trypsin Y-HisMyc polypeptide) 27	Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-p-nitroanilide N-CBZ-Gly-Pro-Arg-pNA Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	Palsdottir and Gudmundsdottir (2004)
Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>)	Trypsin I (cold-adapted)	pThioHisA	<i>E. coli</i> Top 10	0.038 mg L ⁻¹ (Mono Q) 300 mg L ⁻¹ (Fermentor)	39 (HP-thiore-doxin-trypsin I) 24 (Native trypsin I)	N-CBZ-Gly-Pro-Arg-pNA	(Jónsdóttir et al. 2004)

the expression, activation, and purification of these types of proteases have been observed, including autolysis, heat and low pH inactivation, and the formation of inclusion bodies. This may be because cold-adapted proteases are highly sensitive to temperature, even in a range of 18–25 °C (Atlantic cod Trypsin I), compared to their mesophilic counterparts (Jónsdóttir et al. 2004; Ahsan et al. 2005; Stefansson et al. 2010; Gudmundsdóttir et al. 2013). In addition, the Atlantic cod trypsin produced in *P. pastoris* lost all activity at 30 °C, and its optimum temperature of expression was 20 °C (Palsdottir and Gudmundsdottir 2004). This could explain why the recombinant cold-adapted trypsin from *T. adspersus*, produced at 30 °C in the same system, also had a low yield and activity (Macouzet et al. 2005). It is worth mentioning that the stability and catalytic properties of the Atlantic cod trypsin were improved by producing the enzyme as a recombinant protein and the production strategy and uses were patented (Clarsund et al. 2015).

The purification of the recombinant trypsins reported, as well as that of native proteins, was performed by different chromatographic methods. Affinity chromatography using a *p*-aminobenzamidine column followed by ion-exchange

chromatography was used to purify the recombinant trypsin I of Atlantic cod (*G. morhua*) (Jónsdóttir et al. 2004). Partial purification of recombinant trypsin from *T. adspersus* was performed using metal-ion affinity chromatography (IMAC) (Macouzet et al. 2005). Recombinant trypsin Y from *G. morhua* was purified by ion-exchange chromatography followed by affinity chromatography (Palsdottir and Gudmundsdottir 2004; Pálsdóttir and Gudmundsdóttir 2007), and *E. japonicus* trypsin was purified only by ion-exchange chromatography (Ahsan et al. 2005). Enzyme yields were variable (Table 3), showing a remarkable difference between the trypsins produced in *E. coli* (0.15 mg L⁻¹) systems and those produced in *P. pastoris* (300 mg L⁻¹) systems. In the last case, a bioreactor was used, which led to better expression.

The molecular weight range of the recombinant fish trypsins characterized is 24–45 kDa, as shown in Table 3. The substrates used for the characterizations have been mainly synthetic and include the following: the fluorogenic substrate (Boc)-Gln-Ala-Arg-MCA and chromogenic substrates N-CBZ-Gly-Pro-Arg-pNa and succinyl-Ala-Ala-Pro-Arg-p-nitroanilide to measure trypsin activity and the

synthetic substrate succinyl-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide to quantify chymotrypsin activity. A disadvantage of these small synthetic substrates for the characterization of protease activity is that they do not represent natural proteins at all. Therefore, it is difficult to establish a physiological conclusion from the data, because, even though the proteases can cleave these small synthetic substrates easily, the access to the active site for native proteins could be blocked (Hortin et al. 2001).

The biochemical and kinetic properties of the recombinant trypsin from *E. japonicus* produced in *E. coli* were similar to those determined for the native enzyme. The catalytic efficiency of this recombinant enzyme was $58 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, which is slightly lower than that of the native enzyme ($112 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$), and the affinities for the substrate (BAPNA) of the recombinant and native enzymes were 0.045 and 0.033 mM, respectively. The substrate specificity and cleavage site remained unchanged in the recombinant enzyme compared to the native enzyme, and no change attributable to the refolding protocol was observed (Ahsan et al. 2005). Another recombinant fish trypsin partially characterized is the one obtained from Medaka (*Oryzias latipes*) and produced in *E. coli*. The K_m and catalytic efficiency of this recombinant enzyme were 0.10 mM and $7.15 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, respectively, using Boc-Gln-Ala Arg-MCA as substrate (Rajapakse et al. 2014). It is worth mentioning that a complete biochemical and kinetic characterization has not been performed on most of the recombinant fish trypsins, making their comparison with native trypsins difficult. In some cases, thermal stability was assayed at different temperatures, but the half-life was not reported, making it difficult to compare them and draw conclusions. The thermal instability of cold-adapted trypsins represents a drawback for their practical use. As a result, efforts have now been made to immobilize the enzyme to improve its stability (Fuchise et al. 2011). A complete characterization of recombinant fish trypsins is required to determine their potential use in specific industrial and biomedical applications (Palsdottir and Gudmundsdottir 2004; Macouzet et al. 2005). For example, it is unknown if recombinant fish trypsins are salt tolerant, which is desirable for their use in sauce formulations. This characteristic has been observed in the native trypsin of skipjack tuna and Atlantic wolffish (Desrosiers et al. 2008; Klomklao et al. 2009b).

Conclusions

The use of heterologous protein expression systems is a promising alternative for the production of high-quality fish trypsins and to minimize the main drawbacks in their production. In addition, these methods could facilitate the development of structure–function studies aimed at

increasing their thermal stabilities and improving the properties of these enzymes, particularly for trypsins from cold-adapted species, which have a naturally low thermostability compared to their mesophilic analogues.

Escherichia coli has been the expression system most commonly tested for the production of fish trypsins due to the advantages of this system, such as ease of manipulation, rapid growth, low cost, and short production times (Ahsan et al. 2005). However, in *E. coli*, the expression of proteins requiring disulfide bonds usually leads to the precipitation of these proteins as insoluble aggregates called “inclusion bodies”, from which the active proteins can be obtained only by solubilization in denaturing agents followed by careful refolding of the denatured proteins (Fischer et al. 1993; Clark 2001), which is an expensive and time-consuming process. The addition of thioredoxin as a fusion protein using specific expression vectors has contributed to obtain soluble and active fish trypsins; however, the yields using this method have been low.

The yeast (*P. pastoris*) system seems to have great potential in the generation of fish trypsins at higher yields. This system offers a suitable environment for the folding of eukaryotic proteins, since it develops some post-translational modifications, such as disulfide bond formation, thereby avoiding the expensive solubilization and renaturation processes required to obtain soluble and active proteins from inclusion bodies. In addition, this system can secrete the recombinant proteins into the culture medium efficiently, and due to the low secretion of endogenous proteins, the subsequent purification of the recombinant proteins is facilitated; this is particularly desirable for biomedical applications (Fornbacke and Clarsund 2013; Gudmundsdóttir et al. 2013).

It is necessary to know if the structural features and biochemical properties of native fish trypsins are preserved in the recombinant proteins produced in both the *E. coli* and *P. pastoris* systems. To date, the crystallographic structures of recombinant fish trypsins have not been determined. There is a lack of information comparing the biochemical and kinetic properties of native and recombinant fish trypsins. It is not known if *E. coli* strains with oxidizing cytoplasmic environments can produce fish trypsins more efficiently. In addition, the conditions for the production and purification of fish trypsins, in either case, require optimization.

Acknowledgements This work was supported by the CONACYT Grant 173065 and institutional project UJAT-2016-PII-DACS-07. The authors thank José Natividad Arias Jiménez for support during the preparation of the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest in the publication.

References

- Ahsan N, Watabe S (2001) Kinetic and structural properties of two isoforms of trypsin isolated from the viscera of Japanese anchovy, *Engraulis japonicus*. *J Protein Chem* 20(1):49–58
- Ahsan N, Aoki H, Watabe S (2005) Overexpression in *Escherichia coli* and functional reconstitution of anchovy trypsinogen from the bacterial inclusion body. *Mol Biotechnol* 30:193–205. <https://doi.org/10.1385/MB:30:3:193>
- Balti R, Barkia A, Bougateg A, Ktari N, Nasri M (2009) A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): purification and characterisation. *Food Chem* 113:146–154. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.059>
- Barkia A, Bougateg A, Nasri R, Fetoui E, Balti R, Nasri M (2010) Trypsin from the viscera of Bogue (*Boops boops*): isolation and characterisation. *Fish Physiol Biochem* 36:893–902. <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9365-z>
- Ben Khaled H, Bougateg A, Balti R, Triki-Ellouz Y, Souissi N, Nasri M (2008) Isolation and characterisation of trypsin from sardinelle (*Sardinella aurita*) viscera. *J Sci Food Agric* 88:2654–2662. <https://doi.org/10.1002/jsfa>
- Berglund GI, Smalås AO, Hordvik A, Willassen NP (1995) Structure of anionic salmon trypsin in a second crystal form. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 51:725–730. <https://doi.org/10.1107/S0907444995000333>
- Bjarnason JB (2000) Fish serine proteinases and their pharmaceutical and cosmetic use. WO2000078332A2
- Bkhairia I, Ben Khaled H, Ktari N et al (2016) Biochemical and molecular characterisation of a new alkaline trypsin from *Liza aurata*: structural features explaining thermal stability. *Food Chem* 196:1346–1354. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.058>
- Blanco M, Simpson BK, Pérez-Martín RI, Sotelo CG (2014) Isolation and partial characterization of trypsin from pancreas of small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*). *J Food Biochem* 38:196–206. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12038>
- Bougateg A (2013) Trypsins from fish processing waste: characteristics and biotechnological applications—comprehensive review. *J Clean Prod* 57:257–265. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.06.005>
- Bougateg A, Souissi N, Fakhfakh N, Ellouz-Triki Y, Nasri M (2007) Purification and characterization of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chem* 102:343–350. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.050>
- Bougateg A, Balti R, Nasri R, Jellouli K, Souissi N, Nasri M (2010) Biochemical properties of anionic trypsin acting at high concentration of NaCl purified from the intestine of a carnivorous fish: smooth hound (*Mustelus mustelus*). *J Agric Food Chem* 58:5763–5769. <https://doi.org/10.1021/jf100534a>
- Cai QF, Jiang YK, Zhou LG, Sun LC, Liu GM, Osatomi K, Cao MJ (2011) Biochemical characterization of trypsins from the hepatopancreas of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 159:183–189. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.04.002>
- Castillo-Yáñez FJ, Pacheco-Aguilar R, García-Carreño FL, de LÁ Navarrete-Del Toro M (2005) Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comp Biochem Physiol B* 140(1):91–98. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.09.031>
- Clark ED (2001) Protein refolding for industrial processes. *Curr Opin Biotechnol* 12:202–207. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)0200-7](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)0200-7)
- Clarsund MP, Blom UT (2015) Novel treatments. WO2015114343A1
- Clarsund MP, Svensson BR, Walse BU, Rasmussen PB, Thorsted PB (2015) Novel methods, polypeptides and uses thereof. WO2015150799A1
- Costa HM, Freitas Júnior AC, Amaral IP, Hirata IY, Paiva PM, Carvalho LB, Bezerra RS (2013) Metal-sensitive and thermostable trypsin from the crevalle jack (*Caranx hippos*) pyloric caeca: purification and characterization. *Chem Cent J* 7:166. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-166>
- Desrosiers V, Le François NR, Blier PU (2008) Trypsin-like enzyme from Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*) Viscera: purification and Characterization. *J Aquat Food Prod Technol* 17:11–26. <https://doi.org/10.1080/10498850801891124>
- Dos Santos CWV, da Costa Marques ME, de Araujo Tenorio H, Carvalho de Miranda E, Vieira Pereira HJ (2016) Purification and characterization of trypsin from *Luphiosilurus alexandri* pyloric cecum. *Biochem Biophys Rep* 8:29–33. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.08.003>
- Elhadj-Ali N, Hmidet N, Bougateg A, Nasri R, Nasri M (2009) A laundry detergent-stable alkaline trypsin from striped seabream (*Lithognathus mormyrus*) Viscera: purification and characterization. *J Agric Food Chem* 57:10943–10950. <https://doi.org/10.1021/jf902059a>
- Espósito TS, Amaral IPG, Buarque DS, Oliveira GB, Carvalho LB, Bezerra RS (2009) Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. *Food Chem* 112:125–130. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.049>
- Espósito TS, Marcuschi M, Amaral IPG, Carvalho LB, Bezerra RS (2010) Trypsin from the processing waste of the lane snapper (*Lutjanus synagris*) and its compatibility with oxidants, surfactants and commercial detergents. *J Agric Food Chem* 58:6433–6439. <https://doi.org/10.1021/jf100111e>
- Fischer B, Sumner I, Goodenough P (1993) Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechnol Bioeng* 41:3–13. <https://doi.org/10.1002/bit.260410103>
- Fornbacke M, Clarsund M (2013) Cold-adapted proteases as an emerging class of therapeutics. *Infect Dis Ther* 2:15–26. <https://doi.org/10.1007/s40121-013-0002-x>
- Freitas AC, Rodrigues D, Rocha-Santos TAP, Gomes AMP, Duarte AC (2012) Marine biotechnology advances towards applications in new functional foods. *Biotechnol Adv* 30:1506–1515. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.006>
- Freitas-Júnior ACV, Costa HMS, Icimoto MY, Hirata IY, Marcondes M, Carvalho LB, Bezerra RS (2012) Giant amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): its viscera as a source of thermostable trypsin. *Food Chem* 133:1596–1602. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.056>
- Fuchise T, Kishimura H, Sekizaki H, Nonami Y, Kanno G, Komklo S, Chun BS (2009) Purification and characteristics of trypsins from cold-zone fish, Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) and saffron cod (*Eleginus gracilis*). *Food Chem* 116:611–616. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.078>
- Fuchise T, Sekizaki H, Kishimura H, Komklo S, Nalinanon S, Benjakul S, Chun BS (2011) Simple preparation of pacific cod trypsin for enzymatic peptide synthesis. *J Amino Acids* 2011:912382. <https://doi.org/10.4061/2011/912382>
- Genicot S, Feller G, Gerday C (1988) Trypsin from antarctic fish (*Paranotothenia megellanica* Forster) as compared with trout (*Salmo gairdneri*) Trypsin. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 90:601–609
- Genicot S, Rentier-Delrue F, Edwards D, VanBeeumen J, Gerday C (1996) Trypsin and trypsinogen from an Antarctic fish: molecular basis of cold adaptation. *Biochim Biophys Acta Protein Struct Mol Enzymol* 1298:45–57. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(96\)00095-7](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(96)00095-7)
- Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, Chessa JP, Claverie P, Collins T, Feller G (2000) Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol* 18:103–107

- Gorfe AA, Brandsdal BO, Leiros HS, Helland R, Smalås AO (2000) Electrostatics of mesophilic and psychrophilic trypsin isoenzymes: qualitative evaluation of electrostatic differences at the substrate binding site. *Protein Struct Funct Genet* 217:207–217
- Gudmundsdóttir Á, Pálsdóttir HM (2005) Atlantic cod trypsins: from basic research to practical applications. *Mar Biotechnol* 7:77–88. <https://doi.org/10.1007/s10126-004-0061-9>
- Gudmundsdóttir Á, Scheving R (2017) Combination therapies. WO2017017027A1
- Gudmundsdóttir Á, Stefánsson B, Scheving R (2015) Use of marine serine proteases for removal, prevention and inhibition of formation and growth of biofilms. EP3120866A1
- Gudmundsdóttir Á, Asgeirsson A, Stefánsson B (2017) Novel trypsin isoforms and their use. WO2017017012A1
- Gudmundsdóttir Á, Hilmarsson H, Stefánsson B (2013) Potential use of atlantic cod trypsin in biomedicine. *Biomed Res Int*. <https://doi.org/10.1155/2013/749078>
- He S, Franco C, Zhang W (2013) Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Res Int* 50:289–297. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.031>
- Helland R, Leiros I, Berglund GI, Willassen NP, Smalås AO (1998) The crystal structure of anionic salmon trypsin in complex with bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Eur J Biochem* 256:317–324. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2560317.x>
- Helland R, Berglund GI, Otlewski J, Apostoluk W, Andersen OA, Willassen NP, Smalås AO (1999) High-resolution structures of three new trypsin-squash-inhibitor complexes: a detailed comparison with other trypsins and their complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55:139–148. <https://doi.org/10.1107/S090744499801052X>
- Hortin GL, Warshawsky I, Laude-Sharp M (2001) Macromolecular chromogenic substrates for measuring proteinase activity. *Clin Chem* 47:215–222
- Jellouli K, Bougateg A, Daassi D, Balti R, Barkia A, Nasri M (2009) New alkaline trypsin from the intestine of Grey triggerfish (*Balistes caprisicus*) with high activity at low temperature: purification and characterisation. *Food Chem* 116:644–650. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.087>
- Jónsdóttir G, Bjarnason JB, Gudmundsdóttir Á (2004) Recombinant cold-adapted trypsin I from Atlantic cod—expression, purification, and identification. *Protein Expr Purif* 33:110–122. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2003.09.012>
- Ketnawa S, Martínez-Alvarez O, Benjakul S, Rawdkuen S (2016) Gelatin hydrolysates from farmed Giant catfish skin using alkaline proteases and its antioxidative function of simulated gastro-intestinal digestion. *Food Res Int* 192:34–42. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.087>
- Khandagale AS, Sarojini BK, Kumari SN, Suman JSD, Nooralabettu K (2013) Isolation, purification, and biochemical characterization of trypsin from indian mackerel (*Rastralliger kanagurta*). *J Aquat Food Prod Technol* 24:354–367. <https://doi.org/10.1080/10498850.2013.777864>
- Khandagale AS, Mundodi L, Sarojini BK (2017) Isolation and characterization of trypsin from fish viscera of oil sardine (*Sardinella longiceps*). *Int J Fish Aquat Stud* 5:33–37
- Khangembam BK, Chakrabarti R (2015) Trypsin from the digestive system of carp *Cirrhinus mrigala*: purification, characterization and its potential application. *Food Chem* 175:386–394. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.140>
- Khangembam BK, Yvr KS, Chakrabarti R (2012) Purification and characterization of trypsin from the digestive system of carp *Catla catla* (Hamilton). *Int Aquat Res* 4:1–12. <https://doi.org/10.1186/2008-6970-4-9>
- Khantaphant S, Benjakul S (2010) Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chem* 120:658–664. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.098>
- Kim M, Jeong Y (2013) Purification and characterization of a trypsin-like protease from flatfish (*Paralichthys olivaceus*) intestine. *J Food Biochem* 37:732–741. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2012.00672.x>
- Kim HR, Meyers SP, Pyeun JH, Godber JS (1994) Enzymatic properties of anionic trypsins from the hepatopancreas of crayfish, *Procambarus clarkia*. *Comp Biochem Physiol Part B Comp Biochem* 107:197–203
- Kishimura H, Hayashi K, Miyashita Y, Nonami Y (2005) Characteristics of two trypsin isozymes from the viscera of Japanese anchovy (*Engraulis japonica*). *J Food Biochem* 29:459–469. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2005.00029.x>
- Kishimura H, Hayashi K, Miyashita Y, Nonami Y (2006a) Characteristics of trypsins from the viscera of true sardine (*Sardinops melanostictus*) and the pyloric caeca of arabesque greenling (*Pleurogrammus azonus*). *Food Chem* 97:65–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.008>
- Kishimura H, Tokuda Y, Klomklao S, Benjakul S, Ando S (2006b) Enzymatic characteristics of trypsin from pyloric caeca of spotted mackerel (*Scomber australasicus*). *J Food Biochem* 30:466–477. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2006.00076.x>
- Kishimura H, Tokuda Y, Klomklao S, Benjakul S, Ando S (2006c) Comparative study of enzymatic characteristics of trypsins from the pyloric caeca of yellow tail (*Seriola quinqueradiata*) and brown hake (*Physiculus japonicus*). *J Food Biochem* 30:521–534. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2006.00079.x>
- Kishimura H, Tokuda Y, Yabe M et al (2007) Trypsins from the pyloric caeca of jacobever (*Sebastes schlegelii*) and elkhorn sculpin (*Alicichthys alcicornis*): isolation and characterization. *Food Chem* 100:1490–1495. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.040>
- Kishimura H, Klomklao S, Benjakul S, Chun BS (2008) Characteristics of trypsin from the pyloric caeca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). *Food Chem* 106:194–199. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.056>
- Klomklao S, Benjakul S, Visessanguan W (2004) Comparative studies on proteolytic activity of spleen extracts from three tuna species commonly used in Thailand. *J Food Biochem* 28:355–372
- Klomklao S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H, Simpson BK (2006a) Purification and characterization of trypsin from the spleen of tongol tuna (*Thunnus tonggol*). *J Agric Food Chem* 54:5617–5622. <https://doi.org/10.1021/jf060699d>
- Klomklao S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H, Simpson BK, Saeki H (2006b) Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: purification and characterization. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 144:47–56. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.01.006>
- Klomklao S, Benjakul S, Visessanguan W et al (2007a) Purification and characterisation of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chem* 100:1580–1589. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.001>
- Klomklao S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H, Simpson BK (2007b) Trypsin from the pyloric caeca of bluefish (*Pomatomus saltatrix*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 148:382–389. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.07.004>
- Klomklao S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H, Simpson BK (2007c) 29 kDa trypsin from the pyloric caeca of Atlantic bonito (*Sarda sarda*): recovery and characterization. *J Agric Food Chem* 55:4548–4553. <https://doi.org/10.1021/jf063319x>
- Klomklao S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H, Simpson BK (2009a) Extraction of carotenoprotein from black tiger shrimp shells with the aid of bluefish trypsin. *J Food Biochem* 33:201–217. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00213.x>

- Klomklao S, Kishimura H, Benjakul S (2009b) Trypsin from the Pyloric Ceca of Pectoral Rattail (*Coryphaenoides pectoralis*): purification and characterization. *J Agric Food Chem* 57:7097–7103. <https://doi.org/10.1021/jf901157f>
- Klomklao S, Kishimura H, Nonami Y, Benjakul S (2009c) Biochemical properties of two isoforms of trypsin purified from the Intestine of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chem* 115:155–162. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.087>
- Klomklao S, Benjakul S, Kishimura H, Chaijan M (2011) 24 kDa Trypsin: a predominant protease purified from the viscera of hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*). *Food Chem* 129:739–746. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.014>
- Klomklao S, Kishimura H, Benjakul S (2014) Anionic trypsin from the pyloric ceca of Pacific Saury (*Cololabis saira*): purification and biochemical characteristics. *J Aquat Food Prod Technol* 23:186–200. <https://doi.org/10.1080/10498850.2012.708387>
- Korhonen H, Pihlanto A (2006) Bioactive peptides: production and functionality. *Int Dairy J* 16(9):945–960
- Kristinsson HG, Rasco BA (2000) Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Crit Rev Food Sci Nutr* 40:43–81
- Ktari N, Ben Khaled H, Nasri R et al (2012) Trypsin from zebra blenny (*Salarias basilisca*) viscera: purification, characterisation and potential application as a detergent additive. *Food Chem* 130:467–474. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.015>
- Kumari R, Gupta S, Singh AR, Ferosekhan S, Kothari DC, Pal AK, Jadhao SB (2013) Chitosan nanoencapsulated exogenous trypsin biomimics zymogen-like enzyme in fish gastrointestinal tract. *PLoS ONE* 8:1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074743>
- Kurtovic I, Marshall SN, Simpson BK (2006) Isolation and characterization of a trypsin fraction from the pyloric ceca of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 143:432–440. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.12.020>
- Lassoued I, Hajji S, Mhamdi S, Jridi M, Bayoudh A, Barkia A, Nasri M (2015) Digestive alkaline proteases from thornback ray (*Raja clavata*): characteristics and applications. *Int J Biol Macromol* 80:668–675. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2015.07.038>
- Leiros HKS, McSweeney SM, Smalås AO (2001) Atomic resolution structures of trypsin provide insight into structural radiation damage. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 57:488–497. <https://doi.org/10.1107/S0907444901000646>
- Leiros H-KS, Brandsdal BO, Andersen OA et al (2004) Trypsin specificity as elucidated by LIE calculations, X-ray structures, and association constant measurements. *Protein Sci* 13:1056–1070. <https://doi.org/10.1110/ps.03498604>
- Liu ZY, Wang Z, Xu SY, Xu LN (2007) Two trypsin isoforms from the intestine of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol* 177:655–666. <https://doi.org/10.1007/s00360-007-0163-6>
- Lu BJ, Zhou LG, Cai QF, Hara K, Maeda A, Su WJ, Cao MJ (2008) Purification and characterisation of trypsins from the pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Food Chem* 110:352–360. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.010>
- Macouzet M, Simpson BK, Lee BH (2005) Expression of a cold-adapted fish trypsin in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res* 5:851–857. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2005.02.007>
- Marcuschi M, Espósito TS, Machado MFM, Hirata IY, Machado MFM (2010) Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Biochem Biophys Res Commun* 396:667–673. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.155>
- Menezes Estevam Alves MH, Nascimento GA, Cabrera MP, da Cruz Silvério SI, Nobre C, Teixeira JA, de Carvalho Júnior LB (2017) Trypsin purification using magnetic particles of azocasein-iron composite. *Food Chem* 226:75–78. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.094>
- Nasri R, Sila A, Ktari N, Lassoued I, Bougatef A, Karra-Chaabouni M, Nasri M (2012) Calcium dependent, alkaline detergent-stable trypsin from the viscera of Goby (*Zosterisessor ophiocephalus*): purification and characterization. *Process Biochem* 47:1957–1964. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.002>
- Outzen H, Berglund GI, Smalås AO, Willassen NP (1996) Temperature and pH sensitivity of trypsins from Atlantic salmon (*Salmo salar*) in comparison with bovine and porcine trypsin. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 115:33–45. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(96\)00081-8](https://doi.org/10.1016/0305-0491(96)00081-8)
- Pálsdóttir HM, Gudmundsdóttir A (2004) Recombinant trypsin Y from Atlantic Cod—properties for commercial use. *J Aquat Food Prod Technol* 13:85–100. <https://doi.org/10.1300/J030v13n02>
- Pálsdóttir HM, Gudmundsdóttir Á (2007) Expression and purification of a cold-adapted group III trypsin in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 51:243–252. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.06.008>
- Pálsdóttir HM, Gudmundsdóttir Á (2008) The novel trypsin Y from Atlantic cod (*Gadus morhua*)—isolation, purification and characterisation. *Food Chem* 111:408–414. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.005>
- Poonsin T, Sripokar P, Benjakul S, Simpson BK, Visessanguan W, Klomklao S (2017) Major trypsin like-serine proteinases from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) spleen: biochemical characterization and the effect of extraction media. *J Food Biochem* 41:1–9. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12323>
- Rajapakse S, Ogiwara K, Takahashi T (2014) Characterization and expression of trypsinogen and trypsin in medaka testis. *Zool Sci* 31:840–848. <https://doi.org/10.2108/zs140111>
- Schröder Leiros HK, Willassen NP, Smalås AO (2000) Structural comparison of psychrophilic and mesophilic trypsins: elucidating the molecular basis of cold-adaptation. *Eur J Biochem* 267:1039–1049. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01098.x>
- Schröder HK, Willassen NP, Smalås AO (1998) Structure of a non-psychrophilic trypsin from a cold-adapted fish species. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 54:780–798. <https://doi.org/10.1107/S0907444997018611>
- Shi C, Marshall SN, Simpson BK (2007) Purification and characterization of trypsin from the pyloric ceca of the New Zealand hoki fish (*Macruronus novaezealandiae*). *J Food Biochem* 31:772–796. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2007.00141.x>
- Sila A, Nasri R, Jridi M, Balti R, Nasri M, Bougatef A (2012) Characterisation of trypsin purified from the viscera of Tunisian barbel (*Barbus callensis*) and its application for recovery of carotenoproteins from shrimp wastes. *Food Chem* 132:1287–1295. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.105>
- Silva JF, Espósito TS, Marcuschi M, Ribeiro K, Cavalli RO, Oliveira V, Bezerra RS (2011) Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). *Food Chem* 129:777–782. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.019>
- Simpson BK, Dauphin L, Smith JP (1992) Recovery and characteristics of carotenoprotein from lobster (*Homarus americanus*) waste. *J Aquat Food Prod Technol* 1:129–146. <https://doi.org/10.1300/J030v01n02>
- Smalås AO, Heimstad ES, Hordvik A, Willassen NP, Male R (1994) Cold adaptation of enzymes: structural comparison between salmon and bovine trypsins. *Proteins Struct Funct Bioinforma* 20:149–166. <https://doi.org/10.1002/prot.340200205>
- Souza AAG, Amaral IPG, Santo ARE, Carvalho LB, Bezerra RS (2007) Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). *Food Chem* 100:1429–1434. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.015>

Villahermosa, Tabasco a 29 de Mayo de 2018

M.A.E.E. CAROLINA GONZÁLEZ CONSTANTINO
DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES
PRESENTE

Hago de su conocimiento que el artículo publicado en la revista 3 Biotech, como requisito para la titulación de la alumna Kristal de María Jesús de la Cruz del Doctorado en Ciencias en Ecología y Manejo de Sistemas Tropicales y que tiene como nombre "Fish trypsins: potential applications in biomedicine and prospects for production" tiene como autores de la siguiente forma:

Primer Autor: Kristal de María Jesús de la Cruz

Segundo Autor: Carlos Alfonso Álvarez González

Tercer Autor: Emyr Saúl Peña Marín

Cuarto Autor: José Antonio Morales Contreras

Quinto Autor: Ángela Ávila Fernández

Así mismo una servidora funge como autor de correspondencia.

Sin más por el momento me despido de usted con un afectuoso saludo.

Atentamente



Dra. Ángela Ávila Fernández

c.c.p. interesado

**5.3 CAPÍTULO III:
Clonación y expresión de la tripsina recombinante de *A. tropicus*
(At1)**

Capítulo por someter:

Jesús de la Cruz, K. de M., Ávila Fernández, Á, Álvarez González, C. A., Tovar Ramírez, D., Jiménez Martínez, L.D., & Peña, E. (2018). *A. tropicus*. Por someter a *Biotechnology Journal*.

Artículo de Investigación

Clonación y expresión de la tripsina recombinante de *A. tropicus* (At1)

Kristal de M. Jesús de la Cruz¹

Ángela Ávila Fernández^{2*}

Carlos A. Álvarez González¹

Dariel Tovar Ramírez³

Luis Daniel Jiménez Martínez¹

Emyr S. Peña Marín^{1,4}

¹Laboratorio de Acuacultura Tropical, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, México.

²Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, México.

³Laboratorio de Fisiología Comparada y Genómica Funcional, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, México.

⁴Cátedra Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, México.

Correspondence: Dra. Ángela Ávila Fernández, Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Avenida Gregorio Méndez, 86100 Villahermosa, México.

E-mail: angela.avila@ujat.mx

Keywords: *Atractosteus tropicus*, *E. coli*, Expresión, Proteína Recombinante, Tripsina

Abbreviations: *A. tropicus*, *Atractosteus tropicus*; *E. coli*, *Escherichia coli*; IPTG, Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido; LB, Luria Bertani; TAE, Tris Ácido Acético Glacial EDTA

Resumen

A partir de la secuencia de nucleótidos de la tripsina (At1), obtenida como resultado de los análisis de transcriptómica realizados en *Atractosteus tropicus* durante su ontogenia inicial, se realizó la clonación y transformación del plásmido recombinante [pET32b(+)-At1] (Gen Script), en células *E. coli* TOP10 (*Invitrogen*), posteriormente se verificó por PCR en colonia, que las colonias tuvieran el plásmido con el inserto. Además se corroboró por medio de digestión con enzimas de restricción que la construcción estuviera correcta. Finalmente el plásmido recombinante se conservó en la cepa *E. coli* Top 10 y la enzima heteróloga At1, se produjo en la cepa de expresión *E. coli* Rosseta™. La tripsina recombinante At1 expresada en el sistema *E. coli* Rosseta™ 2, con una masa molecular calculada de aproximadamente 48 kDa mediante el programa Standard Protein BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), muestra identidad con diferentes tripsinas de peces reportadas en el GenBank, lo que la ubica como miembro de la familia de las serinproteasas (3.4.21.4). Este es el primer informe sobre clonación y expresión de una tripsina de *A. tropicus*.

Introducción

Existen pocas investigaciones donde se reporte la expresión de tripsinas recombinantes de peces. Hasta el momento, todas las reportadas pertenecen a especies marinas, tal es el caso de *Engraulis Japonicus* [1], *Gadus morhua* [2, 5-7] y *Tautogolabrus adspersus* [3]. Los sistemas heterólogos de producción utilizados han sido *E. coli* y *P. pastoris*.

El rango de peso molecular de las enzimas recombinantes reportadas es de 24 a 45 kDa. Los sustratos utilizados para la caracterización han sido preferentemente sintéticos, tal es el caso del sustrato cromogénico N-CBZ-Gly-Pro-Arg-pNa y del succinyl-Ala-Ala-Pro-Arg-p-nitroanilide para medir la actividad de tripsina y el sustrato sintético succinyl-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide, para medir actividad de quimotripsina. Los sistemas de expresión y los sustratos utilizados para la caracterización de las tripsinas recombinantes de peces se muestran en la **Tabla 1**.

Cabe destacar que en la mayoría de estas enzimas recombinantes no se realizó una caracterización bioquímica y cinética exhaustiva [2, 3, 5], por lo que es difícil compararlas entre ellas y más aún con las enzimas nativas. En algunos de los casos se reporta la estabilidad térmica a diferentes temperaturas [7], pero no ha sido reportado el tiempo de vida media de las mismas por lo que los resultados no son comparables. El estudiar a fondo estas enzimas nos ayudará a determinar sus características para ser utilizadas en diferentes aplicaciones industriales [3, 7].

El uso de sistemas recombinantes plantea alternativas para producir tripsinas de diferentes especies de peces en grandes cantidades, lo que facilitaría su cristalización. Hasta el momento no hay ninguna proteína recombinante cristalizada, adicional a esto, de las reportadas hasta el momento, ninguna pertenece a algún pez de agua dulce, lo que representa una oportunidad para estudiar las características de las enzimas recombinantes derivadas de variedades nativas de peces.

Además, el uso de sistemas recombinantes plantea la posibilidad de hacer estudios de estructura función que permitan generar enzimas con mejores características. Hasta el momento no existe ninguna tripsina de *A. tropicus* producida por medio de sistemas heterólogos, por lo que resulta interesante su expresión y caracterización, con la finalidad de sentar las bases biotecnológicas para su aplicación futura en el cultivo de esta especie.

Materiales y Métodos

Obtención de muestras

A partir de una de las secuencias de tripsina de *A. tropicus* (At1), obtenida por medio de análisis de transcriptómica en un proyecto paralelo [4], se mando a sintetizar el plásmido recombinante *pET32b(+)-At1*, a la Empresa GenScript, con el que posteriormente se llevaron a cabo las transformaciones de células de *E. coli* TOP10 y Rosseta™ 2, siguiendo las recomendaciones sugeridas en el kit TA Cloning (Invitrogen).

Transformación del plásmido recombinante en cepas de *E. Coli*.

Las transformaciones se llevaron a cabo con 10 µl de plásmido *pET32b(+)-At1* (GenScript) en viales que contenían células TOP 10 quimiocompetentes (Invitrogen) y Rosseta™ 2 respectivamente (50 µl), siguiendo las instrucciones del kit TA Cloning (Invitrogen).

Finalmente, se adicionaron 200 μ l de medio SOC a los viales, y fueron incubados con agitación (225 rpm) durante 1 hora a 37°C, después de la cual se tomaron 50 μ l de cada vial de transformación y se sembraron con perlas de vidrio en placas de Luria Bertani (LB) con ampicilina 100 mg/mL.

PCR en colonia.

Se realizó PCR en colonia utilizando los oligonucleótidos del vector a partir de colonias transformadas con *pET32b(+)-At1*. Las amplificaciones se desarrollaron con la enzima Taq Polimerasa (Invitrogen), bajo las siguientes condiciones generales: Desnaturalización inicial: 3 min a 94°C; Hibridación de 35 ciclos: 30 seg a 94°C, 30 seg a 60.3 °C y 1 min por kb a 72°C; Extensión final: 7 min a 72°C.

Digestión con enzimas de restricción.

La mezcla de reacción fue de 10 μ L, incluidos 5 μ L de Plásmido, 2.75 μ L de Agua tetradestilada, 1 μ l de Buffer, 1 μ l de BSA 10x y 0.25 μ L de la combinación de enzimas utilizadas (Xba I – Eco RI/ Digestión Xba I – Hind III). Se incubaron los tubos con los reactivos durante dos horas a 37°C, sin agitación. (Barnstead Lab-Line Max Q 4000 Incubator Shaker). Posteriormente se prepararon geles de agarosa al 1% en amortiguador TAE 0.5X. Se mezclaron entre 1-5 μ l de las muestras digeridas con 2 μ l del amortiguador de carga, y se colocaron en los pozos del gel.

La electroforesis se desarrolló en amortiguador TAE 0.5X a 100 mV durante 40 minutos. Los geles se tiñeron en solución de bromuro de etidio 0.02% durante 30 segundos y se destiñeron en agua durante 20 minutos

Expresión de At1 en *E. coli* Rosseta 2™

Se agregaron 2.8 ml del preinóculo a los 150 ml del medio LB. El inóculo se inició a una densidad óptica (O.D) de 600 nm de 0.51. Se agregó al cultivo 150 µl del inductor Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1M y se llevó a una concentración final de 1µM. Se incubo el cultivo a 17°C en una placa con agitación constante (90 rpm) durante 12 horas hasta alcanzar una O.D 600 de 1.5, después el cultivo se retiró de la placa y se guardó en el refrigerador a 4°C. Para recuperar las células, el medio de cultivo se colocó en tubos falcón de 15 ml y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron (2 veces) con 10 ml de Buffer de Fosfatos (100 µM, pH 6) y el cultivo se guardó hasta su utilización.

Análisis de proteínas (SDS-PAGE).

Se prepararon geles bajo condiciones desnaturalizantes empleando gel de poliacrilamida al 10% de acrilamida y bis acrilamida. Al terminar la preparación del gel, se cargó en un equipo de electroforesis (Bio-Rad), vertiendo una solución de 10 µl del amortiguador de corrida de proteína (2x) y 10 µl de la muestra del extracto enzimático en cada pozo.

Se programó un tiempo de corrida de 90 mV. La electroforesis fue llevada a cabo a temperatura ambiente a una corriente constante de 90 mV. Los geles fueron teñidos con solución de azul de Coomassie 0.125% en Ácido Acético (Ác. Acético) 10%, Metanol 50% y desteñidos durante toda la noche en la solución desteñidora I (Ac. Acético 10%, Metanol 50%). Se terminaron de desteñir con la solución desteñidora II (Ac. Acético 7%, Metanol 5%) por 2 horas.

Resultados

Análisis de secuencia.

La secuencia de nucleótidos parcial de 419 pb (TRY) de *A. tropicus* reportada en el GenBank (número de acceso del Genbank: KX882028) codifica para un fragmento de 139 aminoácidos (Ver Capítulo I). Esta secuencia fue comparada mediante un alineamiento con las secuencias nucleotídicas de 2 tripsinas de *A. tropicus* (At1 y At2) obtenidas mediante un análisis de transcriptómica [4] y que dan evidencia de que existen otras isoformas de la tripsina (**Figura 1**).

El análisis de las secuencias mostró un porcentaje de identidad de nuestra secuencia (TRY) a nivel de aminoácidos del 41.30 y 73.91%, con At1 y At2, respectivamente, indicando que se trata de una enzima diferente. Se seleccionó una de estas secuencias completas (At1), formada por 254 aminoácidos para su clonación y expresión utilizando el plásmido *pET32b(+)* en el sistema de expresión *E. coli*.

Se mandó a sintetizar el plásmido *pET32b(+)-At1* a la empresa GenScript, con el uso optimizado de codones para *E. coli* y *Pichia pastoris* (**Fig. 1**).

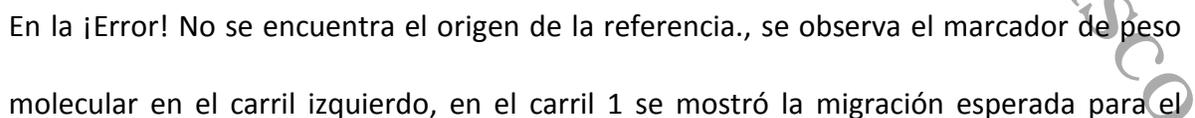
Clonación y verificación del plásmido recombinante [*pET32b(+)-At1*] por PCR en colonia.

Para llevar a cabo la expresión de At1 con la construcción se llevó a cabo la transformación de células quimiocompetentes de la cepa *E. coli* TOP 10 y Rosetta™ 2 y se seleccionaron las colonias en placas de LB con ampicilina 100 mg/mL. Se verificó que las colonias tuvieran el plásmido con el inserto (*pET32b(+)-At1*), mediante PCR en colonia, utilizando los oligonucleótidos del vector.

El tamaño del producto esperado era de 1495 pb (**Fig. 2**). Con estos resultados se logró corroborar que las colonias seleccionadas de *E. coli* tanto TOP 10 como de Rosetta™ 2 si contenían el inserto correspondiente.

Análisis de restricción del plásmido *pET32b(+)-At1*.

Con la finalidad de verificar que la construcción contiene el gen de interés en la posición adecuada se realizó una extracción de plásmido *pET32b(+)-At1* a partir de la cepa de conservación (*E. coli* TOP10), se digirió con diferentes enzimas de restricción, se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se verificaron los patrones de restricción.

En la  Error! No se encuentra el origen de la referencia., se observa el marcador de peso molecular en el carril izquierdo, en el carril 1 se mostró la migración esperada para el

tamaño del plásmido *pET32b(+)* linearizado con Eco RI, en el carril 2 y 3 se observó el plásmido digerido de aproximadamente 3500 pb y el inserto de interés de ~1300 pb. Con estos resultados podemos corroborar que el patrón de restricción corresponde al plásmido esperado *pET32b(+)-At1*.

Producción de la proteína recombinante At1.

La enzima At1 se produjo en la cepa de expresión *E. coli* Rosetta™ 2 inducida con IPTG 1 mM. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, se observa en el carril izquierdo el marcador de peso molecular, en el carril 1 y 3 se observó una banda de mayor intensidad en el extracto enzimático soluble, con un peso molecular de aproximadamente 48 kDa. Dicha banda no se observa en los restos celulares (carril 2 y 4); por lo que la enzima recombinante se obtiene en el extracto soluble y no como cuerpos de inclusión que se adhieren a la membrana celular. El tamaño concuerda con la masa molecular calculada para la secuencia de At1 en el programa Standard Protein BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Estos resultados indican que la cepa *E. coli* Rosetta™ 2, sí produce la proteína recombinante At1, bajo las condiciones que inducen la transcripción del gen.

Discusión

La estrategia utilizada descrita en el Capítulo III, para llevar a cabo la expresión de la proteína recombinante At1, fue exitosa; sin embargo, es necesario optimizar la

producción de la enzima, ya que la expresión fue ineficiente, por lo que es necesario continuar con los estudios a fin de concluir la caracterización de la proteína.

La enzima At1 se expresa en la cepa *E. coli* Rosseta™ 2, sin embargo, no se observa una clara sobreexpresión de la enzima por lo que deberá realizarse la optimización de la producción de la enzima antes de llevar a cabo su caracterización.

Hasta el momento, de las siete tripsinas de peces que se encuentran reportadas, y que han sido expresadas en forma exitosa por medio de sistemas heterólogos [1-3, 5-8], tres se han obtenido usando *P. pastoris* [3,6,7] y las cuatro restantes fueron obtenidas usando como sistema de expresión *E. coli* [1,2,5,8].

Una de estas tripsinas recombinantes, la tripsina recombinante obtenida de *Engraulis Japonicus* [1], fue expresada con cepas de *E. coli* Rosseta, al igual que la enzima recombinante de *A. tropicus* y las otras tres con *P. pastoris* [3,6,7].

Por otro lado, el tamaño obtenido de la forma soluble de la tripsina recombinante de *A. tropicus*, obtenida como proteína de fusión fue de aproximadamente 48 kDa, lo que concuerda con la masa molecular calculada (~48 kDa), en el programa (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Siendo la tripsina recombinante de *A. tropicus* (At1), hasta el momento la de mayor tamaño en comparación con las otras tripsinas recombinantes de peces reportadas (**Tabla 1**).

Para determinar la actividad enzimática de At1, se requiere optimizar los procesos de expresión, ya que como se menciono anteriormente la expresión de la misma fue ineficiente. En un futuro, se propone optimizar el proceso de inducción, estableciendo la

concentración del inductor, tiempo de inducción y temperatura más adecuadas para la expresión de la proteína recombinante At1.

También es necesario optimizar protocolos de purificación para obtener mejores rendimientos (300 mg/L) de los reportados hasta el momento [7]. Será necesario establecer un protocolo adecuado de purificación, considerando las características de ésta proteasa, para obtener el mejor rendimiento que nos sea posible.

Además de establecer un protocolo para activar la enzima, uno de los principales cuellos de botella presentados, cuando la proteína recombinante se obtiene como proteína de fusión unida a tiorredoxina, como ha sido previamente reportado para la tripsina de *Gadus morhua* [7], todo esto con el objetivo de poder llevar a cabo la caracterización enzimática de esta tripsina, con el fin de conocer sus características bioquímicas y cinéticas. La generación de esta información es de interés, para poder compararla con las propiedades de la enzima nativa y con otras tripsinas recombinantes de peces reportadas hasta el momento [1-3, 5-8], con la finalidad de evaluar posibles aplicaciones de la misma [9-12]. El uso del sistema de expresión *P. pastoris* se plantea como una estrategia alternativa para la producción de At1, ya que como bien esta reportado en la literatura, este sistema nos ofrece ventajas principalmente en la expresión de proteínas de tipo eucarionte [7], evitando con esto algunas modificaciones postraduccionales. Los experimentos futuros se centrarán en las mejoras de expresión, purificación y activación de la tripsina recombinante de *A. tropicus* (At1)

Agradecimientos

El estudio fue apoyado financieramente por el Proyecto SAGARPA-2011-08-164673. Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT: beca 173065) y al Programa Institucional de Superación Académica y Fortalecimiento del Posgrado (UJAT) por las becas otorgadas.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de interés en la publicación.

Referencias

- [1] Ahsan, N., Aoki, H., Watabe, S., Overexpression in *Escherichia coli* and functional reconstitution of anchovy trypsinogen from the bacterial inclusion body. *Mol. Biotechnol.* 2005, 30(3), 193–205. DOI:10.1385/MB:30:3:193
- [2] Jónsdóttir, G., Bjarnason, J. B., Gudmundsdóttir, Á., Recombinant cold-adapted trypsin I from Atlantic cod—expression, purification, and identification. *Protein Expr. Purif.* 2004, 33, 110–122. DOI:10.1016/j.pep.2003.09.012
- [3] Macouzet, M., Simpson, B.K., Lee, B.H., Expression of a cold- adapted fish trypsin in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res.* 2005, 5, 851–857. DOI:10.1016/j.femsyr.2005.02.007
- [4] Martínez-Burguete, T., Peña-Marín, E.S., Llera-Herrera, R., Álvarez-González, C.A., Transcriptome analysis during early ontogeny of tropical gar *Atractosteus tropicus*, detecting nutritional markers. En C. I. Hendry (Ed.), *LARVI 17-FISH & LARVICULTURE SYMPOSIUM*. 2017, 281–284.
- [5] Pálsdóttir, H. M., Gudmundsdóttir, Á., Expression and purification of a cold-adapted group III trypsin in *Escherichia coli*. *Protein. Expr. Purif.* 2007, 51, 243–252. DOI: 10.1016/j.pep.2006.06.008

- [6] Pálsdóttir, H.M., Gudmundsdóttir, Á., The novel trypsin Y from Atlantic cod (*Gadus morhua*) - isolation, purification and characterisation. *Food Chem.* 2008, 111, 408–414. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.04.005
- [7] Pálsdóttir, H. M., Gudmundsdóttir, Ä., Recombinant Trypsin Y from Atlantic Cod—Properties for Commercial Use. *J. Aquat. Food Prod. T.* 2004, DOI:10.1300/J030v13n02
- [8] Rajapakse. S., Ogiwara, K., Takahashi, T., Characterization and Expression of Trypsinogen and Trypsin in Medaka Testis. *Zoolog. Sci.* 2014, 31:840–848. DOI:10.2108/zs140111
- [9] Sila, A., Nasri, R., Jridi, M., Balti, R. et al., Characterisation of trypsin purified from the viscera of Tunisian barbel (*Barbus callensis*) and its application for recovery of carotenoproteins from shrimp wastes. *Food Chem.* 2012, 132, 1287–1295. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.105
- [10] Tavano, O.L., Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 2013, 90:1–11. DOI: 10.1016/j.molcatb.2013.01.011
- [11] Villamil, O., Vaquiro, H., Solanilla, J.F., Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. *Food Chem.* 2017, 224,160–171. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.12.057
- [12] Younes, I., Nasri, R., Bkhairia, I., Jellouli, K. et al., New proteases extracted from red scorpionfish (*Scorpaena scrofa*) viscera: Characterization and application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. *Food Bioprod Process.* 2015, 94:453–462. DOI: 10.1016/j.fbp.2014.06.003

Leyenda de Tabla

Tabla 1. Sistemas de expresión de tripsinas recombinantes y sus características

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Tabla 2.

Especie	Enzima	Vector de Expresión	Sistema de Expresión	Peso Molecular kDa	Sustrato	Referencia
<i>Oryzias latipes</i>	Tripsina	pET30a	<i>E. coli</i>	38	Boc-Gln-Ala-Arg-MCA	[8]
<i>Engraulis Japonicus</i>	Tripsina	pETBlue1	<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)pLacI Tuner(DE3) pLacI	24	BAPNA	[1]
<i>Tautoglabrus adspersus</i>	Tripsina	pPICZ y pPICZα	<i>Pichia pastoris</i> cepa X-33 (<i>mut⁺his⁺</i>)	45 (Glicosilación) 35.4 (rCFT fused to the myc epitope)	BAPNA	[3]
<i>Gadus morhua</i>	Tripsina Y	pPicza A	<i>Pichia pastoris</i> cepa X-33 (<i>mut⁺his⁺</i>)	30 (r-trypsin Y HisMyc fusion protein) 25	N-CBZ-Gly-Pro-Arg-pNA suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	[6]
<i>Gadus morhua</i>	Tripsina Y	pThioHis A	<i>E. coli</i> TOP10	40 (HP-thioredoxin-trypsin Y) 25	N-CBZ-Gly-Pro-Arg-Pna suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	[5]
<i>Gadus morhua</i>	Tripsina Y	pPicza A	<i>Pichia pastoris</i> cepa X-33 (<i>mut⁺his⁺</i>)	30 (r-trypsin Y- HisMyc polipeptide) 27	suc-Ala-Ala-Pro-Arg-p-nitroanilide N-CBZ-Gly-Pro-Arg-pNA suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	[7]
<i>Gadus morhua</i>	Tripsina I (Cold adapted)	pThioHis A	<i>E. coli</i> Top 10	39 (HP-thioredoxin-trypsin I) 24 (Native trypsin I)	N-CBZ-Gly-Pro-Arg-pNA	[2]

Leyendas de Figuras

Figura 1. Alineamiento de TRY con las tripsinas de *A. tropicus* obtenidas mediante análisis de transcriptómica.

Figura 2. Amplificación del producto de PCR en colonia de 1495 pb.

Figura 3. Patrón de digestión de plásmido *pET32b(+)-At1*. El marcador molecular se muestra en el carril de la izquierda, Carril 1. Plásmido linearizado con EcoRI. (Carril 2) Digestión de *pET32b(+)-At1* con enzimas Xba I –Eco RI y (Carril 3) Digestión de *pET32b(+)-At1* con enzimas Xba I-Hind III.

Figura 4. Electroforesis de proteína en gel desnaturizante al 10% (SDS-PAGE). El marcador molecular se muestra en el carril de la izquierda, en el carril 1 y 3 se muestra el extracto enzimático soluble, en el carril 2 y 4 se muestran restos celulares. La flecha nos indica el peso estimado para la proteína de interés de ~48 kDa. Las muestras 3 y 4 fueron tratadas con β -mercaptoetanol antes de realizar la electroforesis.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

CLUSTAL format alignment by MAFFT FFT-NS-i (v7.397)

```

At1      MAIFFQYTAALFVTLIVRG-SFELRIIGGEEVTPYSLKYQVSIQYGGRRHYCGGTLVHPQW
At2      MKLLV--LLALFGAAVATPVDDDDKIVGGYECRKNSAPYQVSLN-AGYHFCGGSLSAQW
TRY      -----

At1      VATAAHCWKPSYLIQVVLSEHNLYEDEGFEQVLNVSDIFTYNYYNPRTFNGDIMLLKLS
At2      VVSAAHCYKSR--IQVRLGEHNLAVNEGTEQVISSSRVIRHPSFNSNTLNNDIMLIKLER
TRY      ----CYKSR--VQVRLGEHNIAVNEGTEQFINSAKVIHRPRYSSRNLDNHIMMIKLSK
          *: * . : ** * . *** : ** ** . : : : : : ..... **: ** .

At1      PAHLNAYVQPAALPQPYSTVPTGTTCTVSGWGVTHVYSYTLSPVLRSDIEVINPAVCNY
At2      AATLNSYVNTVALPT--SCAGAGTQCLISGWNTLSSGSNYPDRLQCLNAPILSSSACSS
TRY      NATLNNHVRTVSLPS--SCASSGARCLIS-WGNTSSSGSNYRDNLRCLDVPILSDSSCRS
          * * * : * . : ** * . : * : * * * * . . * : : : : : : *

At1      QYYGKVTANMMCAGTYTGGKDSCQGDSSGGLVCKGVLEGIVSWGISCANAMFPGVYTKVA
At2      AYPGQITSNMFCAGFLEGGKDSCQGDSSGPPVCSGQLQGVVSWGYGCAQRNKPGVYAKVC
TRY      SYPGQITSNMFCAGFLEGGKDSCQGDS-----
          * * : : * : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

At1      NFVSWIEWIKNNSN
At2      NYVSWIRSTM--SSY
TRY      --VS-----
          **

```

Figura 1

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

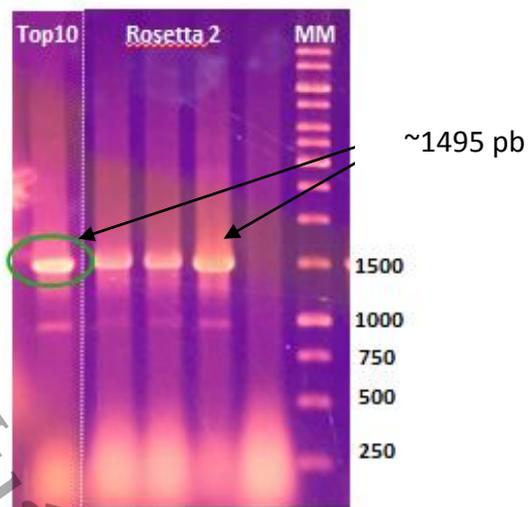


Figura 2

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

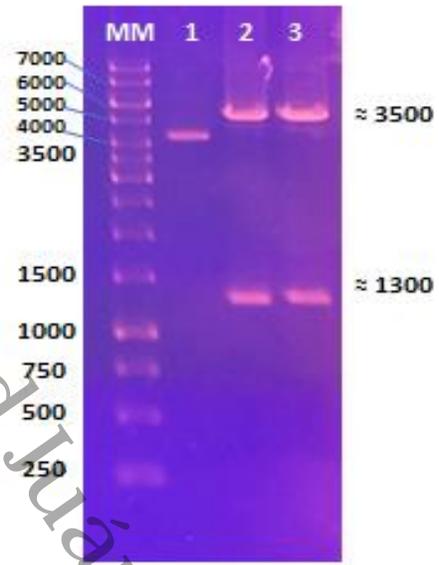


Figura 3

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

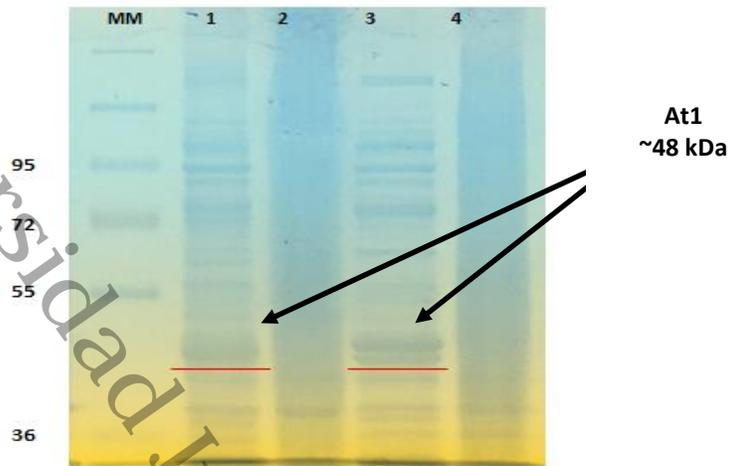


Figura 4

Updated: November 2014

Biotechnology Journal
Instructions to Authors

Manuscript submission:
<http://mc.manuscriptcentral.com/btj>
Contact the Editorial Office at: btj@wiley.com



As of January 2014, *Biotechnology Journal* is available as a fully online publication in response to environmental concerns and changes in user requirements. We will continue to publish the latest breakthrough research in biotechnology while reducing our environmental footprint. Authors have the added benefit that there are no color charges or any other charges associated with publishing in *Biotechnology Journal* (with the exception of those authors who opt in to OnlineOpen, for which a fee is levied to make the article freely accessible to all).

Authors are requested to follow these instructions carefully. Manuscripts missing all necessary information requested for peer review will be returned to authors – this inevitably leads to a delay in the editorial processing of the manuscript. Please refer to our Appendix B for Authors for a quick checklist.

1. ABOUT <i>BIOTECHNOLOGY JOURNAL</i>	2
2. MANUSCRIPT PREPARATION	3
3. ONLINE SUBMISSION OF MANUSCRIPTS	12
4. PEER-REVIEW POLICY OF <i>BIOTECHNOLOGY JOURNAL</i>	13
5. MANUSCRIPT PUBLICATION	14
APPENDIX A: BTJ KEYWORDS	16
APPENDIX B: CHECKLIST FOR AUTHORS	17

APPENDIX B: CHECKLIST FOR AUTHORS

Which manuscript type?	
1. Research Article: Describing complete investigations. Maximum of 6500 words, including references, figure legends and tables (max 5 display elements)	
2. Review: - Full-length Review: 8000 words maximum - Mini-Review: 4000 words maximum	
3. Biotech Method: Short description of the development of a novel method or an improvement or noteworthy modification of an already existing technique or platform used in biotechnology. Max. 4000 words, 3 display elements	
4. Rapid Communication: Brief, timely and/or of such importance that rapid publication is warranted. Max. 2500 words, 3 display elements	
5. Other contribution: Forum column (500 to 2000 words), meeting report, book review	
Manuscript style and format OK?	
The first page of the manuscript should contain:	
1. Title: (concise, only standard abbreviations).	
2. Full author names: (including first name) and the name of their institute(s), using superscript numbers after name to indicate multiple affiliations.	
3. Keywords: (3 to 5).	
4. Correspondence: name, title, full postal address and e-mail address of the author to whom all correspondence (including galley proofs) is to be sent.	
5. Abbreviations: alphabetical order.	
The second page: abstract (maximum 200 words)	
<ul style="list-style-type: none"> • Background • Brief description of important experimental details • All major results • Conclusions and implications 	
Number the sections:	
1 Introduction	
2 Materials and methods	
3 Results (or Results and discussion)	
4 Discussion (or Concluding remarks)	
5 References	
Reference format OK?	
References, including those in tables and figure legends, should be numbered sequentially in square brackets [2, 18] in the order in which they appear in the text. References in figures and tables should be numbered AFTER the maintext	
Reference list (collected at the end of the manuscript) as in the following examples:	
Journals: [1] Liebeton, K., Eck, J., Identification and Expression in E. coli of novel nitrile hydratases from the metagenome. <i>Eng. Life Sci.</i> 2004, 4, 557–562. [2] Hugo, G., Schmoekel, F. E., Weber, J. C., Jason C. et al., Bone repair with a form of BMP-2 engineered for incorporation into fibrin cell ingrowth matrices. <i>Biotechnol. Bioeng.</i> 2005, in press. DOI:10.1002/bit.20168.	
Books: [3] Geis, A., Perspectives of genetic engineering of bacteria used in food fermentations, in: Heller, K.J. (Ed.), <i>Genetically Engineered Food – Methods and Detection</i> , Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2003, pp. 100–118. [4] Chrisou, P., Klee, H. (Ed.), <i>Handbook of Plant Biotechnology</i> , John Wiley & Sons, 2004.	
<ul style="list-style-type: none"> • When more than 5 authors: list 4, et al. • Papers in press: cite DOI. • Other serial publications: cite in the same style as journals • Website addresses not as references but inserted in the text directly after the data to which they refer • Abstracts and posters in meeting books must not be cited unless they are generally accessible • Personal communication or unpublished data should be cited in the text but NOT included in the references 	
Figures and tables OK?	
<ul style="list-style-type: none"> • Tables with title and footnotes included at the end of the text • Figure legends at the end of the main text • High resolution figures only needed upon acceptance 	
Supporting information online	
<ul style="list-style-type: none"> • Extensive tables • Negative / supporting data • Other files such as animations and movies All Supporting Information should be included as on PDF file (except for e.g. movie files – a description of these additional files should nevertheless be included in the PDF file)	
Cover letter complete?	
Please state:	
1. Novelty and general applicability: Why is the paper suitable for publication in BTJ?	
2. All the authors concur with the submission	
3. The work has not been submitted to another journal and will not be published elsewhere within one year after its publication in this journal	
4. Does the manuscript contain experiments using animals?	
5. Does the manuscript contain human studies?	
Suggest reviewers	
Provide the names and e-mail of four suitable reviewers	

6. CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN GENERAL

Niveles de expresión de tripsina en diferentes tejidos en adultos de *A. tropicus*.

De acuerdo con los resultados obtenidos sobre los niveles de expresión de tripsina (TRY) en los once tejidos analizados en los organismos adultos silvestres y de cautiverio de *A. tropicus*, se presentan los mayores niveles en los tejidos digestivos como páncreas, intestino, ciegos pilóricos, estómago, esófago e hígado. Esto es similar a lo obtenido en especies como *S. salar* (Rungruangsak-Torrissen y Sundby 2000; Rungruangsak-Torrissen et al. 2006; Lilleeng et al. 2007), *D. labrax* (Cahu et al. 2004; Péres et al. 1998), *E. japonicus* (Ahsan et al. 2001), *S. sagax caerulea* (Castillo-Yáñez et al. 2005), *S. melanostictus* (Kishimura et al. 2006), *K. pelamis* (Klomklao et al. 2007a), *P. fulvidraco* (Wang et al. 2006), *C. argus* (Zhou et al. 2012), *C. carpio* (Cao et al. 2000).

La mayor expresión de TRY fue detectada en el páncreas tanto en individuos silvestres como de cautiverio, lo que se explica ya que la tripsina se sintetiza en dicho órgano como proenzima y se activa al escindir un propéptido corto del extremo N del zimógeno inactivo, con lo cual la tripsina se activa a la luz del tubo digestivo para iniciar la hidrólisis de las proteínas, además de ser responsable de activar a otras enzimas (Sunde et al. 2004; Zhou et al. 2012; Guerrero-Zárate et al. 2014). Por otra parte, se han detectado varias isoformas de tripsinas en peces (Cao et al. 2000; Rungruangsak-Torrissen et al. 2006; Lu et al. 2008), por lo que para dilucidar dichas isoformas ha sido necesario clonar las secuencias completas (Zhou et al. 2012; Ahsan et al. 2001).

En este sentido, el análisis filogenético de la TRY de *A. tropicus* en comparación a otras especies de peces muestra la mayor identidad con la isoforma tripsina 3, lo que se refuerza con la investigación de Lilleeng et al. (2007), en *S. salar*, quienes muestran que la mayor expresión de tripsina 3 se da en el páncreas, intestino y ciegos pilóricos, mientras que las tripsinas 1 y 2 se encuentran en otros tejidos, como esófago y estómago, entre otros e incluso cerebro, en donde la abundancia del transcrito de tripsina 2 también fue reportada para Senegalese sole (*Solea senegalensis Kaup*) (Manchado et al. 2008).

Esta amplia distribución de tripsinas en otros tejidos no digestivos, respalda la hipótesis de Koshikawa et al. (1998), de que algunas isoformas además pueden estar implicadas en procesos relacionados con el mantenimiento de las funciones de las células epiteliales, sistema inmunológico y sistema nervioso central, quienes detectaron por medio de técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica una isoforma cerebral específica (tripsina 4), en las células nerviosas del hipocampo y la corteza cerebral en humanos y ratones. Debemos mencionar que la expresión de TRY en intestino, ciegos pilóricos, estómago, esófago e hígado es mayor en los adultos de *A. tropicus* de cautiverio que en los adultos silvestres.

Esto puede deberse a que los individuos en cautiverio están bajo condiciones controladas con una mayor frecuencia alimentaria y sobre todo por el alimento comercial empleado para su mantenimiento, el cual contiene 46 % de proteína, lo que refleja un mayor gasto energético, ya que la tripsina juega un papel importante en la especificidad hacia los aminoácidos básicos esenciales en la nutrición,

resaltando la calidad de proteínas que es administrada en dicho alimento que permite una hidrólisis rápida de proteínas (Rungruangsak-Torrissen y Sunby 2000; Rungruangsak-Torrissen et al. 2006).

Niveles de expresión de TRY en larvas de *A. tropicus*.

Como se mencionó anteriormente la tripsina se sintetiza en el páncreas como la proenzima tripsinógeno y se almacena en gránulos de zimógeno (Murray et al. 2004; García-Gasca et al. 2006). En el análisis de expresión de TRY realizado durante la ontogenia inicial en *A. tropicus* se detectó desde el embrión, presentando la máxima expresión al día 15 después de la eclosión (DAH, por sus siglas en inglés). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Frías-Quintana et al. 2015b, quienes determinaron que las larvas de *A. tropicus* pueden ser considerados juveniles a partir de los 15 DAH ya que presentan el pico máximo de las actividades de proteasas digestivas intestinales (tripsina y quimotripsina), además que histológicamente está totalmente desarrollado el intestino.

De igual manera, en otras especies como *D. labrax* (Cahu et al. 2004), *S. annulatus* (García-Gasca et al. 2006), *S. salar* (Rungruangsak-Torrissen et al. 2006), *L. guttatus* (Galaviz et al. 2012) y *T. macdonaldi* (Galaviz et al. 2015), se ha detectado la expresión de tripsinógeno desde el huevo. En este sentido, los autores mencionan que la expresión de tripsina en los primeros días del desarrollo larval esta programada genéticamente para aprovechar los componentes del vitelo (alimentación endógena), y los incrementos de la expresión se relacionan al proceso de primera alimentación, así como a los

cambios de alimentos vivos o inertes, además de la maduración del sistema digestivo (Gawlicka y Horn 2006).

Por otra parte, la expresión de tripsina se ha detectado en el embrión y en el momento de la eclosión en especies como *Melanogrammus aeglefinus* y el bacalao del atlántico *Gadus morhua* (Perez-Casanova et al. 2006), durante la primer alimentación en la anguila japonesa *A. japonica* (Kurokawa et al. 2002), Japanese flounder *P. olivaceus* (Suzuki et al. 2002), Atlantic halibut *H. hippoglossus* (Murray et al. 2006), tilapia *Oreochromis mossambicus* (Lo y Weng 2006) y pargo rojo *Pagrus pagrus* (Darias et al. 2005) y desde el momento de la apertura de la boca y ano en winter flounder (*P. americanus*) (Murray et al. 2004) *P. fulvidraco* (Wang et al. 2006) y *C. idella* (Ruan et al. 2010).

Por lo anterior, se considera que la expresión de tripsina varía entre las larvas de especies de peces en función del desarrollo ontogenético y del tipo de alimentación exógena (García-Gasca et al. 2006; Kurokawa et al. 2002). Por otra parte, es probable que la expresión de TRY en el embrión de *A. tropicus*, se deba al mRNA que proporcionó la madre en el momento de desarrollo, y dicha expresión comienza antes de la eclosión (García-Gasca et al. 2006), y se incrementa cuando el tejido pancreático inicia su desarrollo, lo que fue detectado a los 3 DAH (momento de la primera alimentación) en *A. tropicus* (Frias-Quintana et al., 2015b), e inclusive si no esta completamente diferenciado, como ha sido reportado en *L. guttatus* y *S. annulatus* (Galaviz et al. 2012; García-Gasca et al. 2006).

Por otra parte, la mayor expresión de TRY presentada en el día 15 DAH en las larvas de *A. tropicus*, concuerda con el trabajo de Frías-Quintana et al. 2015b, quienes indican que desde los 15 DAH inicia el periodo juvenil, y el páncreas y el sistema digestivo están totalmente maduros y ya no se presentan cambios morfofisiológicos, por lo que las larvas son capaces de digerir y absorber los nutrientes de forma totalmente eficiente. Es importante recalcar que a los 15 DAH, las larvas de *A. tropicus* ya cuentan con la fisiología digestiva de un juvenil y son consideradas carnívoros oportunistas, con un desarrollo ontogenético inicial precoz, lo que ha permitido realizar el destete de forma rápida utilizando una dieta comercial para trucha.

Actualmente, se ha diseñado un alimento balanceado más adecuado para su cultivo, con lo que se ha logrado mejores crecimientos y supervivencias mayores al 90 % en la etapa larval, además de disminuir el canibalismo (Frías-Quintana et al. 2015a). Es así que *A. tropicus* es una especie que puede ser considerada de desarrollo ontogenético transicional (alimentación endo-exotrófica) desde el punto de vista de su fisiología digestiva (Mendoza et al. 2002; Aguilera et al. 2002), lo cual es diferente a lo reportado en larvas de otras especies marinas como *S. salar*. (Lilleeng et al. 2007; Martin et al. 2002; Rungruangsak-Torrissen et al. 2006; Rungruangsak-Torrissen y Sundby 2000), *D. labrax* (Zambonino-Infante y Cahu 2007; Zambonino-Infante et al. 2008) y *T. macdonaldi* (Galaviz et al. 2015).

Las cuales, aunque presentan mayores niveles de expresión de tripsina, requieren ser alimentadas con presas vivas (rotíferos y nauplios de *Artemia*) (García-Gasca et al. 2006) por más tiempo, ya que son consideradas especies que presentan

ontogenia indirecta, por lo que la máxima eficiencia en la síntesis y secreción de los gránulos de zimógeno pancreático de las proteasas digestivas requiere más tiempo (Zambonino-Infante et al. 2008).

Producción de proteína recombinante de *A. tropicus*.

La estrategia utilizada descrita en el Capítulo III, para llevar a cabo la expresión de la proteína recombinante At1, fue exitosa; sin embargo, es necesario optimizar la producción de la enzima, ya que la expresión fue ineficiente, por lo que es necesario continuar con los estudios a fin de concluir la caracterización de la proteína.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

7. CONCLUSIÓN GENERAL

En conclusión, la detección del gen de TRY, inclusive antes de la eclosión de las larvas (embriones), muestra la capacidad de la larva para digerir proteínas tan pronto como se da la apertura de la boca, además, las fluctuaciones de este gen son indicativos de los cambios morfofisiológicos que se dan a lo largo de la ontogenia en *A. tropicus*. De igual manera, el uso del gen TRY permite determinar los cambios en la síntesis de la enzima, ya sea en su forma activa o como zimógeno, por lo que es un excelente bioindicador para evaluar los cambios durante el desarrollo del sistema digestivo y determinar si los protocolos de alimentación o sus modificaciones tienen un efecto directo sobre la expresión y por consecuencia el estado nutricional de las larvas de *A. tropicus*.

Al comparar la expresión relativa de tripsina en los diferentes tejidos de organismos de cautiverio y de vida libre se observaron diferencias, lo que tiene una relación directa con la frecuencia y el porcentaje de proteína presentes en la dieta que se le administra a los individuos en cautiverio, a diferencia de los organismos de vida libre, información valiosa para complementar los estudios que hasta el momento se han realizado sobre fisiología digestiva, bioquímica digestiva y requerimientos de nutrientes en esta especie.

La estrategia para llevar a cabo la expresión de la proteína recombinante At1, fue exitosa, sin embargo es necesario optimizar la producción de la enzima, ya que la expresión fue ineficiente antes de llevar a cabo su purificación, activación y caracterización.

8. PERSPECTIVAS

- Medir la expresión de otras isoformas de tripsina de *A. tropicus* para conocer el papel que juegan, en la regulación de los diferentes procesos fisiológicos.
- Completar el aislamiento del gen TRY, por medio de la estrategia PCR-RACE. para clonarlo, expresarlo y caracterizar la enzima recombinante.
- Optimizar la producción de la enzima (At1), en *P. pastoris*. utilizando estrategias de Biología Molecular que promuevan una mayor expresión y secreción de la enzima.
- Purificar, activar y caracterizar bioquímica y cinéticamente la enzima (At1)

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Tellez FV (2013). Diseño de dietas microencapsuladas para la alimentación en larvas de pejelagarto *Atractosteus tropicus*. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. 68 pp.
- Aguilera C, Mendoza R, Iracheta I, & Marquez G (2012). Digestive enzymatic activity on Tropical gar (*Atractosteus tropicus*) larvae fed different diets. *Fish Physiol Biochem* 38:679–691. doi:10.1007/s10695-011-9550-8
- Aguilera C, Mendoza R, Rodríguez G, & Márquez G (2002). Morphological Description of Alligator Gar and Tropical Gar Larvae, with an Emphasis on Growth Indicators. *Trans Am Fish Soc* 131(5):899–909. doi:10.1577/1548-8659(2002)131<0899:MDOAGA>2.0.CO;2
- Ahsan N, Funabara D, & Watabe S (2001). Molecular Cloning and Characterization of Two Isoforms of Trypsinogen from Anchovy Pyloric Ceca. *Mar Biotechnol (New York, N.Y.)*, 3:80–90. doi.org/10.1007/s101260000055
- Ahsan, N., Aoki, H., & Watabe, S. (2005). Overexpression in *Escherichia coli* and functional reconstitution of anchovy trypsinogen from the bacterial inclusion body. *Mol Biotechnol* 30(3):193–205. doi:10.1385/MB:30:3:193
- Balti R, Barkia A, Bougatef A, Ktari N, Nasri M (2009) A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): Purification and characterisation. *Food Chem* 113:146–154. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.07.059
- Basile G, & Peticca M (2009). Recombinant Protein Expression in *Leishmania tarentolae*. *Mol Biotechnol* 43:273–278. doi:10.1007/s12033-009-9213-5
- Bjarnason JB (2000). Fish serine proteinases and their pharmaceutical and cosmetic use. WO2000078332A2.
- Bkhairia I, Ben Khaled H, Ktari N, et al (2016) Biochemical and molecular characterisation of a new alkaline trypsin from *Liza aurata*: Structural features explaining thermal stability. *Food Chem* 196:1346–1354. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.10.058
- Bougatef A (2013) Trypsins from fish processing waste: Characteristics and biotechnological applications-Comprehensive Review. *J Clean Prod* 57:257–265. doi: 10.1016/j.jclepro.2013.06.005
- Bougatef A, Souissi N, Fakhfakh N, Ellouz-Triki Y, Nasri M (2007) Purification and

- characterization of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chem* 102:343–350. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.05.050
- Cahu C, Rønnestad I, Grangier V, & Zambonino Infante JL (2004). Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin. *Aquaculture* 238:295–308. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.04.013
- Cao MJ, Osatomi K, Suzuki M, Hara K, Tachibana K, & Ishihara T (2000). Purification and characterization of two anionic trypsins from the hepatopancreas of carp. *J Fish Sci* 66:1172–1179. doi:10.1046/j.1444-2906.2000.00185.x
- Castillo-Yañez FJ, Pacheco-Aguilar R, Garcia-Carreño FL, & Navarrete-Del Toro M de LA (2004). Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. *Food Chem* 85:343–350. doi:10.1016/j.foodchem.2003.07.008
- Castillo-Yañez FJ, Pacheco-Aguilar R, García-Carreño FL, & Navarrete-Del Toro M de LA (2005). Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol* 140(1):91–98. doi:10.1016/j.cbpc.2004.09.031
- Castillo-Yañez FJ, Pacheco-Aguilar R, Navarrete-Del Toro M de los A & Félix López M (2006). Purification and biochemical characterization of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caeruleus*). *Food Chem* 99:252–259. doi:10.1016/j.foodchem.2005.06.052
- Clarsund MP, Blom UT (2015a). Novel treatments. WO2015114343A1.
- Clarsund MP, Svensson BR, Walse BU, Rasmussen PB, Thorsted PB (2015b) Novel methods, polypeptides and uses thereof. WO2015150799A1
- Cruz-Herrera CA (2013). Caracterización de las proteasas digestivas de la mojarra tahuina *Cichlasoma trimaculatum*, (Günter, 1867). Tesis de Licenciatura en Biología, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco. 33 pp.
- Darias MJ, Murray HM, Martínez-Rodríguez G, Cárdenas S, & Yúfera M (2005). Gene expression of pepsinogen during the larval development of red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture* 248:245–252. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.04.044
- Domínguez-Lorenzo J (2014). Utilización de almidón de maíz en dietas microparticuladas para larvas de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. 64 pp.

- Espósito TS, Amaral IPG, Buarque DS, Oliveira GB, Carvalho LB, Bezerra RS (2009) Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. *Food Chem* 112:125–130. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.05.049
- Espósito TS, Marcuschi M, Amaral IPG, Carvalho LB, Bezerra RS (2010) Trypsin from the processing waste of the lane snapper (*Lutjanus synagris*) and its compatibility with oxidants, surfactants and commercial detergents. *J Agric Food Chem* 58:6433–6439. doi: 10.1021/jf100111e
- Fornbacke M, Clarsund M (2013) Cold-Adapted Proteases as an Emerging Class of Therapeutics. *Infect Dis Ther* 2:15–26. doi: 10.1007/s40121-013-0002-x
- Freitas AC, Rodrigues D, Rocha-Santos TAP, Gomes AMP, Duarte AC (2012a) Marine biotechnology advances towards applications in new functional foods. *Biotechnol Adv* 30:1506–1515. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.03.006
- Freitas ACV, Costa HMS, Icimoto MY, Hirata IY, Marcondes M, Carvalho LB, Bezerra RS (2012b) Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera as a source of thermostable trypsin. *Food Chem* 133:1596–1602. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.02.056
- Frías-Quintana CA, Álvarez-González CA, & Márquez-Couturier G (2010). Diseño de microdietas para el larvicultivo de pejelagarto *Atractosteus tropicus*, Gill 1863. *Universidad y Ciencia* 26(2): 265–282. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792010000300006&lng=es&tlng=es.
- Frías-Quintana CA, Álvarez-González CA, Tovar-Ramírez D, Martínez-García R, Camarillo-Coop S, Peña E, & Galaviz MA (2017). Use of Potato Starch in Diets of Tropical Gar (*Atractosteus tropicus*, Gill 1863) Larvae. *Fishes* 2(1):1–11. doi:10.3390/fishes2010003
- Frías-Quintana CA, Domínguez-Lorenzo J, Álvarez-González CA, Tovar-Ramírez D, & Martínez-García R (2015a). Using cornstarch in microparticulate diets for larvicultured tropical gar (*Atractosteus tropicus*). *Fish Physiol Biochem* 42(2): 517–528. doi:10.1007/s10695-015-0156-4
- Frías-Quintana CA, Márquez-Couturier G, Álvarez-González CA, Tovar-Ramírez D, Nolasco-Soria H, Galaviz-Espinosa MA, ... Gisbert E (2015b). Development of digestive tract and enzyme activities during the early ontogeny of the tropical gar *Atractosteus tropicus*. *Fish Physiol Biochem* 41(5): 1075–1091. doi:10.1007/s10695-

015-0070-9

- Galaviz MA, García-Ortega A, Gisbert E, López LM, & García Gasca A (2012). Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Comp Biochem Physiol B* 161(1):9–16. doi:10.1016/j.cbpb.2011.09.001
- Galaviz MA, López LM, García Gasca A, Álvarez González CA, True CD, & Gisbert, E. (2015). Digestive system development and study of acid and alkaline protease digestive capacities using biochemical and molecular approaches in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larvae. *Fish Physiol Biochem* 41(5):1117–1130. doi:10.1007/s10695-015-0073-6
- García-Gasca A, Galaviz MA, Gutiérrez JN, & García-Ortega A (2006). Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Aquaculture* 251:366–376. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.05.029
- Gawlicka AK & Horn MH (2006). Trypsin Gene Expression by Quantitative In Situ Hybridization in Carnivorous and Herbivorous Prickleback Fishes (Teleostei: Stichaeidae): Ontogenetic, Dietary, and Phylogenetic Effects. *Physiol Biochem Zool* 79(1):120–132. doi:10.1086/498289
- Gudmundsdottir A, Asgeirsson A, Stefansson B (2017a) Novel trypsin isoforms and their use. WO2017017012A1
- Gudmundsdóttir Á, Hilmarsson H, Stefansson B (2013) Potential use of atlantic cod trypsin in biomedicine. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2013/749078
- Gudmundsdottir A, Scheving R (2017b) Combination therapies. WO2017017027A1
- Gudmundsdottir A, Stefansson B, Scheving R (2015) Use of marine serine proteases for removal, prevention and inhibition of formation and growth of biofilms. EP3120866A1
- Guerrero-Olazarán M, Cab-Barrera EL, Galán-Wong LJ, & Viader-Salvadó JM (2004). Biotecnología de Proteínas Recombinantes para la Aplicación en Acuicultura. *Memorias del VII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola* 418–440. Retrieved from http://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/VII/archivos/23MarthaGuerrero.pdf
- Guerrero-Zarate R, Álvarez-González CA, Olvera-Novoa MA, Perales-García N, Frías-Quintana CA, Martínez-García R, & Contreras-Sánchez WM (2014). Partial characterization of digestive proteases in tropical gar *Atractosteus tropicus* juveniles.

- Fish Physiol Biochem* 40(4):1021–1029. doi:10.1007/s10695-013-9902-7
- Guevara-Hernández E, López-Zavala A, Jiménez-Gutiérrez L, & Sotelo-Mundo R (2013). Perspectivas Actuales del Uso de Proteínas Recombinantes y su Importancia en la Investigación Científica e Industrial. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud* XV(3):8–17.
- Haard NF, & Simpson BK (1994). Proteases from aquatic organisms and their uses in the seafood industry. In *Fisheries processing: Biotechnological applications* 132–154. doi:10.1007/978-1-4615-5303-8_6
- He S, Franco C, Zhang W (2013) Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Res Int* 50:289–297. doi:10.1016/j.foodres.2012.10.031
- Holmes WJ, Darby RAJ, Wilks MDB, Smith R, & Bill RM (2009). Developing a scalable model of recombinant protein yield from *Pichia pastoris*: the influence of culture conditions, biomass and induction regime. *Microb Cell Fact* 14(8):1–14. doi:10.1186/1475-2859-8-35
- Huerta-Ortíz M (2008). Requerimientos de lípidos en larvas y juveniles del pejelagarto *Atractosteus tropicus*. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. 122 pp.
- Jellouli K, Bougatef A, Daassi D, Balti R, Barkia A, Nasri M (2009) New alkaline trypsin from the intestine of Grey triggerfish (*Balistes capriscus*) with high activity at low temperature: Purification and characterisation. *Food Chem* 116:644–650. doi:10.1016/j.foodchem.2009.02.087
- Jesús-Contreras R (2008). Relación proteína/energía en juveniles de pejelagarto *Atractosteus tropicus*. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. 71 pp.
- Jónsdóttir G, Bjarnason JB, Gudmundsdóttir Á (2004) Recombinant cold-adapted trypsin I from Atlantic cod—expression, purification, and identification. *Protein Expr Purif* 33:110–122. doi:10.1016/j.pep.2003.09.012
- Ketnawa S, Martínez-Alvarez O, Benjakul S, & Rawdkuen S (2016). Gelatin hydrolysates from farmed Giant catfish skin using alkaline proteases and its antioxidative function of simulated gastro-intestinal digestion. *Food Res Int* 192:34–42. doi:10.1016/j.foodchem.2015.06.087
- Khantaphant S, Benjakul S (2010) Purification and characterization of trypsin from the

- pyloric caeca of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chem* 120:658–664. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.09.098
- Kishimura H, Hayashi K, Miyashita Y, & Nonami Y (2006). Characteristics of trypsins from the viscera of true sardine (*Sardinops melanostictus*) and the pyloric ceca of arabesque greenling (*Pleuroprammus azonus*). *Food Chem* 97(1): 65–70. doi:10.1016/j.foodchem.2005.03.008
- Klomklao S (2008). Digestive proteinases from marine organisms and their applications. *J Sci Technol* 30(1):37–46. Retrieved from <http://rdo.psu.ac.th/sjstweb/journal/30-1/0125-3395-30-1-37-46.pdf>
- Klomklao S, Benjakul S, & Visessanguan W (2004). Comparative studies on proteolytic activity of splenic extract from three tuna species commonly used in thailand. *J Food Biochem* 28:355–372. doi:10.1111/j.1745-4514.2004.05203.x
- Klomklao S, Benjakul S, Kishimura H, Chaijan M (2011) 24 kDa Trypsin: A predominant protease purified from the viscera of hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*). *Food Chem* 129:739–746. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.05.014
- Klomklao S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H, & Simpson BK (2007a). Purification and characterisation of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chem* 100(4):1580–1589. doi:10.1016/j.foodchem.2006.01.001
- Klomklao S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H, Simpson BK (2009) Extraction of carotenoprotein from black tiger shrimp shells with the aid of bluefish trypsin. *J Food Biochem* 33:201–217. doi:10.1111/j.1745-4514.2009.00213.x
- Klomklao S, Kishimura H, Yabe M, & Benjakul S (2007b). Purification and characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*). *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol* 147:682–689. doi:10.1016/j.cbpb.2007.04.008
- Kolkovski S (2001). Digestive enzymes in fish larvae and juveniles — implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200 (1–2): 181–201. doi:10.1016/S0044-8486(01)00700-1
- Koshikawa N, Hasegawa S, Nagashima Y, Mitsunashi K, Tsubota Y, Miyata S, Miyazaki, K et al (1998). Expression of Trypsin by Epithelial Cells of Various Tissues, Leukocytes, and Neurons in Human and Mouse. *Am J Pathol* 153(3):937–944. doi:10.1016/S0002-9440(10)65635-0

- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish Protein Hydrolysate: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Crit Rev Food Sci Nutr* 40(1): 43–81. doi:10.1080/10408690091189266
- Ktari N, Ben Khaled H, Nasri R, et al (2012) Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: Purification, characterisation and potential application as a detergent additive. *Food Chem* 130:467–474. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.07.015
- Kurokawa T, Suzuki, T, Ohta H, Kagawa H, & Tanaka H (2002). Expression of pancreatic enzyme genes during the early larval stage of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish Sci* 68:736–744. doi:10.1046/j.1444-2906.2002.00487.x
- Kurtovic I, Marshall SN, Simpson BK (2006) Isolation and characterization of a trypsin fraction from the pyloric ceca of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comp Biochem Physiol-B Biochem Mol Biol* 143:432–440. doi: 10.1016/j.cbpb.2005.12.020
- Lara AR (2011). Producción de Proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(2): 209–223.
- Lilleeng E, Froystad MK, Ostby GC, Valen EC, & Krogdahl A (2007). Effects of diets containing soybean meal on trypsin mRNA expression and activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Comp Biochem Physiol A* 147:25–36. doi:10.1016/j.cbpa.2006.10.043
- Liu CH, Chen YH, & Shiu YL (2013). Molecular characterization of two trypsinogens in the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, and their expression in tissues during early development. *Fish Physiol Biochem* 39:201–214. doi:10.1007/s10695-012-9691-4
- Liu CH, Shiu YL, & Jue-Liang H (2012). Purification and characterization of trypsin from the pyloric ceca of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish Physiol Biochem* 38:837–848. doi:10.1007/s10695-011-9571-3
- Lo MJ, & Weng CF (2006). Developmental regulation of gastric pepsin and pancreatic serine protease in larvae of the euryhaline teleost, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture* 261:1403–1412. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.09.016
- López-Ramírez G, Cuenca-Soria CA, Álvarez-González CA, Tovar-Ramírez D, Perales-García N, Ortiz-Galindo JL, Márquez-Couturier G, Arias-Rodríguez L, Indy JR, Contreras-Sánchez WM, Gisbert E, Moyano FJ (2011). Development of digestive enzymes in larvae of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*, *Fish Physiol Biochem* 37:197–208.

- Lu BJ, Zhou LG, Cai QF, Hara K, Maeda A, Su WJ, & Cao MJ (2008). Purification and characterisation of trypsins from the pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Food Chem* 110(2):352–360. doi:10.1016/j.foodchem.2008.02.010
- Macouzet M, Simpson BK, Lee BH (2005) Expression of a cold- adapted fish trypsin in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res* 5:851–857. doi.org/10.1016/j.femsy r.2005.02.007
- Manchado M, Infante C, Asensio E, Crespo A, Zuasti E, & José Pedro C. (2008). Molecular characterization and gene expression of six trypsinogens in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis Kaup*) during larval development and in tissues. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 149:334–344. doi:10.1016/j.cbpb.2007.10.005
- Martin SA, Caplice NC, Davey GC, & Powell R (2002). EST-based identification of genes expressed in the liver of adult Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Biochem Biophys Res Commun* 293:578–585. doi:10.1016/S0006-291X (02)00263-2
- Mendoza R, Aguilera C, Rodríguez G, González M, & Castro R (2002). Morphophysiological studies on alligator gar (*Atractosteus spatula*) larval development as a basis for their culture and repopulation of their natural habitats. *Rev Fish Biol Fish* 12:133–142. doi:10.1023/A:1025047914814
- Murashita K, Furuita H, Matsunari H, Yamamoto T, Awaji M, Nomura K, Tanaka H et al. (2013). Partial characterization and ontogenetic development of pancreatic digestive enzymes in Japanese eel *Anguilla japonica* larvae. *Fish Physiol Biochem* 39:895–905. doi:10.1007/s10695-012-9749-3
- Murray HM, Gallant JW, Johnson SC, & Douglas SE (2006). Cloning and expression analysis of three digestive enzymes from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) during early development: Predicting gastrointestinal functionality. *Aquaculture* 252:394–408. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.03.030
- Murray HM, Pérez-Casanova JC, Gallant, JW, Johnson SC, & Douglas SE (2004). Trypsinogen expression during the development of the exocrine pancreas in winter flounder (*Pleuronectes americanus*). *Comp Biochem Physiol A* 138:53–59. doi:10.1016/j.cbpb.2004.02.020
- Nasri R, Sila A, Ktari N, Lassoued I, Bougatef A, Karra-Chaabouni M, Nasri M. (2012) Calcium dependent, alkaline detergent-stable trypsin from the viscera of Goby (*Zosterisessor ophiocephalus*): Purification and characterization. *Process Biochem* 47:1957–1964. doi: 10.1016/j.procbio.2012.07.002

- Pálsdóttir HM, Gudmundsdóttir Á (2007) Expression and purification of a cold-adapted group III trypsin in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 51:243–252. doi:10.1016/j.pep.2006.06.008
- Pálsdóttir HM, Gudmundsdóttir Á (2008) The novel trypsin Y from Atlantic cod (*Gadus morhua*) - isolation, purification and characterisation. *Food Chem* 111:408–414. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.04.005
- Pálsdóttir, H. M., & Gudmundsdóttir, Ä. (2004). Recombinant Trypsin Y from Atlantic Cod—Properties for Commercial Use. *J Aquat Food Prod T* doi:10.1300/J030v13n02
- Peña Marín ES (2016). Estudio de la capacidad digestiva proteica en la ontogenia juvenil del pargo flamenco *Lutjanus guttatus*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Mazatlán, Sinaloa, México. 116 pp. Retrieved from [https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/125/1/Peña Marín Emyr Saúl.pdf](https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/125/1/Peña_Marín_Emyr_Saúl.pdf)
- Perales-García N (2009). Ontogenia enzimática digestiva de la mojarra tenguayaca *Petenia splendida*. Tesis de Maestría. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. 94 pp.
- Péres A, Zambonino Infante JL, & Cahú C (1998). Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol Biochem* 19:145–152. doi:10.1023/A:1007775501340
- Pérez NO (2015). Efecto de la optimización del uso de codones sobre el nivel de expresión y condiciones de cultivo en *Escherichia Coli* Recombinante. In XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Jalisco.
- Perez-Casanova, JC, Murray HM, Gallant, JW, Ross NW, Douglas SE, & Johnson SC. (2006). Development of the digestive capacity in larvae of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 251:377–401. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.06.007
- Poonsin T, Sripokar P, Benjakul S, Simpson BK, Visessanguan W, & Klomklao S (2017). Major trypsin like-serine proteinases from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) spleen : Biochemical characterization and the effect of extraction media. *J Food Biochem*. 1–9. doi:10.1111/jfbc.12323
- Ramírez-Custodio CD (2013). Estudio comparativo de proteasas digestivas de dos especies de cíclidos nativos: *Vieja bifasciata* y *Vieja synspila*. Tesis de Licenciatura

- en Biología. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, Mexico. 53 pp.
- Reece RJ (2004). *Analysis of Genes and Genomes*. (W. John & L. Sons, Eds.). England.
- Rønnestad I, Yúfera M, Ueberschär B, Ribeiro L, Saele Ø, & Boglione C (2013). Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. *Rev Aquacult* 5(1): 559–598. doi:10.1111/raq.12010
- Ruan GL, Li Y, Gao ZX, Wang HL, & Wang WM (2010). Molecular characterization of trypsinogens and development of trypsinogen gene expression and tryptic activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and topmouth culter (*Culter alburnus*). *Comp Biochem Physiol B* 155(1):77–85. doi:10.1016/j.cbpb.2009.10.005
- Rungruangsak-Torrissen K, & Sundby A (2000). Protease activities, plasma free amino acids and insulin at different ages of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) with genetically different trypsin isozymes. *Fish Physiol Biochem* 22:337–347. doi: 10.1023/A:1007864413112
- Rungruangsak-Torrissen K, Moss R, Andresen LH, Berg A, & Waagbø R (2006). Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Fish Physiol Biochem* 32(1):7–23. doi:10.1007/s10695-005-0630-5
- Shahidi F, & Janak Kamil YVA (2001). Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends Food Sci Technol* 12(12): 435–464. doi:10.1016/S0924-2244(02)00021-3
- Sila A, Nasri R, Jridi M, Balti R, Nasri M, Bougatef A (2012) Characterisation of trypsin purified from the viscera of Tunisian barbel (*Barbus callensis*) and its application for recovery of carotenoproteins from shrimp wastes. *Food Chem* 132:1287–1295. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.11.105
- Simpson BK (2000) Digestive proteinases from marine animals. In *Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*, N.F. Haard and B.K. Simpson, editors. Marcel Dekker, New York., pp. 531-540.
- Simpson BK, Dauphin L, Smith JP (1992) Recovery and Characteristics of Carotenoprotein from Lobster (*Homarus americanus*) Waste. *J Aquat Food Prod Technol* 1:129–146. doi: 10.1300/J030v01n02
- Souza AAG, Amaral IPG, Santo ARE, Carvalho LB, Bezerra RS (2007) Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). *Food Chem* 100:1429–1434. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.12.016

- Sunde J, Eiane SA, Rustad A, Jensen HB, Opstvedt J, Nygard E, Rungruangsak-Torrissen K et al. (2004). Effect of fish feed processing conditions on digestive protease activities, free amino acid pools, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac Nutr* 10:261–277. doi:10.1111/j.1365-2095.2004.00300.x
- Suzuki T, Srivastava AS, & Kurokawa T (2002). cDNA cloning and phylogenetic analysis of pancreatic serine proteases from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comp Biochem Physiol B* 131:63–70. doi:10.1016/S1096-4959(01)00487-0
- Tavano OL (2013) Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *J Mol Catal B Enzym* 90:1–11. doi: 10.1016/j.molcatb.2013.01.011
- Toledo-Solís FJ (2013). Ontogenia y caracterización de las enzimas digestivas de *Cichlasoma trimaculatum* (mojarra tahuina). Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco. 97 pp.
- Unajak S, Meesawat P, Paemane A, Areechon N (2012) Characterisation of thermostable trypsin and determination of trypsin isozymes from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Food Chem* 134:1533–1541. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.03.074
- Uscanga-Martínez A, Perales-García N, Álvarez-González CA, Moyano FJ, Tovar-Ramírez D, Gisbert GE, Márquez-Couturier G, Contreras-Sánchez, WM, Arias-Rodríguez L, Indy JR (2011). Changes in digestive enzyme activity during initial ontogeny of bay snook *Petenia splendida*. *Fish Physiol Biochem* 37:667–680.
- Villalba-Villalba AG, Pacheco-Aguilar R, Ramírez-Suárez JC, Valenzuela-Soto EM, Castillo-Yañez FJ, & Márquez-Ríos E (2011). Partial characterization of alkaline proteases from viscera of vermiculated sailfin catfish *Pterygoplichthys disjunctivus* Weber, 1991. *J Food Sci Technol* 77:697–705. doi:10.1007/s12562-011-0372-5
- Villamil O, Vaquiro H, Solanilla JF (2017) Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. *Food Chem* 224:160–171. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.12.057
- Wang C, Xie S, Zhu X, Lei W, Yang Y, & Liu J (2006). Effects of age and dietary protein level on digestive enzyme activity and gene expression of *Pelteobagrus fulvidraco* larvae. *Aquaculture* 254:554–562. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.036>
- Younes I, Nasri R, Bkhairia I, Jellouli K, Nasri M (2015) New proteases extracted from red

- scorpionfish (*Scorpaena scrofa*) viscera: Characterization and application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. *Food Bioprod Process* 94:453–462. doi: 10.1016/j.fbp.2014.06.003
- Zamani A, & Benjakul S (2016). Trypsin from unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) pyloric caeca: purification and its use for preparation of fish protein hydrolysate with antioxidative activity. *J Sci Food Agric* 96:962–969. doi:10.1002/jsfa.7172
- Zambonino Infante JL, & Cahu CL (2007). Dietary modulation of some digestive enzymes and Metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. *Aquaculture* 268:98–105. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.032
- Zambonino-Infante JL, Gisbert E, Sarasquete C, Navarro I, Gutiérrez J, & Cahu, CL (2008). Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In J. E. P. Cyrino, D. P. Bureau, & B. G. Kapoor (Eds.), *Feeding and Digestive Functions of Fishes* (1st ed., pp. 281–348). Enfield, N.H. : Science Publishers, 2008. Retrieved from <http://archimer.ifremer.fr/doc/00086/19684/>
- Zhou LZ, Ruan MM, Cai QF, Liu GM, Sun, LC, Su WJ, & Cao MJ (2012). Purification, characterization and cDNA cloning of a trypsin from the hepatopancreas of snakehead (*Channa argus*). *Comp Biochem Physiol B* 161(3):247–254. doi:10.1016/j.cbpb.2011.11.012

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

10. ANEXOS

Anexo I. Carta de Aceptación IV Encuentro Internacional sobre Biotecnología



IV Encuentro Internacional sobre Biotecnología en la UATx

3-6 de diciembre 2017, Tlaxcala, México.

Estimados autores,

Jesús, K. M., Ávila, A., Tovar, D., Jiménez, L.D., Martínez, T., Peña, E.S.
y Álvarez, C. A.,

Les comunicamos que su trabajo titulado "CARACTERIZACIÓN PARCIAL DEL GEN TRIPSINA EN PEJELAGARTO (*Atractosteus tropicus*)" ha sido aceptado para presentarse en la modalidad de cartel de 16:00-18:00 h el día miércoles 6 de diciembre de 2017 en el Centro Cultural Universitario (CCU, campus rectoría, Avenida Universidad No. 1, Col. La Loma Xicoténcatl, Ciudad de Tlaxcala, Tlax., CP. 90070, México), de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, México. Favor de colocar su cartel en la mampara C38 el día miércoles 6 de diciembre a las 8:30 am. Los carteles serán de 120 cm de largo x 90 cm de ancho en PAPEL (No se cuenta con mamparas para colocar carteles de lona), en formato libre, considerando todas las secciones que se incluyeron en el resumen. Al menos uno de los autores deberá estar presente junto a su cartel en el horario indicado para la sesión, y deberá retirar su trabajo al finalizar la misma.

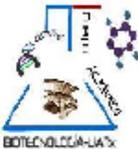
Agradeciendo su valiosa participación, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE,

"Por la Cultura a la Justicia Social"

Tlaxcala, México, a 1 de noviembre de 2017

Dra. Carmen Sánchez
Presidenta del Comité Organizador
IV Encuentro Internacional sobre Biotecnología en la UATx
Tlaxcala, México





IV Encuentro Internacional sobre Biotecnología en la UATx
26 de diciembre 2017, Tlaxcala, México.



CARACTERIZACIÓN PARCIAL DEL GEN TRIPSINA EN PEJELAGARTO (*Atractosteus tropicus*)

Jesús, K. M.^{1*}, Ávila, Á.², Tovar, D.³, Jiménez, L.D.¹, Martínez, T.¹, Peña, E.S.^{1,4} y Álvarez, C. A.¹ ¹Laboratorio de Acuicultura Tropical, DACBIOL-UJAT, Tabasco, México, ²Centro de Investigación, DACS-Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Tabasco, México, ³Laboratorio de Fisiología Comparada y Genómica Funcional, CIBNOR, Baja California Sur, México, ⁴Cátedra-CONACyT.

*e-mail: kristaljc@hotmail.com.

Palabras clave: Acuicultura, Enzimas recombinantes, Tripsinas de peces.

Introducción

El uso de proteínas recombinantes en la nutrición de organismos acuáticos todavía es reducido. Sin embargo, existe un gran potencial para su aplicación en el procesamiento de alimentos, utilizándolas como aditivos, para incrementar la eficiencia de asimilación y sus características nutricionales (1). De las enzimas tipo proteasa, la tripsina es una de las más estudiadas. Se han obtenido extractos enzimáticos que contienen tripsinas a partir de tejidos de diferentes especies de peces (2,3) con el fin de caracterizarlas bioquímica y cinéticamente (4). Hasta el momento, no ha sido estudiada ninguna tripsina pura de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*), ni obtenida de extractos multienzimáticos, ni producida en sistemas recombinantes. El objetivo de este trabajo fue aislar un fragmento del gen que codifica para una tripsina de *A. tropicus* y realizar su caracterización molecular.

Materiales y métodos

Se disectaron 2 especímenes de *A. tropicus*, para obtener tejidos del sistema digestivo, a partir de los cuales se realizó la extracción de ARN total. Se diseñaron un par de oligonucleótidos específicos [TRIPSNG SE AT (5'-TGT CTG CTG CTC ACT GCT ACA-3') y TRIPSNG AS AT (5'-AGG ACA CAA CAC CCT GCA-3')] a partir de las regiones conservadas identificadas en el alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de los tripsinógenos de peces reportadas en el GenBank. A partir del ARN total se amplificó un fragmento del gen mediante la técnica RT-PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados y la ADN polimerasa Platinum[®] Taq DNA (Invitrogen), en un termociclador (BIORAD, CFX96[™]). El fragmento obtenido fue secuenciado en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Resultados

Se obtuvo una secuencia parcial de 419 pb la cual codifica para 138 aminoácidos del propéptido de tripsina. La secuencia parcial de tripsina de *A. tropicus* fue depositada en la base de datos del Gen Bank con el número de acceso KX882028. La secuencia parcial obtenida de *A. tropicus* fue clasificada dentro de la superfamilia de las Serin Proteasas TrypsinLike (Tryp_SPC) y mostró un porcentaje de identidad a nivel de aminoácidos superior al 80% con Tripsinógenos y Tripsinas de diversos peces reportados en el GenBank (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de identidad con tripsinas de diferentes especies de peces.

Especie	Descripción	Identidad (%)
<i>Seriola dumerilii</i> , <i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	Tripsina 3	87-93
<i>Lutjanus fulvus</i> , <i>Thunnus orientalis</i> , <i>Xiphister mucosus</i> ,	Tripsina	85-91
<i>Anopiarctus purpurascens</i> , <i>Epinephelus coioides</i> ,	Tripsinógeno	83-89
<i>Channa argus</i> , <i>Solen senegalensis</i> , <i>Takifugu obscurus</i>	Tripsinógeno 2	82-89

A su vez fue comparado con la secuencia de 2 tripsinas de pejelagarto obtenidas mediante análisis de transcriptómica y se observó un porcentaje de identidad a nivel de aminoácidos de 39.86 y 73.91% indicando que se trata de una enzima diferente. A partir del fragmento obtenido del gen se diseñaron oligonucleótidos para obtener los extremos 3' y 5' por medio de la técnica PCR-RACE. El gen completo será clonado en el vector pBAD/TOPO[®] ThioFusion[™] Expression (Invitrogen) y la enzima recombinante será producida en la cepa de *E. coli* Top10 para caracterizarla bioquímicamente.

Conclusiones. Se obtuvo el gen parcial de una isoforma de Tripsina de *A. tropicus*, distinta a las obtenidas por transcriptómica.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por la Beca CONACYT 173065 y el proyecto Institucional UJAT-2016-PFI-DACS-07.

Bibliografía

- Guerrero, M. Cab, E.L. Galta, L.J. Viader, J.M. 2004. Biotecnología de Proteínas Recombinantes para la Aplicación en Acuicultura. *Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. UANL, Hermosillo, Sonora, México, 16-19 Noviembre, 418-440.
- Bkhaia, I., Ben, H., Ktari, N., Miled, N., Nasri, M., y Ghorbel, S. 2016. Biochemical and molecular characterisation of a new alkaline trypsin from *Liza aurata*: Structural features explaining thermal stability. *Food Chem.* Vol. (196): 1346-1354.
- Khaangsanbam, B. K., y Chakrabarti, R. 2015. Trypsin from the digestive system of carp *Cirrhinus mrigala*: Purification, characterization and its potential application. *Food Chem.* Vol. (175): 386-394.
- Bougataf, A. 2013. Trypsins from fish processing waste: Characteristics and biotechnological applications -Comprehensive review. *J Clean Prod.* Vol. (57): 257-265.



IV ENCUENTRO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGÍA EN LA UATX

3-6 DE DICIEMBRE 2017. TLAXCALA, MÉXICO.

Otorga la presente

CONSTANCIA

A:

Jesús, K. M., Ávila, Á., Tovar D., Jiménez, L.D., Martínez, T., Peña, E.S., Álvarez, C. A.

Por la presentación en cartel del trabajo

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DEL GEN TRIPSINA EN PIELAGARTO (*Atractosteus tropicus*)

al IV Encuentro Internacional sobre biotecnología en la UATX
celebrado en la Universidad Autónoma de Tlaxcala, México los días 3-6 de diciembre de 2017.

Dr. Gerardo Diaz Godínez
Líder del cuerpo académico
de Biotecnología.



Dra. Ma. del Carmen Sánchez Hernández
Presidente del IV Encuentro Internacional
sobre biotecnología



Dr. Rubén Diaz Godínez
Jefe del laboratorio
de Biotecnología.

