

6. Evaluación de la actividad lipolítica intracelular y extracelular de la ostra del Pacífico (*Magallana gigas*)



CAROLINA ESCÁRREGA SÁNCHEZ*

CECILIA ABIGAIL VALENZUELA BAÑUELOS**

DIANA SOSA RUIZ***

RAÚL BALAM MARTÍNEZ PÉREZ****

DOI: <https://doi.org/10.52501/cc.348.06>

Resumen

La ostra del Pacífico (*Magallana gigas*) es un molusco de importancia económica y caracterizado por su gran capacidad para adaptarse a entornos cambiantes de temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, pH y disponibilidad de alimento, entre otros. El éxito de su adaptación a ambientes cambiantes podría deberse a la batería enzimática que posee, capaz de metabolizar diversas biomoléculas, principalmente lípidos, los cuales son de gran relevancia para la supervivencia. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo es evaluar la actividad lipolítica intracelular y extracelular en el músculo y la glándula digestiva de *M. gigas*, respectivamente. Mediante técnicas electroforéticas se pudo observar el perfil de proteína de las proteínas solubles en músculo y glándula digestiva, así mismo, al utilizar un sustrato fluorogénico (4-metilumbeliferil butirato) se evidenciaron cinco bandas con actividad lipolítica en la glándula digestiva y tres en músculo. La actividad lipolítica fue de 270.91 ± 11.96 u/ml en músculo, mientras que en glándula digestiva

* Ingeniera en Biotecnología en el Instituto Tecnológico de Sonora, México. ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-7682-5665> ; correo electrónico: carolina.escarrega212999@potros.itson.edu.mx

** Estudiante de la Licenciatura en Ingeniería Biomédica con una formación técnica como laboratorista clínico, México. ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-0252-5887>

*** Estudiante de la Ingeniería Bioquímica en el Instituto Tecnológico de Colima, con especialidad en Alimentos y Biotecnología, México. ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-2338-5593>

**** Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología. Profesor del Instituto Tecnológico de Sonora, México. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5152-7695> ; Scopus: 57210646749

883.49 ± 6.41 u/ml, al utilizar p-nitrofenil butirato como sustrato, mientras que con p-nitrofenil palmitato fue de 1.19 ± 0.04 u/ml y 15.66 ± 0.31 u/ml para músculo y callo, respectivamente. Los resultados obtenidos en el presente estudio nos ayudan a comprender mejor la batería enzimática que utiliza el organismo durante el metabolismo de lípidos.

Palabras clave: *lipasas, detergentes, actividad lipolítica, emulsión.*

Introducción

La producción de moluscos es un sector de gran importancia para México, pues forma parte del desarrollo económico de las comunidades que se dedican a su explotación, ya sea mediante cultivo o pesca artesanal, lo que posiciona a este grupo de especies como potenciales candidatos al desarrollo tecnológico, además de la aportación monetaria (Conapesca, 2022). Al invertir en investigación y desarrollo en este campo, el país puede fortalecer su posición en acuicultura a nivel nacional e internacional (Chong-Carrillo et al., 2024).

La especie de producción acuícola *Magallana gigas* (anteriormente *Crassostrea gigas*) es conocida coloquialmente como ostión del Pacífico, es originaria del noroeste del continente asiático (Japón, Corea y China), sin embargo, en México la podemos encontrar en el noroeste del país, en las costas de Sonora, Sinaloa, Baja California Norte y Baja California Sur, habita adherida a rocas y conchas, entre otros soportes (FAO, 2024). Esta especie mantiene características peculiares que le permite adaptarse a distintos ambientes de temperatura, puede sobrevivir y desarrollarse en nichos con rangos amplios de temperatura (-2 hasta 35 °C) y salinidad (0 hasta 50 ups) (Chavez-Villalba, 2014). Además, *M. gigas* produce entre 50 y 200 millones de huevos por desove.

Debido que la ostra del pacífico es un organismo que tiene la capacidad de adaptarse a ambientes cambiantes, el estudio de su biología nos ayudaría a comprender su éxito adaptativo, de tal manera que el estudio sobre su metabolismo o las enzimas implicadas en la producción de energía (enzimas digestivas o intracelulares; proteasas, carbohidrasas y lipasas) es

esencial para comprender la particularidad de este organismo, y al mismo tiempo nos proporciona información de interés biotecnológico (González-Bacerio, 2010).

Por tal motivo, el objetivo del presente estudio es llevar a cabo la identificación y cuantificación de la actividad de las enzimas lipolíticas intracelular y digestiva de la ostra del Pacífico, de tal manera que esto pueda ayudarnos a comprender procesos fisiológicos y determinar si las enzimas pueden llegar a tener impacto en alguna biotecnología, por ejemplo, en el proceso de producción de fármacos más selectivos y efectivos, con efectos secundarios menores; producción de detergentes; la obtención de pesticidas de menor toxicidad, mediante la síntesis de compuestos ópticamente puros y la resolución de mezclas cómo ha sido el caos de otras lipasas (Kirchner et al., 1985), entre otros usos.

Metodología

En este apartado se desglosan las técnicas para obtención de los extractos enzimáticos a partir de la glándula digestiva y músculo (callo) y su análisis.

Introducción a la metodología

El método de Bradford es uno de los métodos más usados para la cuantificación de proteína soluble, se basa en la unión del Comassie Blue G-250 a las proteínas para dar la forma azul. El efecto del complejo proteína-colorante se puede visualizar debido al cambio de absorción de 465 nm a 565 nm. El reactivo azul de Comassie G-250 interactúa con residuos de arginina, lisina, tirosina, triptófano y fenilalanina (Lemus-Venezolana y Cortez-Suárez, 2015).

La determinación de actividad proteolítica se basa en que cada enlace peptídico hidroliza peptidasas, al evaluar el progreso de la hidrólisis a 280 nm, de los grupos libres en solución ácida cuando se usa hemoglobina como sustratos y el monitoreo de los grupos azo libres mediante la absorbancia a 366 nm (García-Lagunas, 2014).

Se han desarrollado una variedad de ensayos para cuantificar la actividad hidrolítica de las lipasas en distintas muestras biológicas para revisar su manera de actuar con cada una de ellas, y comparar la cantidad de sustrato consumido y el tiempo empleado para que la liberación de productos ocurra (Camacho et al., 2009). La determinación de actividad lipolítica se basa en la detección del grupo cromóforo (4-nitrofenol) a partir de la hidrólisis del enlace tipo éster de los sustratos sintéticos (*p*-nitrofenil butirato y *p*-nitrofenil palmitato), los cuales se emulsifican con el uso de diferentes detergentes como el taurodesoxicolato de sodio, N-lauril sarcosina y 2-[4-(2,4,4-trimethylpentan-2-il)fenoxi]etanol (NaTDC, NLS y Triton x-100, respectivamente), los cuales intervienen en la formación de micelas a partir de la dispersión de los grandes agregados hidrofóbicos, para organizar los sustratos en solución acuosa (Dandavate et al., 2009). El análisis de la velocidad de liberación de los ácidos grasos puede efectuarse indirectamente mediante el seguimiento de los protones liberados durante la hidrólisis enzimática. El método electroforético es usado para conocer el perfil de enzimas y proteínas, usando geles de poliacrilamida, estos geles sirven como tamiz para las proteínas, para generar así su separación. El gel está compuesto por la acrilamida y monómeros recirculantes que se unen y polimerizan en cadenas largas estructuradas covalentemente.

Las técnicas antes mencionadas nos permiten generar información con el objetivo de evaluar la actividad lipolítica extracelular e intracelular de la ostra del Pacífico (*Magallana gigas*).

Diseño del estudio

El siguiente experimento fue cualitativo y cuantitativo. Inició con la obtención de muestras con pescadores locales; posteriormente, se llevó a cabo la obtención de extractos enzimáticos; y a continuación, su análisis con las metodologías antes mencionadas. El análisis inició con la obtención de los organismos a estudiar. La interpretación de los datos obtenidos en las distintas técnicas dio lugar al ámbito cuantitativo, donde fueron interpretados con herramientas computacionales.

Métodos utilizados

Obtención de las muestras

Las ostras del Pacífico (*Magallana gigas*; $n = 30$) fueron obtenidas de Bahía de Lobos, posteriormente fueron trasladadas a 0 °C al Laboratorio de Biotecnología de Especies Acuáticas, donde se les llevó a cabo un proceso de disección para recuperar el callo (músculo) y hepatopáncreas (glándulas digestivas), posteriormente obtenidos los tejidos, se homogenizaron por separado en una relación 1:4 (tejido/agua destilada) usando un equipo de dispersión de alto rendimiento (Ultraturrax) a 0 °C, con el objetivo de evitar la desnaturalización de las proteínas, posteriormente el extracto se centrifugó durante 30 minutos a 4 °C y 10 000 g, después se recuperó la fase acuosa (extracto enzimático) y se almacenó a -20 °C para su posterior uso.

Cuantificación de proteína soluble

Se determinó la concentración de proteína soluble en las muestras por método de Bradford (1976), al emplear como estándar albumina sérica bovina (BSA).

Actividad proteolítica

Se utilizaron dos sustratos, para condiciones alcalinas se empleó azocaseína al 0.5 % en amortiguador Tris 50 mM pH 8.0, mientras que para condiciones ácidas se empleó hemoglobina al 0.5 % en amortiguador de glicina a 50 mM y pH 4.0. Brevemente se añadieron en tubos de 1.5 ml, 25 µl de extracto enzimático, 250 µl del amortiguador indicado según la actividad enzimática ácida o alcalina; posteriormente, se incubaron a temperatura ambiente (25 °C) durante 60 min. Después, se agregaron 250 µl a de TCA 20 % para parar la reacción y se incubaron por 5 min a -20 °C, a continuación, se centrifugaron a 10 000 g por 10 min. Las muestras que contenían azocaseína como sustrato se leyeron a 366 nm, mientras que las de hemoglobina se leyeron a 280 nm. Las unidades totales de actividad de la proteasa se

expresaron como cambio en la absorbancia por minuto por ml de extracto enzimático.

Ensayo de actividad lipasa/esterasa

La cuantificación de actividad enzimática se basó en la detección del grupo cromóforo (*p*-nitrofenol) por la hidrólisis del enlace éster de los sustratos sintéticos. En una microplaca se depositaron 20 μ l (4.45 mg/ml de proteína) de callo y 20 μ l (10.38 mg/ml de proteína) de glándulas digestivas y se adicionaron 180 μ l de emulsión, la cual consiste en 17 partes de solución amortiguadora (25 mM tris-HCl; 150 mM NaCl; pH 8.0) con 0.5 % de detergente y una parte de sustrato (10 mM *p*-nitrofenol butirato ó *p*-nitrofenol palmitato disuelto en DMSO). Las lecturas se tomaron cada 30 s durante 15 min a 410 nm y 40 °C. Una unidad lipasa corresponde a la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de *p*-nitrofenol por minuto.

Perfil de enzimas lipolíticas

El perfil de proteínas del extracto enzimático fue analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12 %. La migración de las proteínas se llevó a cabo mediante un voltaje de 15 mA a una temperatura de 4 °C. Se utilizó un marcador de bajo peso molecular (BIO-RAD low-range SDS-PAGE standards, 161-0304). Una vez terminada la separación de proteínas, se realizó el zimograma utilizando metilumbeliferil butirato (MUF-butirato) disuelto en DMSO y se visualizó bajo la luz UV.

Consideraciones éticas

Los organismos *Magallana gigas* fueron obtenidos de cooperativas pesqueras, respetando las temporadas de pesca por la Semarnat. Los organismos se adormecieron a 0 °C, posteriormente se llevó a cabo la disección.

Limitaciones del estudio

En el presente estudio, a pesar de ser factible para evaluar la actividad de las enzimas lipolíticas, no fue posible el determinar si todas pertenecían al mismo tipo de carboxilasas.

Resultados y discusión

Actividad proteolítica

Debido a que las enzimas proteolíticas pueden llegar a hidrolizar algunos sustratos sintéticos que se utilizan para cuantificar la actividad lipolítica, se llevó a cabo la medición actividad proteasa. Se logró detectar la actividad proteolítica de los tejidos de la ostra del Pacífico (*Magallana gigas*) en condiciones ácidas en músculo (0.319 u/ml) y en menos proporción en hepatopáncreas (0.02 u/ml), mientras que en condiciones alcalinas se detectó 0.221 u/ml en muestras de músculo y 0.002 u/ml en glándula digestiva. Se ha encontrado presencia de α -quimotripsina en el plasma de la ostra del Pacífico (*Magallana gigas*) (tabla 6.1), la cual puede reconocer y digerir proteolíticamente las proteínas plasmáticas, y llevar la inhibición de las serino proteasa (Oliver et al., 1999). En otros organismos marinos se ha detectado actividad proteolítica ácida atribuida a catepsinas B, L y C, mientras que la actividad alcalina está en función principalmente de tripsinas y quimotripsinas (Rojo-Arreola et al., 2020). Sin embargo, en este estudio, llevado a cabo en condiciones alcalinas (pH 8.0), no se determinaron las enzimas presentes en los extractos, pero se lograron detectar cuatro bandas correspondientes a proteasas en muestra de glándula digestiva y cero bandas de actividad en muestra de músculo (figura 6.1).

Por otro lado, se ha demostrado que *M. gigas* contiene carvotina, lo que le da esa resistencia a la mortalidad. Esta proteína glicosilada con actividad de inhibición de serino-proteasas se asocia con hierro, lo que indica que puede funcionar como agente quelante del hierro, según García-Lagunas (2014), por tal motivo en pH alcalino (hemoglobina) también se presenta actividad.

Tabla 6.1. *Determinación de actividad proteolítica de extractos enzimáticos de la ostra del Pacífico*

<i>Extracto enzimático (M. gigas)</i>	<i>Proteína (mg/ml)</i>	<i>Actividad ácida (u/ml)</i>	<i>Actividad alcalina (u/ml)</i>
Músculo (callo)	2.67	0.319	0.221
Glándulas digestivas (HP)	6.23	0.020	0.002

Fuente: Elaboración propia.

Actividad lipasa/esterasa

La actividad lipolítica del extracto enzimático mostró mayor actividad con *p*-nitrofenil butirato y Tritón x-100 en ambas muestras. Los detergentes tienen la capacidad de afectar la actividad enzimática de las enzimas lipolíticas, además, los estudios realizados indican que la inhibición va directamente con la concentración micelar crítica. Gargouri et al. (1983) hacen hincapié en el hecho que a una proporción dada de detergente/sustrato, el porcentaje de lipasa activa permanece constante, independientemente de la concentración de enzima, lo que demuestra que la superficie lipídica es controlada por las propiedades de la superficie de triglicéridos modificados por detergente a la que se une la enzima, esto se atribuye a la poca actividad lipolítica en conjunto con las sales biliares y a su alta actividad con el detergente Tritón x-100. Cross (1998) explica que la actividad lipasa por los detergentes aniónicos se debe a la habilidad de producir la inhibición de la enzima por desestabilización de su estructura tridimensional. La capacidad de hidrólisis es un mecanismo de distinción entre lipasas y esterases, dependiendo de la longitud de la cadena, por tal motivo la diferencia entre los dos sustratos, en comparación con el *p*-nitrofenol palmitato que mostró muy poca actividad de interacción con este organismo, en cambio como mencionan Del Monte et al. (2003) en su análisis de las lipasas del extracto enzimático de hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei*, se obtuvo mayor cantidad de actividad al aumentar la longitud de la cadena del ácido graso al *p*-nitrofenol, lo que evidencia la presencia de especies enzimáticas específicas hacia esteres cuyos ácidos grasos presentan al menos 8 átomos de carbono. Por el contrario, Chahiniana (2009) señaló que las esterases son selectivas para interactuar con sustratos de cadena corta.

Tabla 6.2. Cuantificación de actividad lipasa/esterasa de extractos de *M. gigas*

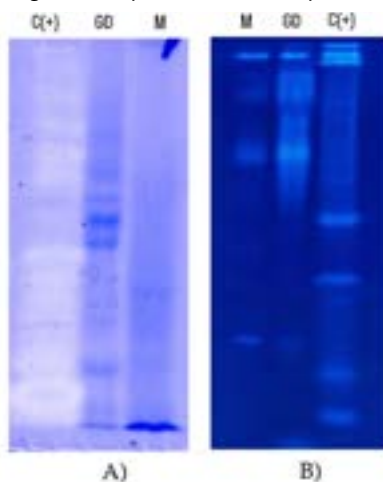
Extracto enzimático (<i>M. gigas</i>)	Actividad enzimática (u/ml)					
	<i>p</i> -NPB			<i>p</i> -NPP		
	NaTDC	NLS	Tritón x-100	NaTDC	NLS	Tritón x-100
Músculo (callo)	139.31 ± 5.41	27.95 ± 1.05	270.91 ± 11.96	4.06 ± 0.17	0.22 ± 0.00	1.19 ± 0.04
Glándulas digestivas (HP)	772.26 ± 21.37	61.48 ± 0.87	883.49 ± 6.41	7.74 ± 0.34	6.09 ± 0.29	15.66 ± 0.31

Fuente: Elaboración propia.

Perfil de lipasas

El perfil de lipasas (zimograma) para la detección de actividad lipasa/esterasa del extracto enzimático está representado en la figura 6.1b. En el primer carril, representado por M, se observó una serie de bandas no tan marcadas, pero que sí demuestran la presencia de enzimas lipolíticas. En el carril del centro nombrado por GD se muestra un bandeo de mayor intensidad confirmando (Casillas-Hernández et al., 2002) que la actividad de lipasa se incrementa para hacer disponibles las reservas lipídicas del hepatopáncreas. Por último, en el carril de la derecha representado por C(+) se aprecia una gran intensidad de bandas.

Figura 6.1. Zimograma del perfil de enzimas lipolíticas y proteolíticas



Nota: A = zimograma para proteasas utilizando caseína como sustrato; B = zimograma para enzimas lipolíticas utilizando MUF-B como sustrato; M = músculo; GD = glándulas digestivas de *M. gigas*; C(+) = hepatopáncreas del camarón azul (*Penaeus stylirostris*).

Fuente: Elaboración propia.

Conclusiones

Mediante las técnicas empleadas se evaluó la actividad lipolítica extracelular e intracelular de la ostra del Pacífico (*Magallana gigas*). Los resultados mostraron que tanto el músculo como la glándula digestiva presentan actividad lipolítica, es esta última, la que presenta mayor actividad, lo que sugiere su papel crucial en la movilización de lípidos para el suministro energético. Se logró determinar que con Tritón x-100 se presentó la mayor actividad lipasas/esterasas en tejidos de *M. gigas*, esto nos indica que este surfactante es idóneo para continuar con el estudio de las enzimas lipolíticas de la ostra del Pacífico. No fue posible determinar el tipo de carboxilasas a las que pertenecen, pero sería de gran interés identificarlas para futuros análisis experimentales.

Referencias

- Camacho, R. M., Mateos, J. C., González-Reynoso, O., Prado, L. A. y Córdova, J. (2009). Production and characterization of esterase and lipase from *Haloarcula marismortui*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(7), 901-909. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0568-1>
- Casillas-Hernández, R., Magallón, F., Portillo, G., Farnés, O., Nolasco, H. y Vega-Villasante, F. (2002). La actividad de proteasa, amilasa y lipasa durante los estadios de muda del camarón azul *Litopenaeus stylirostris*. *Revista de Investigaciones Marinas*, 23(1), 35-40.
- Chahiniana, H. S., L. (2009). Distinction between esterases and lipases: Comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases. *Protein and Peptide Letters*, 16(10), 1149-1161. <https://doi.org/10.2174/092986609789071333>
- Chávez-Villalba, J. (2014). Cultivo de ostión *Crassostrea gigas*: Análisis de 40 años de actividades en México. *Hidrobiología*, 24(3), 175-190. <https://hidrobiologica.izt.uam.mx/index.php/revHidro/article/view/577>
- Chong-Carrillo, O., Aréchiga-Palomera, M., Peña-Almaraz, O. A., Nieves-Rodríguez, K. N., Palma-Cancino, D. J., Kelly-Gutiérrez, L. D., Badillo-Zapata, D., Vargas-Ceballos, M. A. y Vega-Villasante, F. (2024). Scientific research on exotic and native mollusk farming in Mexico according to Scopus. *Revista Agro Productividad*, 17(5), 221-236. <https://doi.org/10.32854/agrop.v17i5.2918>
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. (2022). *Anuario estadístico de acuacultura y pesca 2022*. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. <https://nube.conapesca>

- gob.mx/sites/cona/dgppe/2022/ANUARIO_ESTADISTICO_DE_ACUACULTURA_Y_PESCA_2022.pdf
- Cross, J. (Ed.). (1998). *Anionic surfactants: Analytical chemistry* (2ª ed.). CRC. <https://doi.org/10.1201/9780367813130>
- Dandavate, V., Jinjala, J., Keharia, H. y Madamwar, D. (2009). Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. *Bioresource Technology*, 100(13), 3374-3381. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.011>
- Del Monte, A., Forrellat, A., Nolasco, H., Estévez, T., Boburg, B., Díaz, J. y Carrillo, O. (2003). *Aislamiento y caracterización de lipasas en el hepatopáncreas de Litopenaeus vannamei*. II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (CIVA 2003).
- García-Lagunas, N. (2014). Cambios en la expresión génica de juveniles de *Crassostrea gigas* ante su exposición al dinoflagelado productor de toxinas paralizantes *Gymnodinium catenatum*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Gargouri, Y., Julien, R., Bois, A. G., Verger, R. y Sarda, L. (1983). Studies on the detergent inhibition of pancreatic lipase activity. *Journal of Lipid Research*, 24(10), 1336-1342. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)37884-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)37884-6)
- González-Bacerio, J., Moreno-Medina, V. R. y Del Monte Martínez, A. (2010). Las lipasas: Enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 113-140.
- Kirchner, G., Scollar, M. P. y Klibanov, A. M. (1985). Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. *Journal of the American Chemical Society*, 107(24), 7072-7076. <https://doi.org/10.1021/ja00310a052>
- Lemus-Venezolana, M. J. y Cortez-Suárez, L. A. (2015). *Bioquímica general: Fundamentos y análisis de laboratorio*. Universidad Técnica de Machala.
- Neves, M. I. L., Silva, E. K. y Meireles, M. a. A. (2021). Natural blue food colorants: Consumer acceptance, current alternatives, trends, challenges, and future strategies. *Trends in Food Science & Technology*, 112, 163-173. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.023>
- Oliver, J. L., Lewis, T. D., Faisal, M. y Kaattari, S. L. (1999). Analysis of the effects of *Perkinsus marinus* proteases on plasma proteins of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 74(2), 173-183. <https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4879>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Pesca. (2024). *Programa de información de especies acuáticas: Magallana gigas (Thunberg 1793)*. https://www.fao.org/fishery/es/culturedspecies/crassostrea_gigas_es/es
- Rojo-Arreola, L., García-Carreño, F., Romero, R. y Díaz-Domínguez, L. (2020). Proteolytic profile of larval developmental stages of *Penaeus vannamei*: An activity and mRNA expression approach. *PLoS ONE*, 15(9), e0239413. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239413>