

Caracterización de la actividad proteasa digestiva de atún rojo *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758)

Z. Essed, I. Fernández, F. J. Alarcón y F. J. Moyano

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

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

RESUMEN

Se estudió la actividad proteasa digestiva de *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758). Se encontraron dos óptimos de pH, tanto para la actividad proteasa ácida de los extractos estomacales (2,0 y 3,5) como para la actividad proteasa alcalina de los intestinales (10,0 y 12,0). La primera se mantuvo muy estable en un rango amplio de pH, a excepción de pH muy alcalinos (12,0). Por su parte, la actividad proteasa alcalina se vio afectada por pH muy ácidos. Los óptimos de temperatura se determinaron en 50 y 60 °C para la actividad proteasa ácida y alcalina, respectivamente. Mediante el uso de inhibidores de proteasa se comprobó la presencia de proteasas aspárticas en los extractos estomacales y de serin-proteasas en los intestinales. La realización de zimogramas permitió identificar las distintas fracciones con actividad proteolítica presentes en cada extracto.

Palabras clave: Estómago, intestino, inhibidores de proteasa, electroforesis, proteasa digestiva, zimograma.

ABSTRACT

Characterization of digestive protease activity in the bluefin tuna Thunnus thynnus (Linnaeus, 1758)

The digestive proteases of bluefin tuna Thunnus thynnus (Linnaeus, 1758) were studied. Protease activity in stomach extracts showed two optima, at pH 2.0 and 3.5. Optimum activity for intestinal proteases was found at pH 10.0 and 12.0. Protease activity in stomach extracts was found to be stable at several pH, except for pH 12.0. Alkaline protease activity of intestine extracts was highly sensitive to acidic pH. Optimal temperatures found were 50 °C for acid proteases and 60 °C for alkaline proteases. The use of specific protease inhibitors indicated that the main presence of acid proteases was in stomach extracts, and serine proteases in intestine extracts. Active fractions in extracts were identified with SDS-PAGE.

Keywords: Stomach, intestine, protease inhibitor, electrophoresis, digestive protease, zymogram.

INTRODUCCIÓN

Los túnidos son un grupo de especies muy importantes en las pesquerías marinas, debido tanto a su gran tamaño como a que su carne es muy apreciada. En este sentido, destaca fundamentalmente el atún rojo *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758), la

especie de mayor tamaño y que actualmente alcanza precios más elevados en los mercados internacionales, particularmente en el japonés (Iioka, Kani y Nahla, 1999).

La gran importancia económica que tiene esta especie condujo a pensar en la posibilidad de desarrollar su cultivo en cautividad y la ICCAT

(*International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas*) ha recomendado llevar a cabo estudios sobre el crecimiento y la reproducción del atún rojo. Aunque en los últimos años se han realizado intentos de cría en cautividad de tónidos, en líneas generales se podría decir que, por el momento, la acuicultura de los atunes se puede concebir sólo desde una perspectiva de engorde o para repoblación. En el caso del atún rojo, existen experimentos de cría en Japón desde 1970, y en la actualidad se llevan a cabo por numerosas empresas públicas y privadas entre las que destaca JASFA (Japan Sea-Farming Association) (Kaji *et al.*, 1996). Aunque se han producido juveniles y han sido liberados al mar, lo cierto es que aún no está controlada la producción en masa de juveniles de esta especie (Iioka, Kani y Nahla, 1999). En España, el Instituto Español de Oceanografía (IEO) comenzó un proyecto sobre los atunes cuyo objetivo es obtener poblaciones diferentes y determinar la capacidad de alcanzar la maduración sexual y reproducirse en condiciones de cautividad y en instalaciones terrestres (Forés *et al.*, 1999).

No obstante, otro de los aspectos fundamentales que se plantean ante la posibilidad de engordar atunes en cautividad es la necesidad de desarrollar un alimento adecuado que pudiera sustituir el empleo actual de pescado fresco. Aunque, bajo los planteamientos actuales de engorde terminal de ejemplares salvajes, resulta prácticamente imposible su adaptación al consumo de un pienso artificial, si en un futuro se desarrolla la cría en cautividad desde sus primeras etapas, la habituación a un alimento artificial resultaría no sólo posible sino necesaria. En la actualidad los animales se alimentan con grandes cantidades de pescado fresco o congelado, pero es necesario comenzar a investigar el diseño de piensos potencialmente utilizables para el engorde de esta especie, para lo cual es fundamental el conocimiento de su bioquímica digestiva. El objetivo del presente trabajo es la caracterización de las proteasas del sistema digestivo de *T. thynnus*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los sistemas digestivos de atún rojo *Thunnus thynnus* fueron obtenidos a partir de ejemplares de 300 kg suministrados por Tuna Farms of Mediterraneo, S. L. (Murcia). Los animales fueron sacrificados,

viscerados in situ y el digestivo entero se congeló a -20°C hasta su posterior uso. Porciones del estómago y diferentes regiones del intestino fueron homogenizados por separado en agua destilada en una proporción 1:5 (p/v). Los extractos obtenidos se centrifugaron a 12 000 rpm a 4°C durante 15 min y el sobrenadante se guardó a -20°C hasta su utilización. Las proteínas solubles en los diferentes extractos se determinaron por el método de Bradford (1976). La actividad proteasa ácida de los extractos de estómago se determinó según la metodología de Anson (1938) con hemoglobina al 0,5 % en tampón Glicina-HCl 0,1 M, pH 2,0 como sustrato. La actividad proteasa alcalina se determinó siguiendo el método de Kunitz (1947) modificado por Walter (1984). En este caso se empleó como sustrato caseína al 0,5 % en tampón Tris-HCl 50 mM, CaCl_2 10 mM a pH 9,0. La actividad de la tripsina se determinó según Erlanger, Kokowski y Cohen (1961) y la actividad quimotripsina por el método propuesto por Asgeirsson y Bjarnason (1991).

Para determinar el efecto del pH sobre la actividad proteasa se empleó un tampón universal (Stauffer, 1989) en el rango de pH de 1,0 a 4,5 para los extractos de estómago y en el rango pH 2,0 a 12,0 para los extractos intestinales. La estabilidad al pH de la actividad proteasa en los preparados enzimáticos se determinó preincubando los extractos enzimáticos a varios pH de 2,0 a 12,0, durante 120 min antes de realizar el ensayo de actividad proteasa. A continuación se determinó la actividad residual y se comparó con un control preincubado con agua destilada. La actividad residual se expresó en porcentaje de actividad residual con respecto al control. La temperatura óptima de las proteasas de estómago e intestino se determinó en el rango de temperatura de 10 a 80°C . Para determinar la termoestabilidad de las proteasas se incubaron los extractos enzimáticos a diferentes temperaturas durante 120 min y a continuación se determinó la actividad residual con respecto a un control mantenido a 25°C . La sensibilidad a inhibidores específicos de proteasas se ensayó utilizando una batería de inhibidores comerciales (figura 1) según la metodología descrita por Alarcón *et al.* (1998). Los zimogramas de las proteasas ácidas en los extractos de estómago se realizaron según Díaz *et al.* (1998) y los de las proteasas alcalinas de los extractos intestinales según García-Carreño, Dimes y Haard (1993).

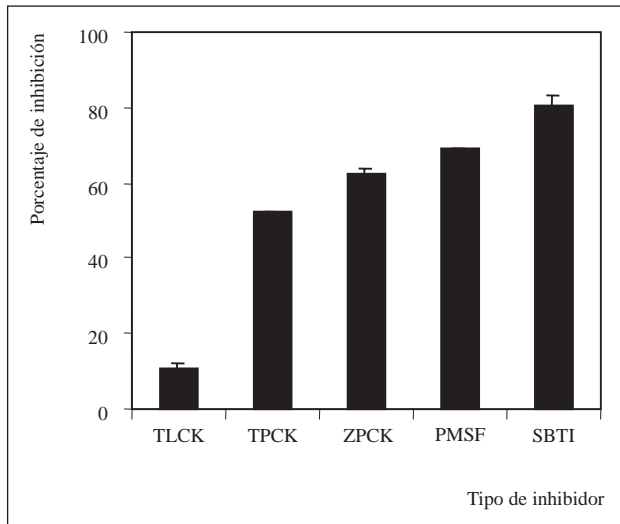


Figura 1. Reducción de la actividad proteasa alcalina de los extractos intestinales de *T. thynnus* producida por distintos inhibidores de proteasas. (PMSF): fluoruro de fenilmetilsulfonilo; (SBTI): inhibidor trípico de la soja; (TLCK): cetona de tosil-lisina-clorometilo; (TPCK): cetona de tosil-fenilalanina-clorometilo; (ZPCK): cetona de carboxibenzo-xi-alanina-glicina-fenilalanina-clorometilo.

RESULTADOS

A fin de elegir el tejido más adecuado para la preparación de los extractos orientados a la determinación de actividad de proteasa alcalina, se realizaron análisis sobre muestras obtenidas de tres lugares distintos según se detalla en la figura 2. Los resultados se resumen en la tabla I. Dado que la mayor actividad en extractos preparados con un mismo peso de tejido se obtuvieron en los lóbulos pancreáticos, el resto de los ensayos se llevó a cabo con extractos preparados a partir de dicho tejido.

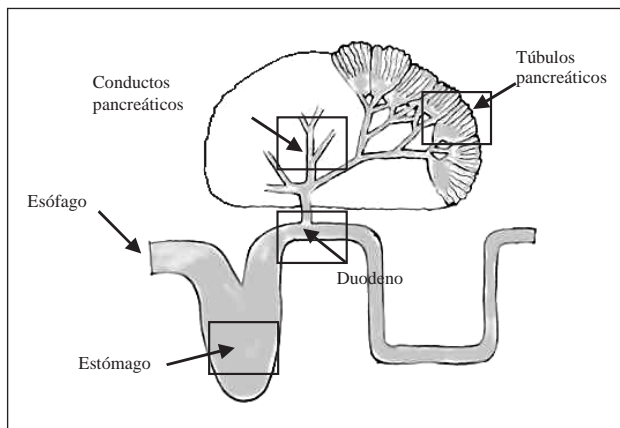


Figura 2. Esquema del sistema digestivo de atún rojo *T. thynnus* y regiones del digestivo utilizadas en la preparación de los extractos enzimáticos.

Tabla I. Actividad proteasa alcalina total determinada en extractos enzimáticos preparados a partir de distintas regiones del sistema digestivo de atún rojo *T. thynnus*. Los resultados son la media de 5 determinaciones ± SD.

Tejido	Actividad total (U/ml)
Páncreas	332,90 ± 0,01
Túbulos intestinales	95,40 ± 0,19
Intestino	71,44 ± 0,12

La actividad proteolítica total determinada en los extractos de estómagos e intestino de *T. thynnus* se resume en la tabla II. Se pudo comprobar que en atún rojo la actividad proteolítica ácida es más importante que la alcalina. La actividad trípica medida en extractos intestinales fue muy superior a la quimotripsina.

El perfil de actividad de las proteasas en función del pH se muestra en la figura 3. Se detectaron dos

Tabla II. Actividad proteasa total determinada en extractos de estómago y páncreas de atún rojo *T. thynnus*. Los resultados son la media de 3 determinaciones ± SD.

	Estómago	Intestino
Actividad proteasa total (U/ml)	4 294,00 ± 0,04	332,90 ± 0,01
Proteína soluble (mg/ml)	5,64 ± 0,02	2,12 ± 0,01
Actividad específica (U/mg proteína)	761,30 ± 0,04	157,02 ± 0,01
Tripsina (mU/mg proteína)	-	64,00 ± 1,00
Quimotripsina (mU/mg proteína)	-	14,00 ± 2,00

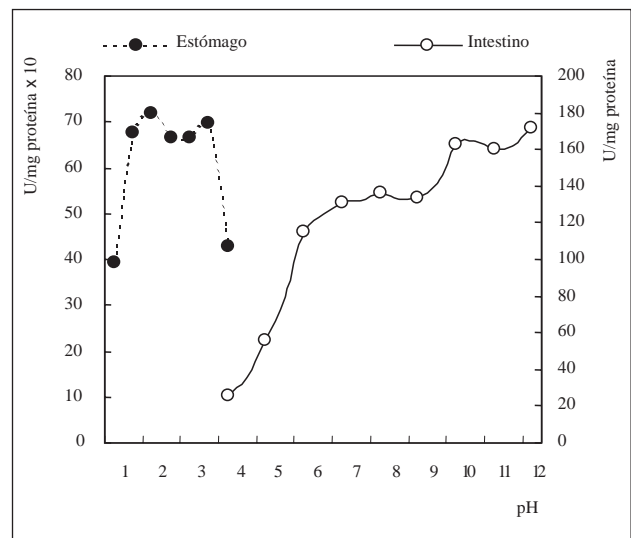


Figura 3. Efecto del pH sobre la actividad proteasa ácida (estómago) y alcalina (intestino) de los extractos enzimáticos de *T. thynnus* (nótese la diferencia en escala).

picos de máxima actividad a pH 2,0 y 3,5 para las proteasas ácidas de extractos de estómago, en tanto que las proteasas alcalinas mostraron óptimos a valores de pH muy elevados, con máximos a pH 10,0 y 12,0. La estabilidad de las proteasas ácidas de las dos especies estudiadas se detalla en la figura 4. Se encontró que las proteasas ácidas de *T. thynnus* son muy estables tras preincubarlas a pH alcalinos, ya que sólo se vieron afectadas por pH extremos (12,0). En las proteasas alcalinas se encontró una sensibilidad importante a pH ácido, ya que, tras sólo 30 min de incubación a pH 2,0, la actividad se redujo en un 75 %.

La influencia de la temperatura en la actividad de las proteasas digestivas de atún rojo se detalla en

la figura 5. El óptimo de actividad para las proteasas presentes en los extractos estomacales se encontró a 50 °C, mientras que para la actividad proteasa intestinal se situó en torno a 60 °C. La termoestabilidad de las proteasas se resume en la figura 6. Las proteasas ácidas mostraron ser muy termolábiles ya que, tras 30 min de preincubación a 60 °C, se inactivaron completamente. Por su parte la actividad proteasa alcalina disminuyó notablemente tras 30 min de preincubación a 40 °C. En general, ambas actividades mostraron ser muy sensibles a las altas temperaturas.

A efectos de determinar el tipo de proteasas que componen los extractos de estómago e intestino se emplearon inhibidores específicos de proteasas. La

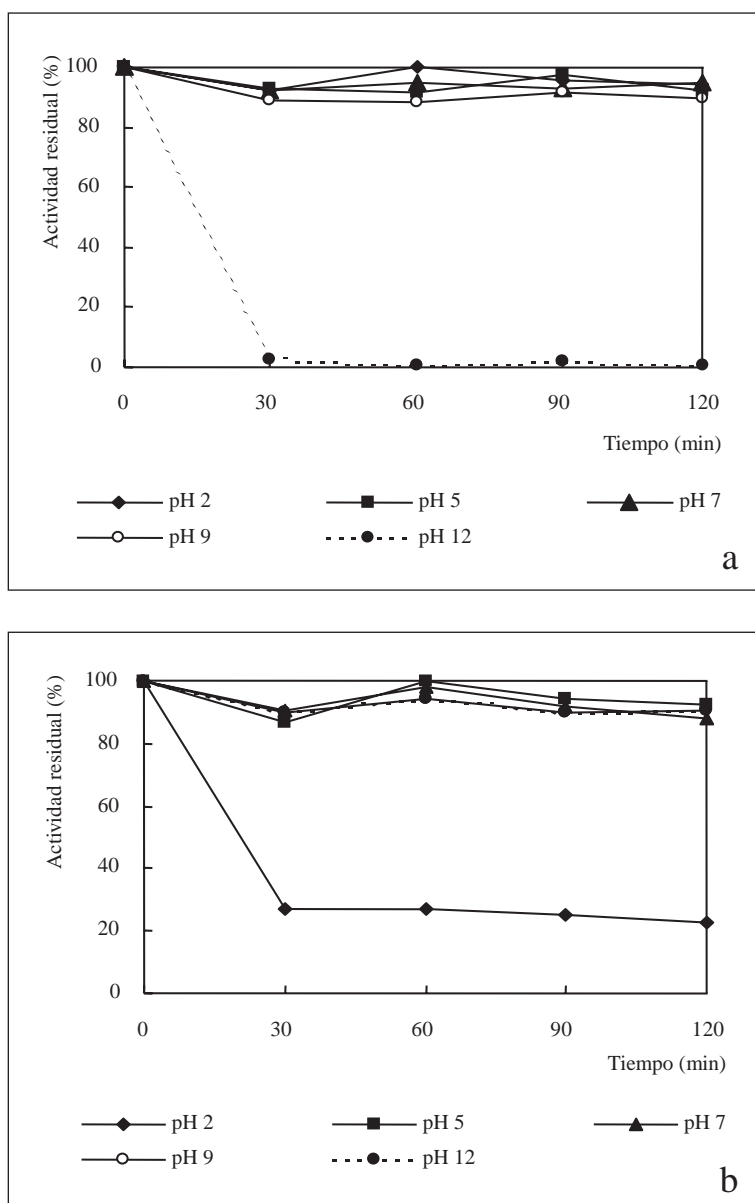


Figura 4. Efecto del pH sobre la estabilidad de la actividad proteasa ácida (a) y alcalina (b) de los extractos enzimáticos de *T. thynnus*.

Figura 5. Efecto de la temperatura sobre la actividad proteasa ácida (estómago) y alcalina (intestino) de los extractos enzimáticos de *T. thynnus*.

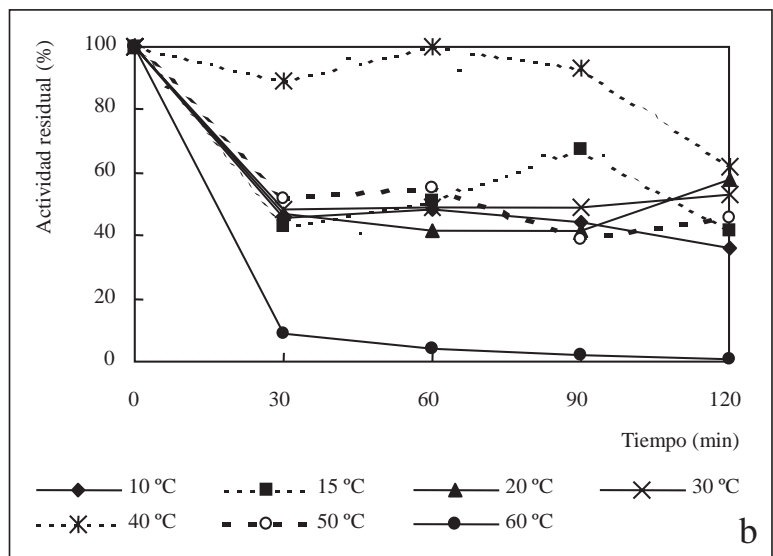
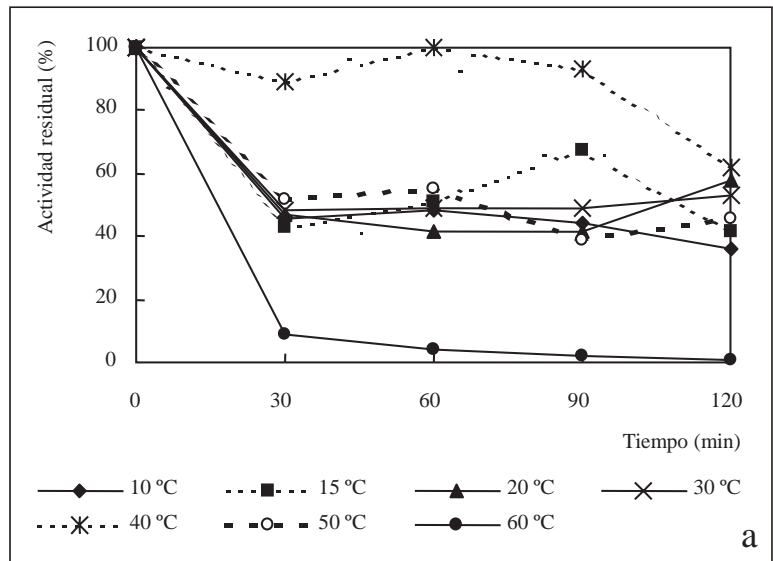
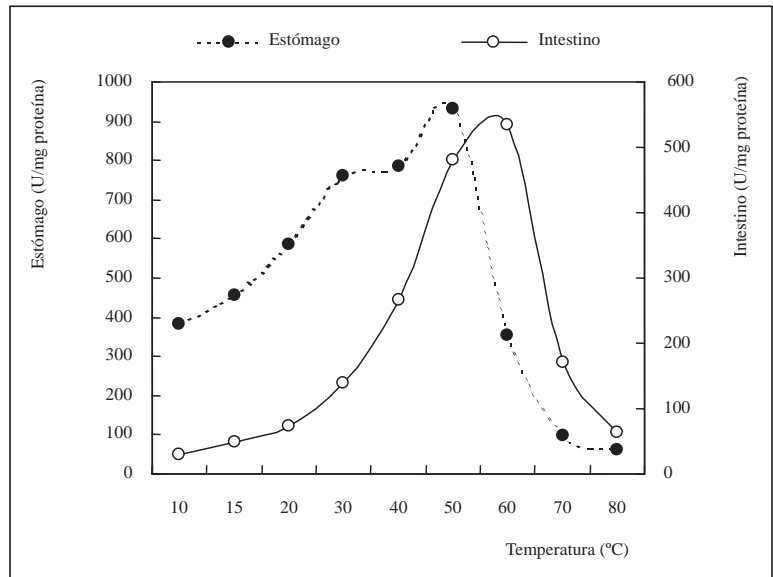


Figura 6. Termoestabilidad de la actividad proteasa ácida (a) y alcalina (b) de los extractos enzimáticos de *T. thynnus*.

actividad proteasa ácida de los extractos estomacales se inhibió totalmente por pepstatina A, un inhibidor que es específico para proteasas aspárticas de tipo pepsina. El efecto de los inhibidores comerciales sobre las proteasas alcalinas de *T. thynnus* se muestra en la figura 1. Se comprobó que la incubación de los extractos enzimáticos con dos inhibidores específicos de serin-proteasas (SBTI y PMSF) determinó reducciones del 75 y 52 % en la actividad proteasa del extracto, respectivamente. Los inhibidores específicos para la actividad quimotripsina (ZPCK y TPCK) determinaron reducciones de actividad de 32 y 29 % y, por último, el TLCK, inhibidor específico de tripsina, determinó sólo una reducción del 7 % en la actividad de los extractos intestinales de *T. thynnus*.

Los zimogramas realizados a partir de los extractos de estómago revelaron la presencia de dos fracciones activas con actividad proteolítica (figura 7). Por su parte, la figura 8 muestra el zimograma de las proteasas alcalinas presentes en los extractos intestinales. Se observaron en todos los casos tres proteasas intestinales con masas moleculares comprendidas entre 16,8 y 26,8 kDa.

DISCUSIÓN

A pesar de la gran abundancia de trabajos que abordan el estudio de las enzimas digestivas en dis-

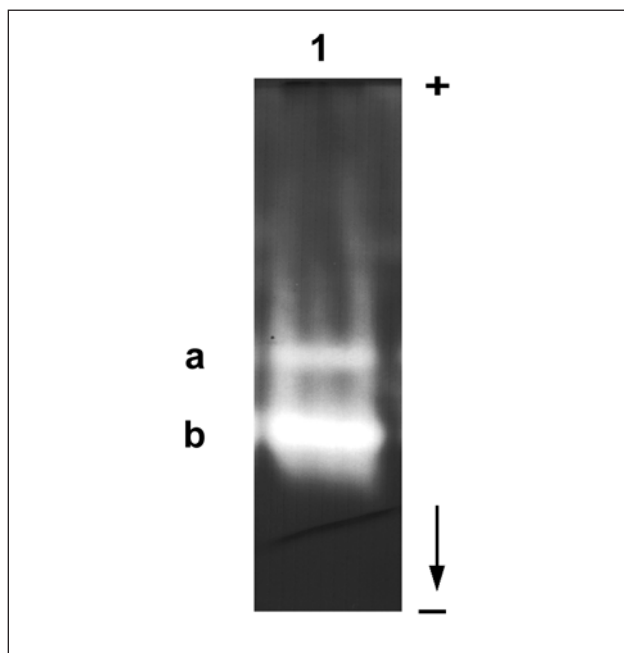


Figura 7. Zimograma de las proteasas ácidas presentes en los extractos estomacales de *T. thynnus*.

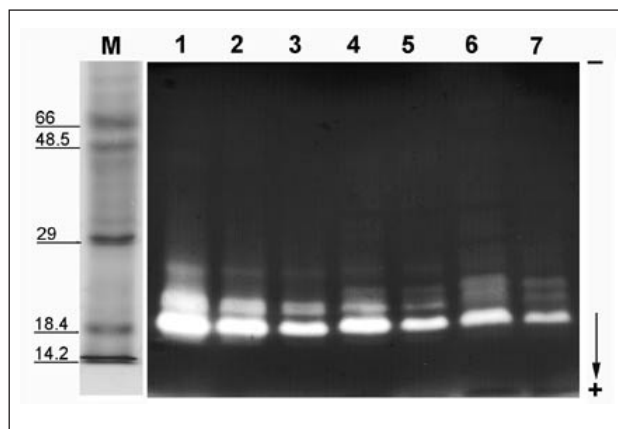


Figura 8. Zimograma de las proteasas alcalinas presentes en los extractos intestinales de *T. thynnus* preparados a partir de diferentes regiones del sistema digestivo. (M): marcador de masas moleculares; carriles 1 a 3: páncreas; carriles 4 y 5: duodeno; carriles 6 y 7: túbulo intestinal.

tintas especies de peces de agua dulce y marinos (Jonas *et al.*, 1983; Torrissen, 1984; Haard, 1992; Alarcón, 1997; Moyano, Alarcón y Díaz, 1999), no existe hasta la fecha ningún estudio sobre estas enzimas en túnidos. En el caso del atún rojo *T. thynnus*, los trabajos de fisiología digestiva se limitan a la descripción del desarrollo del aparato digestivo durante la fase larvaria (Kaji *et al.*, 1996). A pesar de la importancia económica de esta especie, la mayor parte de los trabajos sobre fisiología y bioquímica se han desarrollado en otras especies de túnidos como *Thunnus maccoyii* (Castelnau, 1872) (Carter *et al.*, 1999) o *T. albacares* (Bonnaterre, 1788) (Hajjou y Le Gal, 1994).

La comparación relativa de los valores de actividad proteolítica ácida frente a los de actividad alcalina se asemeja a los determinados en otras especies de peces carnívoros, como la dorada *Sparus auratus* Linnaeus, 1758 o el dentón *Dentex dentex* (Linnaeus, 1758). En todos los casos se observan mayores niveles de actividad proteasa ácida en el estómago en comparación con la alcalina detectada en el intestino. Por otra parte, resulta interesante establecer relaciones, tanto entre los niveles de actividad de proteasa ácida y alcalina, como, dentro de esta última, entre la tripsina y la quimotripsina. En este sentido se ha descrito que, en las especies eminentemente carnívoras como la trucha o la dorada, existen niveles muy altos de pepsina, que resultan menores en peces omnívoros o herbívoros (Jonas *et al.*, 1983). En el caso del atún rojo, a pesar de ser un carnívoro reconocido, la relación entre actividades encontrada ha sido de 5:1, en tanto

que en *Sparus auratus* o *Dentex dentex* es del orden de 15:1 (Alarcón, 1997). Igualmente, en los peces carnívoros, la cantidad de tripsina es mayor que la de quimotripsina y parece existir una estrecha relación inversa entre la pepsina gástrica y la quimotripsina. En el caso de *T. thynnus* el carácter eminentemente carnívoro de la especie se pone de manifiesto al observar que la actividad de tripsina es cuatro veces mayor que la de quimotripsina, mientras que en la carpa ocurre lo contrario (Jonas *et al.*, 1983).

El perfil de actividad en función del pH para la proteasa ácida en esta especie no difiere de los observados en otras especies de peces marinos y dulceacuícolas (Alarcón, 1997; Guillaume y Choubert, 1999) estableciéndose el óptimo en un estrecho intervalo de pH 2,0-3,0. La existencia de una única curva con un único óptimo bien marcado pondría de manifiesto la presencia de una única isoenzima con actividad ácida, en tanto que la presencia de dos óptimos indicaría la posible existencia de dos isozimas. En el caso de *T. thynnus*, los zimogramas revelaron la presencia de dos bandas proteolíticas bien evidentes, lo que concuerda con una curva de pH con dos óptimos de actividad. Los trabajos de Hajjou y Le Gal (1994) han demostrado en *T. albacares* la presencia de un amplio intervalo de pH para la actividad proteolítica, evidenciado por la aparición de múltiples bandas activas en electroforesis.

En cuanto a la estabilidad en relación con el pH, las proteasas ácidas son estables hasta pH 7,0 e incluso a pH 9,0. Esta estabilidad a pH alcalino podría ser una adaptación de especies que se alimentan de forma constante y por tanto ingieren grandes cantidades de agua de mar a un pH neutro (Guillaume y Choubert, 1999). Las proteasas obtenidas a partir de extractos de ciegos pilóricos de *T. thynnus* mostraron dos óptimos de actividad a pH 10,0 y 12,0. Este último punto resulta destacable si se compara con los datos obtenidos en especies marinas como *Scyliorhinus canicula* (Linnaeus, 1758) (Guerard y Le Gal, 1987), *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) (Eshel *et al.*, 1993) o *Sparus aurata* (Alarcón, 1997), en las cuales los óptimos se sitúan entre 9,0 y 10,0. Nuevamente, la realización de zimogramas puso de manifiesto la existencia de diferentes enzimas en el extracto, concretamente tres fracciones activas con actividad caseinolítica. Dimes, García Carreño y Haard (1994) han notificado la presencia de una fracción enzimática de 22 kDa en el salmón y la trucha, similar a la encontra-

da en *T. thynnus* y que correspondería a una tripsina. La incubación de extractos en presencia de inhibidores específicos confirma la existencia de serin-proteasas, específicamente tripsina y quimotripsina.

La estabilidad de las proteasas alcalinas mostró un perfil similar al de las ácidas, salvo en el caso de los pH extremos. Con excepción del pH 2,0, la actividad alcalina soportó bien una preincubación prolongada a pH ligeramente ácido. Esta resistencia al pH ácido ha sido descrita en *Sparus aurata* y *Dentex dentex* (Alarcón *et al.*, 1998) y se asemeja bastante a la que presentan las enzimas de mamíferos, lo que podría entenderse como un aspecto que relaciona al atún (un homeotermo funcional) con este grupo de vertebrados. Por otra parte, la estabilidad a pH ácido puede entenderse igualmente como una adaptación funcional a las continuas modificaciones de pH del contenido digestivo resultantes del vaciamiento gástrico en un pez que come con gran voracidad. En otras especies de peces marinos las proteasas alcalinas son sensibles a pH ácido y este rasgo se ha vinculado con la naturaleza de los aminoácidos presentes en la molécula enzimática que le confieren un carácter básico (Simpson y Haard, 1985). En resumen, el rango de actuación de las proteasas en el digestivo del atún rojo resultaría muy amplio comparado con el de otras especies.

El óptimo de temperatura para la proteasa ácida (50 °C) se asemeja al descrito para otras especies (Alarcón, 1997). Las proteasas alcalinas de *T. thynnus* mostraron un óptimo superior en 10 °C al determinado para las ácidas, coincidiendo con el descrito para *T. albacares* por Hajjou y Le Gal (1994). En el caso del atún, una especie migradora, que alterna estancias en aguas de temperaturas muy diferentes, sería de esperar la existencia de un amplio rango de temperaturas óptimas para la actividad de las enzimas, tal como el descrito para el salmón (Dimes, García Carreño y Haard, 1994). No obstante, la presencia de un rango estrecho, también descrito en *T. albacares* (Hajjou y Le Gal, 1994), estaría relacionada con el carácter de homeotermia funcional de esta especie, que le hace independizarse en gran medida de la influencia de las temperaturas externas. Se ha puesto de manifiesto que el atún rojo es una especie con carácter homeotermo, con una temperatura corporal próxima a los 37 °C, y que sus enzimas presentan óptimos de actividad a temperaturas elevadas. No obstante, estas

enzimas son bastante termolábiles y sólo son realmente activas a las temperaturas próximas a la indicada.

La utilización de inhibidores específicos de proteasa permite, por un lado, la identificación del tipo de proteasas presentes en un órgano y, por otro, las limitaciones existentes en el uso de materias primas naturales en la alimentación que puedan contener factores potencialmente inactivadores de dicha actividad y que limiten su digestibilidad. La incubación de las proteasas ácidas en presencia de pepstatina A, y su consiguiente inhibición total, permitió identificar a las mismas como pepsinas. Por otra parte, la incubación de las proteasas alcalinas de *T. thynnus* en presencia de inhibidores comerciales evidenció un pronunciado efecto del SBTI y el PMSF. Ambas sustancias permiten identificar a las serin-proteasas, grupo igualmente mayoritario en salmónidos (Dimes, García Carreño y Haard, 1994), espáridos (Alarcón, 1997) y otras especies de peces marinos (Takii *et al.*, 1998).

En resumen, resulta destacable que, pese a ser el atún una especie muy voraz, su equipamiento enzimático no presenta gran diversidad, lo que llevaría a concluir que se trata de una especie bastante selectiva en cuanto al tipo de alimento, el cual se basa exclusivamente en proteínas de origen animal.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado en parte por el CIHEAM mediante la concesión de una beca de maestría a Zahida Essed. Igualmente queremos agradecer a la empresa Bluefin Tuna por su atención y el suministro de sistemas digestivos de atún.

BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, F. J. 1997. *Procesos digestivos en peces marinos: caracterización y aplicaciones prácticas* (Serie Tesis Doctorales): 325 pp. Universidad de Almería. Almería, España.
- Alarcón, F. J., M. Díaz, F. J. Moyano y E. Abellán. 1998. Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish. Physiol. Biochem.* 19: 257-267.
- Anson, M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22: 79-89.
- Asgeirsson, B. y J. B. Bjarnasson. 1991. Structural and kinetic properties of chymotrypsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with bovine chymotrypsin. *Comp. Biochem. Physiol.* 99B: 327-335.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Carter, C. G., M. P. Bransden, R. J. Van Barneld y S. M. Clarcke. 1999. Alternative methods for nutrition research on the southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*: in vitro digestibility. *Aquaculture* 179: 57-70.
- Díaz, L. M., F. L. Moyano, F. J. Alarcón, F. L. García-Carreño y M. A. Navarrete del Toro. 1998. Characterization of fish preteases by substrate-gel electrophoresis. *Comp. Biochem. Physiol.* 121: 369-377.
- Dimes, L. E., F. L. García-Carreño y N. F. Haard. 1994. Estimation of protein digestibility. III. Studies on the digestive enzymes from the pyloric ceca of rainbow trout and salmon. *Comp. Biochem. Physiol.* 109: 349-360.
- Erlanger, B., N. Kokowsky y W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95: 271-278.
- Eshel, A., P. Lindner, P. Smirnoff, S. Newton y S. Harpaz. 1993. Comparative study of proteolytic enzymes in the digestive tracts of the eruropean sea bass and hybrid striped bass reared in freshwater. *Comp. Biochem. Physiol.* 106: 627-634.
- Forés, R., M. Samper, J. R. Cejas, F. J. Santamaría, J. E. Villamandos y S. Jerez. 1999. Acclimatization of tuna fish to on-land facilities. En: *Recent Advances in Mediterranean Aquaculture Finfish Species Diversification. Proceeding of the Seminar of the CIHEAM Network on Technology of Aquaculture in the Mediterranean* (24-28 de mayo, 1999. Zaragoza, España). CIHEAM/FAO. *Cahier Options Méditerranéennes* 47: 287-294.
- García-Carreño, F. L., L. E. Dimes y N. F. Haard. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214: 65-69.
- Guerard, F. y Y. Le Gal. 1987. Characterization of a chymosin-like pepsin form the dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Comp. Biochem. Physiol.* 88: 823-827.
- Guillaume, J. y G. Choubert. 1999. Physiologie digestive et digestibilité des nutriments chez les poissons. En: *Nutrition et Alimentation des Poissons et Crustacées*. J. Guillaume, S. Kaushik, P. Bergot y R. Métailler (eds.). INRA-IFREMER. Versailles, Francia: 489 pp.
- Haard, N. F. 1992. A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *J. Aquatic Food Prod. Technol.* 1: 17-35.
- Hajjou, M. y Y. Le Gal. 1994. Purification and characterization of an aminopeptidase from tuna (*Thunnus albacares*). *Biochem. Biophys. Acta* 1204: 1-13.
- Iioka, C., K. Kani y H. Nahla. 1999. Present status and prospects of technical development of tuna sea-farming. En: *Recent Advances in Mediterranean Aquaculture Finfish Species Diversification. Proceeding of the Seminar of the CIHEAM Network on Technology of Aquaculture in the Mediterranean* (24-28 de mayo, 1999. Zaragoza, España). CIHEAM/FAO. *Cahier Options Méditerranéennes* 47: 275-285.

- Jonas, E., M. Ragyanski, J. Olah y L. Borros. 1983. Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis*, L.), herbivorous (*Hypophthalmichthys molitrix*, VAL) and omnivorous (*Cyprinus carpio*, L.) fishes. *Aquaculture* 30: 145-154.
- Kaji, T., M. Tanaka, Y. Takahashi, M. Oka y Y. Ishibashi. 1996. Preliminary observations on development of Pacific Bluefin tuna *Thunnus thynnus* (Scombridae) larvae reared in the laboratory with special reference to the digestive system. *Mar. Freshwater Res.* 47: 261-269.
- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *J. Gen. Physiol.* 30: 291-310.
- Moyano, F. J., F. J. Alarcón y M. Díaz. 1999. Comparative biochemistry of fish digestive proteases applied to the development of in vitro digestibility assays. *Trends Biochem.* 5: 135-143.
- Simpson, B. K. y N. F. Haard. 1985. Characterization of the trypsin fraction from cunner, *Tautoglabrus adspersus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 80: 475-482.
- Stauffer, C. 1989. *Enzyme assays for food scientists*. Van Nostrand Reinhold. Nueva York: 317 pp.
- Takii, E. K., M. Nakamura, K. Urakawa, S. Miyashita, T. Nasu, Y. Kubo, Y. Tanaka y H. Kumai. 1998. Soybean inhibitors inhibit trypsin-like and basic proteinase activities of cultured-fishes. *Fish. Sci.* 64: 935-938.
- Torrissen, K. R. 1984. Characterization of proteases in the digestive tract of atlantic salmon (*Salmon salar*) in comparison with rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 77: 669-674.
- Walter, H. E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. En: *Methods of Enzymatic Analysis*. H. J. Bergmeyer (ed.) 5: 270-277. Verlag Chemie. Weinham, Alemania.