

## Actividad enzimática de proteasas de *Cyprinus carpio* (Cypriniformes: Cyprinidae) extraídas de una laguna contaminada en México

Arisaí C. Hernández-Sámamo<sup>1</sup>, Xochitl Guzmán-García<sup>1</sup>, Raquel García-Barrientos<sup>2</sup> & Isabel Guerrero-Legarreta<sup>1\*</sup>

1. Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Ciudad de México, 09340, México; arizai5@hotmail.com, xochitlguga@gmail.com, isabel\_guerrero\_legarreta@yahoo.com
2. Universidad Politécnica de Tlaxcala, Avenida Universidad Politécnica 1, Tlaxcala, 90180, México; raquelgaba@hotmail.com

Recibido 24-V-2016. Corregido 10-I-2017. Aceptado 26-I-2017.

**Abstract: Enzymatic activity of proteases from *Cyprinus carpio* (Cypriniformes: Cyprinidae) captured in a polluted lagoon in Mexico.** Common carp (*Cyprinus carpio*) is an aquatic organism of commercial value able to survive in polluted environments; carps contain proteolytic enzymes of physiological importance and potential industrial application. The objective of this work was partially purify and study the proteolytic activity at different pH of carp proteases living in a polluted environment. Three carps were captured in different zones of Zumpango polluted lagoon (Mexico) at 1 m of maximum deep. Protease crude extracts were obtained from dorsal muscle by aqueous extraction and fractionated by 20 %, 50 %, 80 %-saturated (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Fractions extracted with 50 % and 80 %-saturated (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> were selected for their high proteolytic activity and concentrated by ultrafiltration through 100 kDa molecular weight cutoff membranes and analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The crude proteolytic extract had significantly higher activity (19.7 - 20.3 U / mg) at pH 2, 5, and 7 (P < 0.001). Fractions obtained with 20 %, 50 % and 80 % - saturated (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> showed peak activity at pH 5 (2.8 U / mg) and pH 6 (2.2 U / mg); pH 6 (4.3 U / mg) and pH 3 - 4 (3.6 - 3.7 U / mg); pH 3 (10.8 U / mg) and pH 10 (10.6 U / mg); respectively. Subfractions of < 100 kDa, obtained with 50 % and 80 %-saturated (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> had peak proteolytic activity at alkaline pH. A < 100 kDa fraction, obtained with 80 %-saturated (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> had the highest proteolytic activity (37.3 - 43.7 U / mg) at pH 8 - 10, purification factor of 3 and 19.1 % recovery. Thirteen proteins between 9.8 to 104.8 kDa were identified in the crude extract. Peak protein concentration was observed for 31 - 33 and 39 - 41 kDa, suggesting the possibility predominance of serine- and aspartyl- proteases, respectively. We suggest this protease with maximum activity at alkaline pH is related to the adaptation of *C. carpio* to polluted waters with high pH. Although unsuitable for human consumption, these organisms can be a source of protease production aimed to several uses as in the industry and waste water treatment among others. Rev. Biol. Trop. 65 (2): 589-597. Epub 2017 June 01.

**Key words:** common carp, *Cyprinus carpio*, proteases, contaminated water, lagoon.

La carpa común (*Cyprinus carpio*) pertenece a la familia Cyprinidae. Dichos organismos habitan principalmente en corrientes medias y bajas de los ríos, en áreas inundadas y en aguas confinadas poco profundas como lagos y lagunas (Peteri, 2004). La carpa es una de las especies de agua dulce más cultivadas en el mundo, reportándose un 10 % del total de la producción global de acuicultura

de agua dulce en 2014; México se encuentra entre los países productores de *C. carpio* más importantes de América con 8 001 toneladas (FAO, 2015). La carpa está ampliamente distribuida en el territorio mexicano, dada su gran adaptabilidad y capacidad reproductiva. En la laguna de Zumpango (19°47'25" N-99°7'51" W) ubicada al norte de la Cuenca del Valle de México (municipio de Zumpango, Estado

de México), tradicionalmente se han obtenido carpas para consumo local. Sin embargo, en la actualidad existe una fuerte problemática ambiental por la descarga de aguas residuales. A pesar de las condiciones ambientales, dicha laguna funciona como vaso regulador y de almacenamiento de agua pluvial. La Comisión Nacional del Agua en México (CONAGUA) no ha detectado la presencia de metales pesados cancerígenos en este cuerpo de agua, aunque estableció que no era apta para consumo humano, con base en la detección de coliformes, de acuerdo con los límites máximos permisibles por la norma mexicana NOM-127-SSA1-1994 (IMTA, 2012).

Por otra parte, se ha enfocado el interés de grupos de investigación e industriales en las proteasas de organismos acuáticos (enzimas que catalizan la rotura de enlaces peptídicos con la participación de moléculas de agua como reactivos), dado que poseen características proteolíticas particulares, como mayor eficiencia catalítica y estabilidad a bajas temperaturas de reacción, entre otras (Haard & Simpson, 2000). En términos de aplicaciones industriales, las proteasas son de las enzimas más ampliamente utilizadas, por ejemplo, en la industria de alimentos para la producción de hidrolizados de proteínas, reducción de viscosidad, fabricación de quesos, en la industria de detergentes y piel, así como en aplicaciones farmacéuticas tales como medicamentos digestivos y anti-inflamatorios (Zhang & Kim, 2010). Adicionalmente, el conocimiento de proteasas de especies acuáticas es útil en acuicultura para el entendimiento de la fisiología, bioquímica y alimentación del organismo. En condiciones *in vivo*, la capacidad de los peces para digerir proteína, así como su absorción o asimilación, depende de la presencia y la calidad de las enzimas proteolíticas (González-Zamorano, Navarrete, & García-Carreño, 2013). Además, las proteasas influyen en la textura del pescado durante su manipulación y almacenamiento *postmortem*. Este deterioro limita la vida útil del producto (Sriket, 2014), motivo de estudio en varias especies como *C. carpio* (Haard & Simpson, 2000; Kumar, García-Carreño, Chakrabarti, Toro, &

Córdova-Murueta, 2007; Klomkloa, 2008). La actividad de las proteasas puede afectarse por el hábitat donde se desarrollan los organismos acuáticos (Fu et al., 2006). Una de las características importantes que presentan los lagos y lagunas contaminados es la elevación del pH del agua (Aguilar-Ibarra, 2010), por lo que el objetivo del presente estudio fue purificar parcialmente y determinar la actividad proteolítica a diferente pH de proteasas de *C. carpio* capturadas en la laguna contaminada de Zumpango (México), que determinarían una posible adaptación de los organismos a este medio en el que se desarrollan, y visualizar un posible uso de estas enzimas en algunas industrias.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Reactivos:** Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma Chemicals (San Luis, Misuri, Estados Unidos): caseína, hemoglobina, albúmina sérica bovina y sulfato de amonio; los marcadores de proteínas de alto peso molecular se compraron a Bio-Rad (Richmond, California, Estados Unidos). Todos los otros reactivos empleados fueron de grado analítico.

**Captura de los especímenes y preparación de muestras:** Se capturaron tres carpas (*Cyprinus carpio*) de 32.2 cm de longitud (Desviación estándar, SD = 2.3 cm, n = 3) y 1 kg de peso (SD = 0.1 kg, n = 3) durante marzo 2013. La temperatura promedio fue de 25.6 °C, en diferentes zonas hacia el sur de la laguna de Zumpango (19°47'25" N - 99°7'51" W), a una profundidad máxima de 1 m. Las carpas fueron sacrificadas por ahogamiento fuera del agua en hielo, e inmediatamente transportadas en hielo por 2 h, se diseccionaron muestras del músculo dorsal del tronco (de los laterales o filetes) y se conservaron a -25 °C hasta su utilización en el mismo año de captura de los organismos.

**Obtención de extracto proteolítico crudo:** Se homogeneizaron 60 g de músculo dorsal de carpa con 120 mL de amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7. El homogeneizado se centrifugó a 10000 xg por 30 min,

a 4 °C (Hernández-Sámamo et al., 2015). Se separó el sobrenadante para los análisis de actividad proteolítica.

**Obtención de fracciones proteolíticas:** Las proteínas del extracto crudo obtenido se precipitaron con sulfato de amonio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  saturado a 20 %, 50 % y 80 %. Se saturó el extracto proteolítico crudo con las siguientes cantidades de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 113 g para saturar a 20 %, 188 g para 50 %, y 210 g para 80 % (Scopes, 1994). Esta adición se llevó a cabo en forma gradual hasta disolverse, dejándose en agitación lenta por 12 h a 4 °C. Posteriormente, las fracciones obtenidas se centrifugaron a 10 000 xg por 20 min a 4 °C. El precipitado obtenido de cada fracción se disolvió en amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7 (1:2, precipitado:amortiguador) y se dializó contra agua desionizada durante 48 h a 4 °C, con recambios de agua cada 8 h. El análisis de actividad proteolítica se llevó a cabo con las fracciones obtenidas.

**Obtención de fracciones parcialmente purificadas:** Las fracciones obtenidas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado a 50 % y 80 % fueron seleccionadas debido a su alta actividad proteolítica y se ultrafiltraron en tubos Amicon Ultra-15 con membranas de corte molecular (MWC) de 100 kDa Ultracel-100 (Millipore, Cork, Irlanda), centrifugando a 10 000 xg por 30 min a 4 °C. Las fracciones parcialmente purificadas (subfracciones con peso molecular mayor y menor a 100 kDa) fueron utilizadas para los análisis de actividad proteolítica.

**Determinación de concentración de proteína:** La cantidad de proteína en el extracto proteolítico crudo y las fracciones obtenidas, se determinó por el método colorimétrico de biuret (Robinson & Hogden, 1940). Un mililitro del extracto proteolítico o fracciones parcialmente purificadas se mezcló con 3 mL de reactivo de biuret y se dejó reaccionar por 20 min en oscuridad. Posteriormente, se midió la absorbancia a 540 nm y se calculó la concentración de proteína utilizando una curva estándar

de albúmina sérica bovina obtenida con el mismo método (Robinson & Hogden, 1940).

**Análisis de actividad proteolítica a diferente pH:** Se determinó la actividad proteolítica a diferente valor de pH, de pH 2 hasta pH 10. La actividad proteolítica a pH de 2 a 5 se determinó mediante hidrólisis de hemoglobina al 1 % (p / v) en solución de ácido bórico 0.025 M, ácido fosfórico 0.025 M, y ácido acético 0.25 M, mientras que la actividad proteolítica a pH de 6 a 10 se determinó mediante hidrólisis de caseína al 1 % (p / v) en amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7. Para la reacción enzimática se colocaron 250  $\mu\text{L}$  de extracto proteolítico crudo o fracciones parcialmente purificadas y 1 mL de sustrato (caseína para ensayos a pH 2 - 5 y hemoglobina para ensayos a pH 6 - 10) al pH correspondiente, la mezcla se incubó por 15 min a 37 °C; la reacción se detuvo con 0.5 mL de ácido tricloroacético al 25 % (p / v). Las muestras fueron centrifugadas a 10 000 xg por 10 min y se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm. Los resultados se reportaron como actividad específica (U / mg proteína) utilizando los valores de concentración de proteína obtenidos anteriormente. Una unidad de actividad proteolítica (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para cambiar la absorbancia 0.001 unidad/min a 280 nm en las condiciones experimentales definidas, por lo tanto:  $U = (\text{Abs}_{280\text{nm}}) * (\text{factor dilución}) / (0.001) * (\text{tiempo de reacción en minutos})$  (Hernández-Sámamo et al., 2015).

**Análisis electroforético:** La presencia de proteínas en los extractos proteolíticos se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de acuerdo al método reportado por Laemmli (1970). Se utilizaron geles de separación de poliacrilamida al 10 - 12 % y geles de concentración al 4 - 5 %, llevándose a cabo en celdas de electroforesis Mini-Protean II de Bio-Rad (Hércules, California, Estados Unidos). Las proteínas del extracto proteolítico o fracciones parcialmente purificadas se desnaturalizaron mediante ebullición por 1 min. Se aplicaron

5 mg/mL de la muestra desnaturizada y un marcador de peso molecular de 200 a 45 kDa [miosina (200 kDa),  $\beta$ -galactosidasa (116.2 kDa), fosforilasa b (97.4 kDa), albúmina sérica bovina (66.2 kDa), y ovoalbúmina (45 kDa)] (Bio-Rad). El análisis se llevó a cabo a voltaje constante de 150 V, 30 mA, y 4 °C. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 al 0.1 % (p / v) en una solución 40 % (v / v) metanol y 10 % (v / v) ácido acético. El análisis de imágenes se llevó a cabo con el sistema de documentación Gel-Doc 2000 (Bio-Rad) y el software Quantity One (versión 4).

Los resultados se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de

medias por la prueba de Tukey, y se empleó el paquete estadístico SPSS para Windows (Versión 15). El número de muestras fue de 3 (n = 3). Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado reportándose los valores medios. El nivel de significancia fue  $P < 0.05$ .

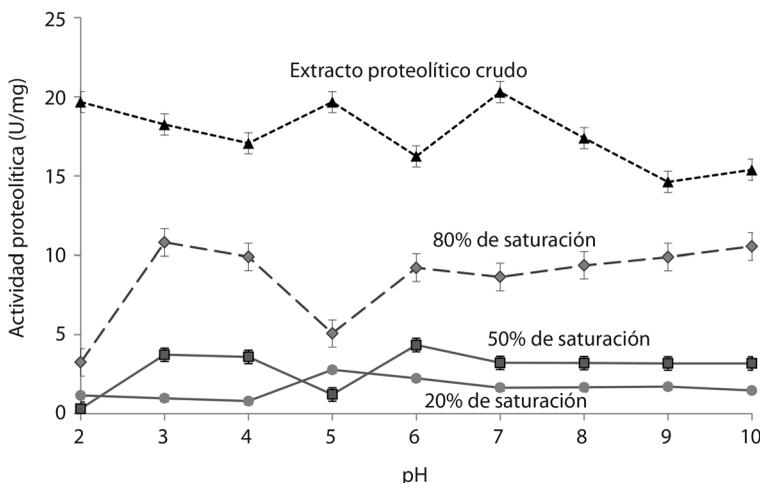
## RESULTADOS

La concentración de proteína del extracto crudo obtenido del músculo dorsal de *C. carpio* fue de 15.8 mg / mL (Cuadro 1), y la actividad proteolítica máxima ( $p < 0.001$ ) se obtuvo a pH 2, 5, y 7 con valores de actividad de 19.7 - 20.3 U / mg (Fig. 1).

CUADRO 1  
Purificación parcial de proteasas del músculo dorsal de *C. carpio*

TABLE 1  
Purification of proteases obtained from *C. carpio* dorsal muscle

Paso de purificación	Concen-tración (mg / mL)	Actividad (U), pH 9	Actividad específica (U / mg), pH 9	Porcentaje de recuperación (%)	Factor de purificación
Extracto crudo	15.8	57.9	14.6	100.0	1.0
Fracción precipitada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado a 80 %	11.9	29.3	9.9	50.6	0.7
Subfracción < 100 kDa de la fracción precipitada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado a 80 %	1.0	11.1	43.7	19.1	3.0



**Fig. 1.** Actividad proteolítica a diferente pH (a 37 °C) del extracto proteolítico crudo y de fracciones obtenidas por fraccionamiento con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (20 %, 50 % y 80 % de saturación) a partir del músculo dorsal de *C. carpio*. Los resultados son valores medios de tres determinaciones llevadas a cabo por triplicado (n = 3).

**Fig. 1.** Proteolytic activity versus pH (at 37 °C) of crude extracts and fractions obtained with 20 %, 50 % and 80 %-saturated  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  from *C. carpio* dorsal muscle. The data represent mean values.

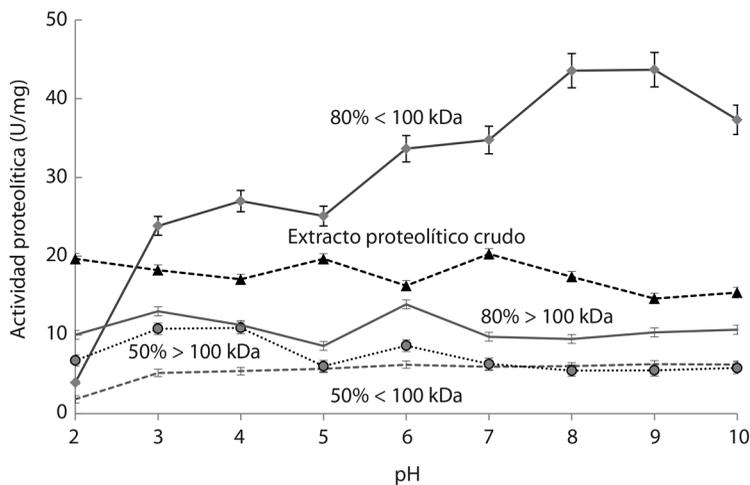
La fracción obtenida por precipitación con sulfato de amonio saturado a 20 % presentó una actividad proteolítica óptima ( $p < 0.001$ ) a pH 5 (2.8 U / mg) y a pH 6 (2.2 U / mg) (Fig. 1); mientras que la fracción saturada a 50 % tuvo una actividad proteolítica máxima ( $p < 0.001$ ) a pH 6 (4.3 U / mg) y a pH 3 - 4 (3.6 - 3.7 U / mg) (Fig. 1). La fracción saturada a 80 % tuvo una concentración de proteína de 11.9 mg / mL (Cuadro 1) y actividad máxima ( $p < 0.001$ ) a pH 3 y pH 10 con valores de actividad de 10.8 y 10.6 U / mg, respectivamente (Fig. 1).

La fracción proteolítica obtenida con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado a 80 % tuvo la mayor actividad proteolítica en el intervalo de pH 3 - 10, con actividad específica de 5.1 a 10.8 U / mg (Fig. 1), comparado con la actividad proteolítica de las otras fracciones estudiadas, pero menor a la actividad proteolítica del extracto crudo.

La actividad proteolítica de las subfracciones menores a 100 kDa obtenidas por ultrafiltración a partir de las fracciones precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado a 50 % y 80 % tuvieron máximos a pH 6 - 10 y pH 8 - 10, respectivamente (Fig. 2). La subfracción menor

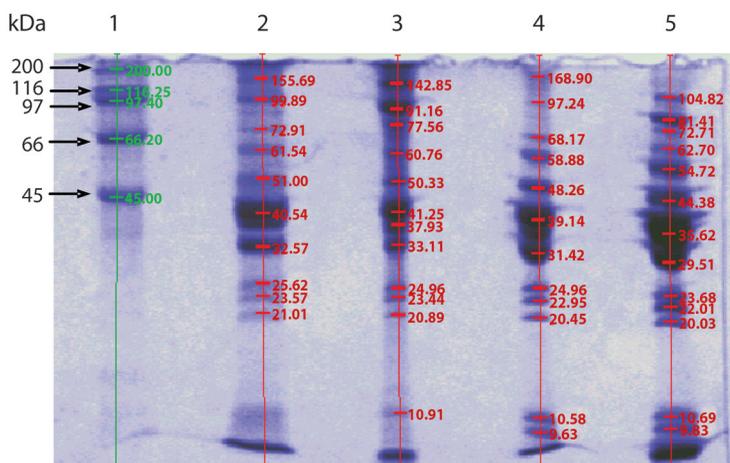
a 100 kDa de la fracción precipitada con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado a 80 % tuvo la mayor actividad proteolítica, incluidas todas las subfracciones y el extracto crudo; esta actividad fue a pH 3 - 10 (23.9 - 43.7 U / mg) (Fig. 2), y actividad óptima ( $p < 0.001$ ) a pH 8 - 10 (37.3 - 43.7 U / mg), con una concentración de proteína de 1 mg / mL, un factor de purificación de 3 y 19.1 % de recuperación (Cuadro 1).

El análisis electroforético (SDS-PAGE) del extracto proteolítico crudo identificó 13 proteínas entre 9.8 - 104.8 kDa, de las cuales las proteínas de 29.5 y 35.6 kDa se encontraron en mayor concentración (Fig. 3). De forma similar al extracto proteolítico crudo, las tres fracciones precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  presentaron mayor concentración de las proteínas de 31 - 33 y 39 - 41 kDa (Fig. 3). Sin embargo, la fracción precipitada con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado a 50 % tuvo alta concentración de proteínas de 91.2 y 142.9 kDa. Además, se observó que proteínas de 10.7 kDa presentes en el extracto proteolítico crudo no precipitaron con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado a 20 %, mientras que las proteínas de 9.8 kDa del extracto crudo no precipitaron a 20 % y 50 % de saturación.



**Fig. 2.** Actividad proteolítica a diferente pH (37 °C) del extracto proteolítico crudo y de fracciones parcialmente purificadas (subfracciones obtenidas por ultrafiltración con membranas de 100 kDa a partir de fracciones precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado a 50 % y 80 %) del músculo dorsal de *C. carpio*. Los resultados son valores medios de tres determinaciones llevadas a cabo por triplicado ( $n = 3$ ).

**Fig. 2.** Proteolytic activity at different pH (37 °C) of crude extract and partially purified from *C. carpio* dorsal muscle fractions (subfractions obtained by 20 %, 50 % and 80 %-saturated  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fractions ultrafiltered through 100 kDa membranes). The data represent mean values.



**Fig. 3.** Perfil electroforético (SDS-PAGE) del extracto proteolítico crudo y de fracciones obtenidas por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a partir del músculo dorsal de *C. carpio*. 1. Marcador estándar molecular; 2. Fracción precipitada con 20 % de saturación; 3. Fracción precipitada con 50 % de saturación; 4. Fracción precipitada con 80 % de saturación; 5. Extracto proteolítico crudo.

**Fig. 3.** SDS-PAGE of crude proteolytic extract and 20 %, 50 % and 80 %-saturated  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fractions from *C. carpio* dorsal muscle. 1. Molecular weight marker; 2. 20 %-saturated fraction; 3. 50 %-saturated fraction; 4. 80 %-saturated fraction; 5. Crude extract.

## DISCUSIÓN

Las enzimas proteolíticas o proteasas de *C. carpio* han sido caracterizadas por diferentes autores debido a que es una especie de importancia comercial (Haard & Simpson, 2000). Se han reportado estudios proteolíticos en carpa donde se determinaron óptimos de actividad proteolítica a pH 2.7 - 3.7 para aspartil proteasas del músculo (Goldman-Levkovitz, Rimón, & Rimón, 1995), a pH 2.5 para catepsinas D (Liu, Wang, & Zhang, 2008), y actividad proteolítica máxima a pH de 5.5 a 6.5 para cisteín proteasas del hepatopáncreas (Aranishi, Hara, Osatomi, & Ishihara, 1997), que concuerdan con lo obtenido en este estudio para proteasas con actividad a pH ácido. Además, la actividad proteolítica a pH ligeramente básico (pH 8) coincidió con lo reportado por Osatomi, Sasai, Cao, Hara y Ishihara (1997) quienes encontraron serín proteasas del músculo de *C. carpio* con actividad óptima a pH 8. Sin embargo, los extractos estudiados presentaron actividad proteolítica a pH más alcalino (pH 9 - 10) difiriendo con la bibliografía para proteasas

de *C. carpio*, donde se reportó un decremento significativo de la actividad proteolítica a partir de pH 6.5 - 7 (Goldman-Levkovitz et al., 1995; Aranishi et al., 1997). No es de nuestro conocimiento que se haya reportado alta actividad proteolítica de las proteasas de carpa común a pH mayor a ocho, por lo que en el presente estudio se sugirió una adaptación de las proteasas de *C. carpio* al alto pH alcalino del agua contaminada de la laguna de Zumpango. De acuerdo con estudios realizados en este cuerpo de agua por el Comité de Sanidad Acuícola del Estado de México A.C. se detectaron niveles de riesgo de pH, determinando un pH de 9.7 (IMTA, 2012); el intervalo normal de pH del agua es de 6.5 a 8.4, valores de pH fuera de este intervalo son una advertencia de que la calidad del agua es anormal. Regularmente, el pH es una medida de rutina en la evaluación de la calidad del agua (Pescod, 1992). Sin embargo, y a pesar del grado de contaminación del agua, en la actualidad existen proyectos de recuperación de la laguna de Zumpango para recreación y pesca (IMTA, 2012). Por otra parte, existen diversos estudios acerca de proteasas

adaptadas a pH alcalino (Siddiqui & Torsten, 2008), además se ha demostrado que algunas proteasas acuáticas tienen características específicas como actividad catalítica significativa y estabilidad a pH alcalino, entre otras (Haard & Simpson, 2000).

Las proteínas identificadas por SDS-PAGE coincidieron con lo reportado para serín proteasas de 30 kDa (Goldman-Levkovitz et al., 1995) y aspartil proteasas de 36 kDa (Osatomi et al., 1997), así mismo fue similar a lo encontrado para cisteín proteasas (catepsinas) de *C. carpio* descritas como 2 bandas de 23 - 26 y 27 - 30 kDa (Aranishi et al., 1997). Por lo tanto, se sugirió la posible predominancia de serín y aspartil proteasas en el músculo dorsal de los especímenes de *C. carpio* de la laguna de Zumpango y específicamente, serín proteasas con alta actividad a pH alcalino, concordando con el ensayo de actividad proteolítica. Las proteasas con alta actividad a pH básico destacan por su importancia en la industria, en acuicultura (Córdova-Murueta, Navarrete del Toro, & García-Carreño, 2016), e incluso para el tratamiento de aguas residuales (Facchin et al., 2013). Sobre esta última aplicación, se ha reportado que las proteínas son de los principales contaminantes orgánicos en el agua residual, además de polisacáridos y lípidos, por lo que una propuesta es el uso de enzimas proteolíticas exógenas para hidrolizar dichas proteínas contaminantes a unidades más pequeñas. Proteasas microbianas se han utilizado en el tratamiento de residuos de varias industrias de elaboración de alimentos para solubilizar los residuos proteicos y reducir la demanda biológica de oxígeno de los sistemas acuáticos (Gupta, Beg, & Lorenz, 2002). Una característica importante, es que las enzimas para el tratamiento de aguas residuales no requieren de una purificación alta y por lo tanto presentan un bajo costo de producción (Facchin et al., 2013).

Se obtuvo una fracción proteolítica parcialmente purificada a partir del músculo dorsal de *C. carpio* con máxima actividad proteolítica a pH alcalino, lo que hasta el momento no se ha reportado en ésta especie acuática, por lo tanto, nosotros sugerimos que la presencia de

dichas proteasas alcalinas está relacionada con la adaptación de la carpa al agua contaminada de la laguna de Zumpango. Aunque estos peces son inadecuados para el consumo humano, pueden ser empleados como materia prima para la producción de proteasas destinadas a varias industrias, incluido el tratamiento de aguas residuales.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) por una beca de posgrado otorgada a la primera autora en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

## RESUMEN

La carpa común (*Cyprinus carpio*) es un organismo acuático de valor comercial que puede sobrevivir en ambientes contaminados; la carpa contiene enzimas proteolíticas de importancia fisiológica y potencial aplicación industrial. El objetivo de este estudio fue purificar parcialmente y determinar la actividad proteolítica a diferente pH de proteasas de carpas colonizando un ambiente contaminado. Se capturaron tres carpas en diferentes zonas de la laguna contaminada de Zumpango (México) a 1 m de profundidad máxima. El extracto crudo se obtuvo del músculo dorsal mediante extracción acuosa y se fraccionó con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado a 20 %, 50 % y 80 %. Posteriormente, se seleccionaron las fracciones obtenidas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado a 50 % y 80 % por su alta actividad proteolítica, se concentraron por ultrafiltración con membranas de corte de peso molecular de 100 kDa, y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). La actividad proteolítica del extracto crudo fue significativamente mayor (19.7-20.3 U / mg) a pH 2, 5, y 7 ( $P < 0.001$ ). Las fracciones obtenidas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado a 20 %, 50 % y 80 % presentaron actividades proteolíticas óptimas a pH 5 (2.8 U / mg) y pH 6 (2.2 U / mg); pH 6 (4.3 U / mg) y pH 3-4 (3.6 - 3.7 U / mg); pH 3 (10.8 U / mg) y pH 10 (10.6 U / mg); respectivamente. Las subfracciones con peso molecular < 100 kDa obtenidas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado a 50 % y 80 % tuvieron máxima actividad proteolítica a pH alcalino. La subfracción < 100 kDa, obtenida con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado a 80 % tuvo la mayor actividad proteolítica (37.3-43.7 U / mg) a pH 8-10, factor de purificación de 3 y 19.1 % de recuperación. Trece proteínas entre 9.8 a 104.8 kDa se identificaron en el extracto proteolítico crudo. Las proteínas de 31 - 33 y 39 - 41 kDa tuvieron la concentración más alta en las fracciones estudiadas, sugiriendo la posible predominancia de serín

y aspartil proteasas, respectivamente. Nosotros sugerimos que la presencia de proteasas con máxima actividad a pH alcalino está relacionada con la adaptación de *C. carpio* a aguas contaminadas con pH alto. Aunque estos peces son inadecuados para el consumo humano, pueden ser empleados como materia prima para la producción de proteasas destinadas para varias industrias, incluido el tratamiento de aguas residuales.

**Palabras clave:** carpa común, *Cyprinus carpio*, proteasas, agua contaminada, laguna.

## REFERENCIAS

- Aguilar-Ibarra, A. (2010) *Calidad del agua: un enfoque multidisciplinario*. México: Editorial UNAM.
- Aranishi, F., Hara, K., Osatomi, K., & Ishihara, T. (1997). Cathepsins B, H and L in Peritoneal Macrophages and Hepatopancreas of Carp *Cyprinus carpio*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 117(4), 605-611.
- Córdova-Murueta, J. H., Navarrete-del-Toro, M. A., & García-Carreño, F. L. (2016). Advances in the study of activity additivity of supplemented proteases to improve digestion of feed protein by *Penaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 1-8. doi: 10.1111/anu.12408
- Facchin, S., Diniz Alves, P. D., De Faria Siqueira, F., Moura Barroca, T., Netto Victória, J. M., & Kalapothakis, E. (2013). Biodiversity and secretion of enzymes with potential utility in wastewater treatment. *Open Journal of Ecology*, 3(1), 34-47.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2015) *Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service*. Retrieved from <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en>
- Fu, X., Xue, C., Miao, B., Li, Z., Gao, X., & Hirata, T. (2006). Distribution and seasonal activity variation of proteases in digestive tract of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Fisheries Science*, 72, 1130-1132.
- Goldman-Levkovitz, S., Rimon, A., & Rimon, S. (1995). Purification properties and specificity of cathepsin D from *Cyprinus carpio*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 112(1), 147-151.
- González-Zamorano, M., Navarrete del Toro, M. A., & García-Carreño, F. L. (2013). Exogenous proteinases as feed supplement for shrimp: in vitro evaluation. *Aquaculture Nutrition*, 19, 731-740.
- Gupta, R., Beg, Q. K., & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 15-32. doi: 10.1007/s00253-002-0975-y
- Haard, N. F., & Simpson, B. K. (2000) *Seafood enzymes: utilization and influence on postharvest seafood quality*. USA: Marcel Dekker.
- Hernández-Sámamo, A. C., Guzmán-García, X., García-Barrientos, R., Ascencio-Valle, F., Sierra-Beltrán, A., Vallejo-Córdoba, B., ... Guerrero-Legarreta, I. (2015). Extraction and characterization of sea cucumber *Isostichopus fuscus* proteases, collected at the Gulf of California, Mexico. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14, 35-47.
- Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA). (2012) *Plan estratégico para la recuperación ambiental de la Laguna de Zumpango. Diagnóstico e identificación de retos, problemas, estrategias, objetivos, acciones y proyectos prioritarios*. México: Fundación Gonzalo Río Arronte.
- Klomklao, S. (2008). Digestive proteinases from marine organisms and their applications. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 30(1), 37-46.
- Kumar, S., Garcia-Carreño, F. L., Chakrabarti, R., Toro, M. A. N., & Córdova-Murueta, J. H. (2007). Digestive proteases of three carps *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Hypophthalmichthys molitrix*: Partial characterization and protein hydrolysis efficiency. *Aquaculture Nutrition*, 13(5), 381-388.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structure proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Liu, Z., Wang, Z., & Zhang, J. (2008). An acidic protease from the grass carp intestine (*Ctenopharyngodon idellus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 149(1), 83-90.
- Osatomi, K., Sasai, H., Cao, M., Hara, K., & Ishihara, T. (1997). Purification and characterization of myofibril-bound serine proteinase from carp *Cyprinus carpio* ordinary muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 116(2), 183-190.
- Pescod, M. B. (1992) *Wastewater treatment and use in agriculture*. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Peteri, A. (2004) *Cultured aquatic species information programme. Cyprinus carpio*. Rome, Italy: FAO Fisheries and Aquaculture Department.

- Robinson, H., & Hogden, C. (1940). The biuret reaction in the determination of serum proteins. I. A study of the conditions necessary for the production of a stable color which bears a quantitative relationship to the protein. *Journal of Biological Chemistry*, 135, 707-725.
- Scopes, R. K. (1994) *Protein Purification: Principles and Practice*. USA: Springer Science & Business Media.
- Siddiqui, K. S., & Torsten, T. (2008) *Protein adaptation in extremophiles*. USA: Nova Science Publishers.
- Sriket, C. (2014). Proteases in fish and shellfish: Role on muscle softening and prevention. *International Food Research Journal*, 21(2), 433-445.
- Zhang, C., & Kim, S. (2010). Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects. *Marine Drugs*, 8, 1920-1934.

