

Caracterización de la actividad enzimática del jugo gástrico de pulpo, *Octopus vulgaris* y de choco, *Sepia officinalis* a distintos pH. Digestibilidad *in vitro* de distintas dietas, con jugo gástrico de pulpo

García S.¹, Garrido D.¹, Rosas C.², Rodríguez C.J.³, Pascual C.³, Sykes A.⁴ y Domingues P.¹

Email: sandra.garcia.garrido.ext@juntadeandalucia.es

¹Centro IFAPA – Agua del Pino. Carretera Punta Umbría, Cartaya, s/n. 21450 Cartaya. Huelva. España.

²Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias – UNAM, Puerto de abrigo s/n Sisal, Mpio. Hunucma, Yucatán, México.

³Tecnología de Productos Pesqueros, Facultad de Biología, Campus Sur, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España.

⁴Universidade do Algarve. Campus de Gambelas. 8000 FARO. Portugal

Abstract

Intensive culture of marine species has been increasing in many countries, such as Japan, Norway, Spain, France, and Greece. Recent research to improve the quality and quantity of aquatic animals production by understanding the process of feeding (ingestion, digestion, and absorption), with emphasis on the digestive enzymatic capabilities is important in order to understand metabolic processes and reduce costs and time on the development of such diets. The impetus to increase knowledge about suitable inert diets to partially or totally replace live feed would reduce this expensive part of the operation, particularly in new potential species, such as the octopus, *Octopus vulgaris*, and the cuttlefish, *Sepia officinalis*, which are two of the most promising cephalopods for large-scale culture. This work is divided into two parts: (1) Enzymatic characterization, by determination of protease activity of the gastric juice at pH ranges from 2 to 12, since this is the major responsible of digestion processes, and (2) *In vitro* evaluation of several prepared diets, as well as a selection of several natural animal protein sources, by means of a pH-Stat system The results of Part 1

showed that the digestive enzyme activity in total proteases from the gastric juice was higher at pH 7 and \square therefore being a more alkaline digestion for these species. Total proteases activity was higher at pH 8, while the trypsin activity was higher at pH 7, for both species. For Part 2, the natural diets (natural or liophylized squid, blue whiting and mussel) promoted the highest digestibility, with the highest value being attained with liophylized squid (4 \square). From the prepared diets, based on raw blue whiting paste, those diets agglutinated with gelatine delivered the highest digestibility. The use of soy protein, as well as heating gelatine as agglutinants, promoted poor digestibility.

Introducción

Octopus vulgaris y *Sepia officinalis* son especies con elevado potencial para la diversificación en acuicultura, debido a su elevado crecimiento (Domingues *et al.*, 2006 \square Iglesias *et al.*, 2007) y valor comercial. El engorde de *O. vulgaris* es llevado a cabo actualmente en Galicia, pero la viabilidad económica es baja, debido a la dependencia de juveniles capturados del medio natural, y la inexistencia de dietas artificiales (Iglesias *et al.*, 2007), que son los dos principales cuellos de botella para el cultivo en gran escala de esta especie (Domingues *et al.*, 2006).

El conocimiento de la fisiología digestiva y en particular de la forma en que operan las enzimas digestivas es de gran importancia para el desarrollo de dietas artificiales. Al ser los cefalópodos altamente dependientes de las proteínas, las enzimas proteolíticas son determinantes en la digestión y disponibilidad de nutrientes. Uno de los principales factores que afectan la actividad de las enzimas proteolíticas es el pH, debido a que de éste depende su estructura y capacidad de transformar los sustratos en el alimento (Murray *et al.*, 2001). \square os cefalópodos realizan la digestión del alimento en dos fases, una extracelular y otra intracelular. \square a intracelular se lleva a cabo en la glándula digestiva, mientras que la extracelular es el resultado de la degradación del alimento por la actividad de las enzimas que forman el jugo gástrico. Poco se sabe acerca de la actividad de las enzimas digestivas intra y extracelulares en cefalópodos. Estudios recientes han demostrado que las enzimas digestivas intracelulares de *Dosidiscus gigas* tienen su máxima actividad a pH 4,5 (Cardenas y Haard, 200 \square), mientras que en *S. officinalis* se han observado valores de pH's óptimos, para esas mismas enzimas de entre 8 y 8,5 (Perrin, 2004).

Tomando en consideración la importancia que tiene el conocer la fisiología digestiva como base para la formulación de alimentos preparados, este estudio fue diseñado con el fin de evaluar el efecto del pH en las principales proteasas digestivas presentes en el jugo gástrico de *O. vulgaris* y *S. officinalis*. Con esta información, se puso en marcha un sistema de digestibilidad *in vitro* (pH stat) en el que se evaluó la capacidad digestiva del jugo gástrico

de *O. vulgaris* sobre 10 dietas.

Materiales y métodos

Para el estudio de la actividad enzimática y las pruebas de digestibilidad *in vitro* se utilizaron muestras de jugo gástrico de 5 pulpos *O. vulgaris* y 5 chocos *S. officinalis*, con un peso de 1102,3 ± 18,1 g y 6,5 ± 45,6 g, respectivamente. Los animales fueron mantenidos en ayuno 24 horas antes de ser sacrificados, para lo que previamente fueron anestesiados en hielo durante 3 minutos. El jugo gástrico de cada uno fue extraído, dividido en alícuotas de 100 µl, y conservado a -80°C hasta su análisis. Se utilizó un método de engaño para que los pulpos y chocos generaran suficiente volumen de jugo gástrico, que consistió en enseñarles alimentos sin que pudieran comerlos.

Las enzimas evaluadas fueron proteasas totales, proteasas alcalinas totales, tripsina y quimotripsina, las cuales fueron medidas a diferentes valores de pH de entre 2 y 12. Los métodos de análisis de enzimas utilizados fueron Charney y Tomarelli (1947) y Delmar *et al.* (1971) para tripsina y quimotripsina, respectivamente, y Anson (1938) para proteasas totales y alcalinas totales, pero con una modificación, el uso exclusivo del tampón universal Stauffer (1981), ya que es más estable en todo el intervalo de pH. Para la determinación de la concentración de proteína soluble se utilizó la técnica de Bradford (1976).

Los extractos obtenidos fueron centrifugados a 13.200 rpm durante 30 min a 4°C. El sobrenadante, donde se encontraban las enzimas digestivas, fue recuperado. Para las proteasas totales se utilizó hemoglobina al 1% como sustrato y para proteasas alcalinas totales, azocaseína al 1%. Se emplearon BAPPNA 1 mM y SAPPNA 1,142 mM como sustratos específicos para tripsina y quimotripsina, respectivamente. Cada medición de actividad enzimática fue determinada por triplicado y referida en UI/mg de proteína.

En los ensayos de digestibilidad *in vitro* se evaluó la capacidad digestiva de *O. vulgaris* sobre 10 dietas utilizando el jugo gástrico como fuente de enzimas digestivas, el pH-STAT como digestor artificial, y con las enzimas digestivas caracterizadas a un pH determinado. Se midió el grado de hidrólisis (%GH) de dietas con base de bacaladilla, *Micromesistius poutassou*, y como aglutinante, distintos porcentajes de proteína de soja (15%), gelatina natural (10, 10% colesterol + arginina y 20%) o calentada (10% colágeno y 10%) además, se probaron algunas dietas naturales normalmente utilizadas en el engorde de esta especie, como bacaladilla, el mejillón (*Mytilus edulis*), calamar (*Loligo gahi*) y calamar liofilizado.

Resultados

El perfil de actividad enzimática de proteasas totales en el jugo gástrico de *O. vulgaris* y *S. officinalis*, en el rango de pH 2 a 12, (Fig. 1) indica que existen dos picos de actividad enzimática máxima para las dos especies. Tanto para pulpo como para choco, la máxima actividad proteasa ocurre a pH 7 y

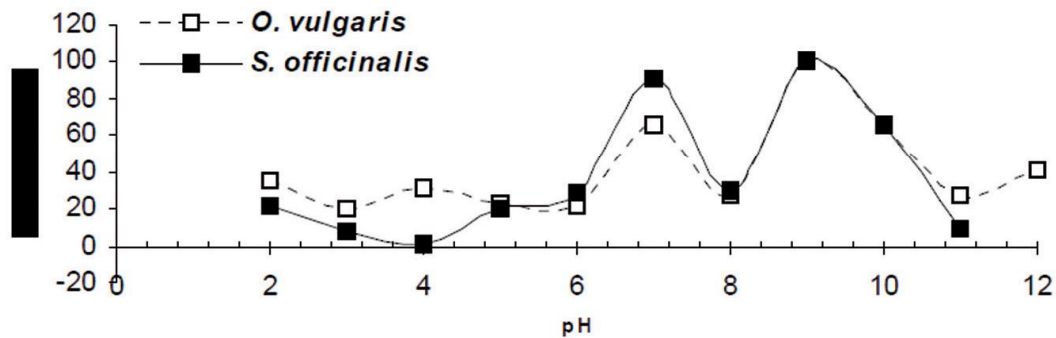


Figura 1. Proteasas totales

La variación de actividad enzimática de proteasas alcalinas totales en el jugo gástrico de *O. vulgaris* y *S. officinalis* en el rango de pH 6 a 12 se muestra en la figura 2. Se observa un máximo de actividad a pH 8 para pulpo, y entre pH 7 y 8 para choco.

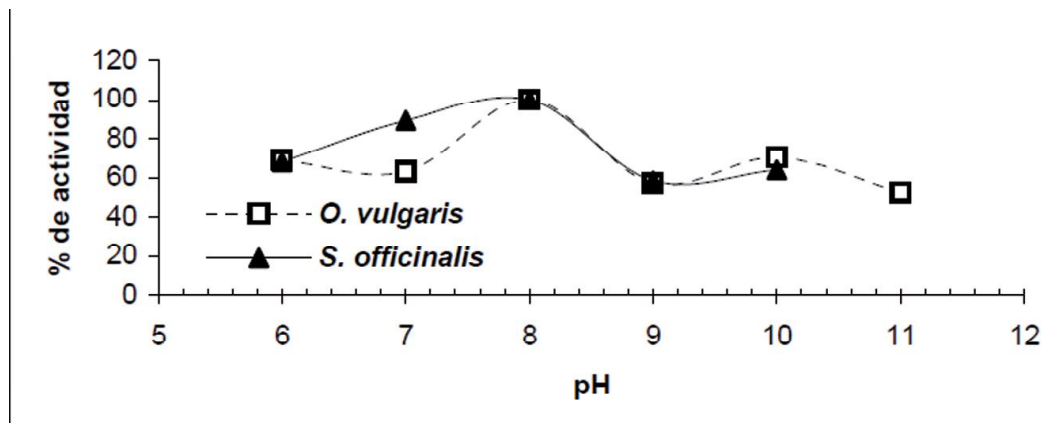


Figura 2. Proteasas alcalinas totales

El porcentaje de actividad de la tripsina (Fig. 3) en el jugo gástrico de pulpo y choco es máximo a pH 7, mientras que para quimotripsina (Fig. 4), es a pH 8.

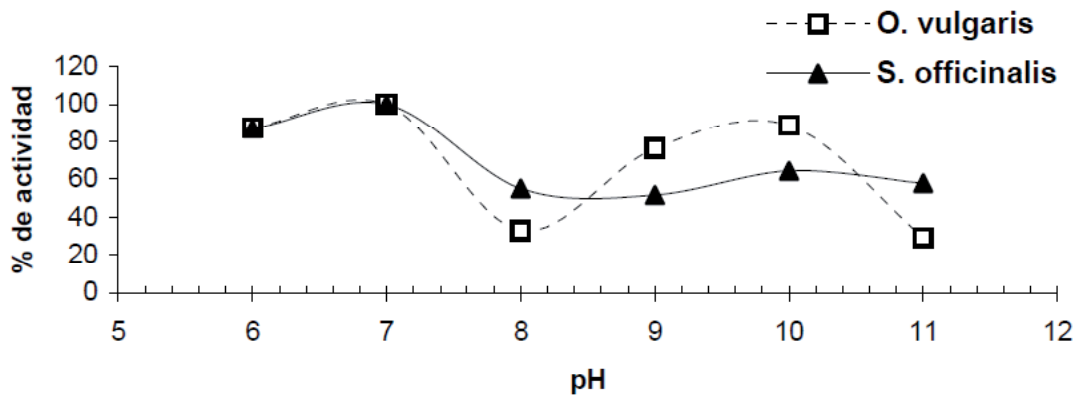


Figura 3. □ Tripsina

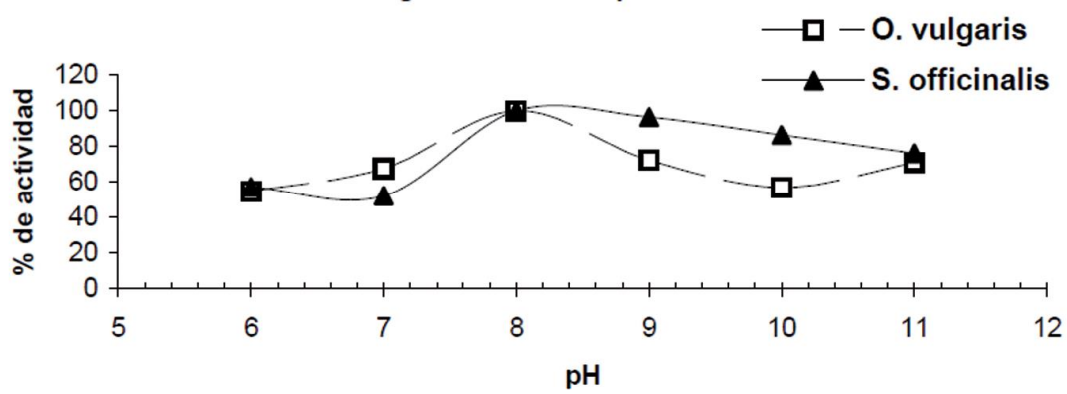


Figura 4. □ Chymotripsina

La digestibilidad *in vitro* (grado de hidrólisis, GH □), usando jugo gástrico de pulpo como fuente de enzimas digestivas, sobre distintas dietas artificiales preparadas con base de bacaladilla y aglutinadas con proteína de soja, gelatina natural o calentada, y sobre dietas naturales como mejillón y calamar, se muestran en la figura 5.

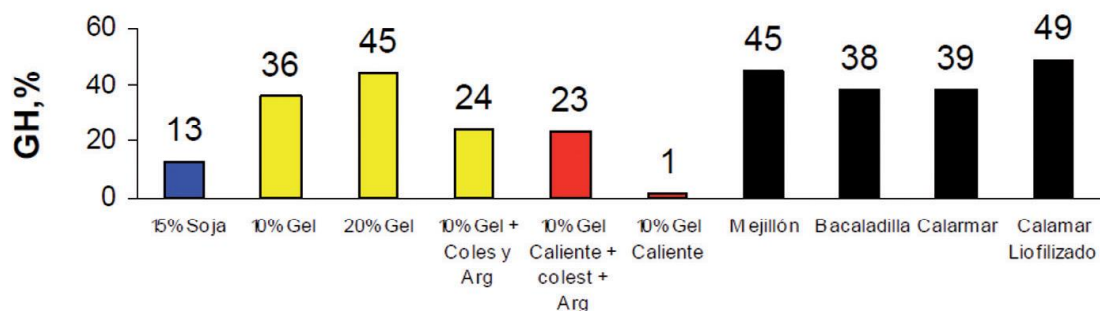


Figura 5. □ Proteína base bacaladilla y diferentes aglutinates □ dietas naturales

Conclusiones

La actividad de proteasas totales y proteasas alcalinas totales es similar para ambas especies. La actividad máxima de tripsina se registró a pH 7 y de quimotripsina a pH 8, también para las dos especies, que presentan características similares en cuanto al pH óptimo al que trabajan sus enzimas digestivas. Así, el paquete enzimático del jugo gástrico de ambas especies posee mayor actividad a pH alcalino, al contrario que en calamares y otros cefalópodos, como *Octopus maya*, que presentan mayor actividad en medios ácidos. En relación a los aglutinantes, la gelatina en frío mostró ser un aglutinante adecuado. Cuando fue usada para aglutinar bacaladilla cruda, tanto al 10% como al 20%, estas dietas han obtenido digestibilidad similar a las dietas naturales como calamar, mejillón o bacaladilla. En oposición, la proteína de soja y la gelatina disuelta en agua caliente proporcionaron bajas digestibilidad, no siendo aconsejadas como aglutinantes de dietas para estas especies. Finalmente, la bacaladilla (*Micromesistius poutassou*) parece ser una buena base de materia prima para la elaboración de dietas artificiales para pulpo.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Plan Nacional de Pulpo – JACUMAR – Engorde de pulpo, *Octopus vulgaris* 2007/200 al proyecto INIA TRT2006-00010-00-00, Cultivo preliminar extensivo de choco, *Sepia officinalis* en esteros y a los proyectos CONACYT –Basico 11720 y PAPIIT-UNAM IN2020 por el financiamiento recibido para Carlos Rosas. Sandra García agradece al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) por su beca Pre-doctoral n°47 (BOE n°308 26/12/2006).

Bibliografía

- Anson M. (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 22, 7-8
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *An. Biochem.*, 72, 248-254.
- Cardenas-Lopez J. y Haard N.F. (2001) Identification of a cysteine proteinase from Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas as cathepsin B. *Food Chemistry*. 112(2): 442-447.

- Charney J., Tomarelli R. (1947) A colorimetric method for the determination proteolytic activity of duodenal juice. *Biological Chemistry*, 171, 501-505.
- Delmar E.G., Margman C., Brodick J., Geokas M.C. (1979) A sensitive new substrate for chymotrysin. *Analytical Biochemistry*, 93, 316-320.
- Domingues P., Bettencourt J. y Guerra A. (2006) Growth of *Sepia officinalis* in captivity and in nature. *Vie Milieu*, 56, 109-120.
- Iglesias J., Sánchez F.J., Bersano J.G.F., Carrasco J.F., Dhont J., Fuentes J., Cárdenas F., Muñoz J., Okumura S., Roo J., Meeren T. van der, Vidal E.A.G, Millanueva R. (2007) Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture*, 266: 1-15.
- Murray R., Mayes P.A., Granner D., Rodwell V. (2001). *Bioquímica de Harper. Manual Moderno* (15ª ed.) pp. 747-772.
- Perrin M.A. (2004) Étude expérimentale des capacités digestives chez la seiche, *Sepia officinalis* L. (Mollusque, Céphalopode): Impact de l'alimentation, indice de condition nutritionnelle et formulation d'un aliment artificiel. *Tesis Doctoral*. Université de Caen, Normandie, Francia, 145 p.
- Stauffer C. (1989) *Enzyme Assays for Food Scientists*. Van Nostrand Reinhold/AI, New York. 552 pp.

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL JUGO GÁSTRICO DE PULPO, *Octopus vulgaris* Y DE CHOCO, *Sepia officinalis* A DISTINTOS pH. DIGESTIBILIDAD *in vitro* DE DISTINTAS DIETAS, CON JUGO GÁSTRICO DE PULPO.

García, S.¹, Garrido, D.¹, Rosas, C.², Rodríguez, C.J.³, Pascual, C.³, Sykes, A.⁴, Domingues, P.¹

Email: sandra.garcia.garrido.ext@juntadeandalucia.es

¹Centro IFAPA – Agua del pino. Carrotera Punta Umbria, Cartaya, s/n. 21450 CARTAYA. España.

²Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias – UNAM, Puerto de abrigo s/n Sisal, Mpio, Hunucma, Yucatán, México.

³Tecnología de Productos Pesqueros, Facultad de Biología, Campus Sur, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España.

⁴Universidade do Algarve. Campus de Gambelas. 8000 FARO. Portugal



ABSTRACT

Intensive culture of marine species has been increasing in many countries, such as Japan, Norway, Spain, France, and Greece. Recent research to improve the quality and quantity of aquatic animals production by understanding the process of feeding (ingestion, digestion, and absorption), with emphasis on the digestive enzymatic capabilities is important in order to understand metabolic processes and reduce costs and time on the development of such diets. The impetus to increase knowledge about suitable inert diets to partially or totally replace live feed would reduce this expensive part of the operation, particularly in new potential species, such as the octopus, *Octopus vulgaris*, and the cuttlefish, *Sepia officinalis*, which are two of the most promising cephalopods for large-scale culture. This work is divided into two parts: (1) Enzymatic characterization, by determination of protease activity of the gastric juice at pH ranges from 2 to 12, since this is the major responsible of digestion processes, and (2) *In vitro* evaluation of several prepared diets, as well as a selection of several natural animal protein sources, by means of a pH-Stat system. The results of Part 1 showed that the digestive enzyme activity in total proteases from the gastric juice was higher at pH 7 and 9, therefore being a more alkaline digestion for these species. Total proteases activity was higher at pH 8, while the trypsin activity was higher at pH 7, for both species. For Part 2, the natural diets (natural or lyophilized squid, blue whiting and mussel) promoted the highest digestibility, with the highest value being attained with lyophilized squid (45%). From the prepared diets, based on raw blue whiting paste, those diets agglutinated with gelatine delivered the highest digestibility. The use of soy protein, as well as heating gelatine and arginine to some of the diets increased their digestibility.

INTRODUCCIÓN

Octopus vulgaris y *Sepia officinalis* son especies con elevado potencial para la diversificación en acuicultura, debido a su crecimiento elevado (Domingues et al. 2006; Iglesias et al. 2007) y valor comercial. El engorde de *O. vulgaris* es llevado a cabo actualmente en Galicia, pero la viabilidad económica es baja, debido a la dependencia de juveniles capturados del medio natural, y la inexistencia de dietas artificiales (Iglesias et al. 2007), que son los dos principales cuellos de botella para el cultivo en gran escala de esta especie (Domingues et al. 2006). El conocimiento de la fisiología digestiva y en particular de la forma en que operan las enzimas digestivas es de gran importancia para el desarrollo de dietas artificiales. Al ser los cefalópodos altamente dependientes de las proteínas, las enzimas proteolíticas juegan un papel determinante en la digestión y disponibilidad de nutrientes. Uno de los principales factores que afectan la actividad de las enzimas proteolíticas es el pH, debido a que de este depende la estructura de las enzimas y la capacidad de transformar los sustratos en el alimento (Murray et al. 2001). Los cefalópodos realizan la digestión del alimento en dos fases, una extracelular y otra intracelular. La intracelular se lleva a cabo en la glándula digestiva mientras que la extracelular es el resultado de la degradación del alimento por la actividad de las enzimas que forman el jugo gástrico. Poco se sabe acerca de la actividad de las enzimas digestivas intra y extracelulares en cefalópodos. Estudios recientes han demostrado que las enzimas digestivas intracelulares de *Dosidiscus gigas* tienen su máxima actividad en pH 4,5 (Cardenas and Haard, 2009), mientras que en *S. officinalis* se han observado pH's óptimos para esas mismas enzimas de entre 8 y 8,5 (Perrin, 2004). Tomando en consideración la importancia que tiene el conocer la fisiología digestiva como base para la formulación de alimentos preparados, este estudio fue diseñado con el fin de evaluar el efecto del pH en las principales proteasas digestivas presentes en el jugo gástrico de *O. vulgaris* y *S. officinalis*. Con esta información, se puso en marcha un sistema de digestibilidad *in vitro* (pH stat) en el que se evaluó la capacidad digestiva del jugo gástrico de *O. vulgaris* sobre 10 dietas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Proteasas generales totales

— Anson, (1938), sustrato HEMOGLOBINA

Proteasas alcalinas totales

— Anson, (1938), sustrato AZOCASEÍNA

Tripsina

— Charney and Tomarelli (1947), sustrato BAPPNA

Quimotripsina

— Delmar et al. (1979), sustrato SAAPNA

Método de digestibilidad *in vitro* por pH-STAT (jugo gástrico de pulpo como fuente de enzimas digestivas)



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y PESCA



RESULTADOS

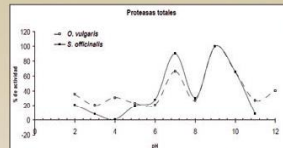


Figura 1 – Variación de la actividad enzimática (%) de proteasas totales en el jugo gástrico de pulpo y choco en el rango de pH de 2 a 12.

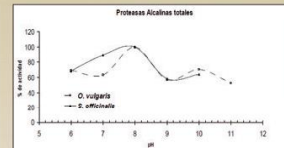


Figura 2 – Variación de la actividad enzimática (%) de proteasas alcalinas totales en el jugo gástrico de pulpo y choco en el rango de pH de 5 a 12.

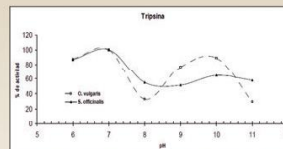


Figura 3 – Variación de la actividad de la tripsina (%) en el jugo gástrico de pulpo y choco en el rango de pH de 5 a 12.

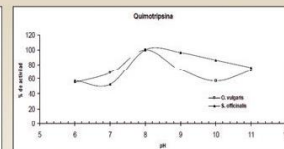


Figura 4 – Variación de la actividad de la quimotripsina (%) en el jugo gástrico de pulpo y choco en el rango de pH de 5 a 12.

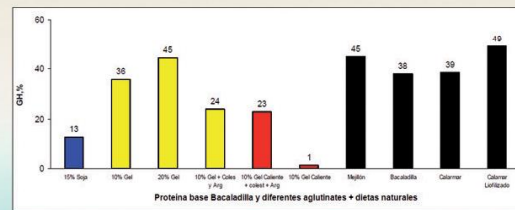


Figura 5 – Digestibilidad de proteínas (%) *in vitro* del jugo gástrico de pulpo, usando dietas dietas artificiales preparadas con base de bacaladilla y aglutinadas con proteína de soja, gelatina natural o calentada; y de dietas naturales normalmente utilizadas en el engorde de esta especie.

CONCLUSIONES

1. La actividad de proteasas totales y proteasas alcalinas totales es similar para pulpo y choco. La actividad máxima de tripsina se registro en pH 7 y de quimotripsina en pH 8.
2. El paquete enzimático del jugo gástrico de ambas especies posee mayor actividad a pH alcalino, al contrario que en calamares y otros cefalópodos, como *Octopus maya*, que presentan mayor actividad en medios ácidos.
3. En relación a los aglutinantes, la gelatina en trío mostró ser un aglutinante adecuado, mientras la proteína de soja y la gelatina disuelta en agua caliente proporcionaron baja digestibilidad, no siendo aconsejadas como aglutinantes de dietas para estas especies.
4. La bacaladilla (*Micromesistius poutassou*) es una buena base de materia prima para la elaboración de dietas artificiales para pulpo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al "Plan Nacional de Pulpo" – JACUMAR – "Engorde de pulpo, *Octopus vulgaris*" 2007/2009, al proyecto INIA TR2206-00010-00-00, "Cultivo preliminar extensivo de choco, *Sepia officinalis* en esteros" y a los proyectos CONACYT –Básico 11720 y PAPIIT-UNAM IN202909, por el financiamiento recibido para Carlos Rosas. Sandra García agradece al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) por su beca Predoctoral nº 47 (BOE nº 308 28/12/2006).

BIBLIOGRAFÍA

Anson, ML (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22, 79-89.
 Cardenas-Lopez, JL, Haard, NP (2009) Identification of a cysteine proteinase from Jumbo squid (*Dosidiscus gigas*) hepatopancreas as cathepsin L. *Food Chemistry* 112(2):442-447.
 Charney, J, Tomarelli, R (1947) A colorimetric method for the determination proteolytic activity of duodenal juice. *Biological Chemistry* 171, 501-505.
 Delmar, EG, Lergman, C, Brodick, JW, Geokas, MC (1979) A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Analytical Biochemistry* 99, 315-320.
 Murray, RK, Mayes, PA, Grammer, DK, Rodwell, VW (2001). *Bioquímica de Harper. Manual Moderno* (15ª ed.) pp. 747-772.
 Domingues, P, Beitescourt, V, Guerra, A (2006) Growth of *Sepia officinalis* in captivity and in nature. *Vie Milieu* 56, 109-120.
 Iglesias, J, Sánchez, FJ, Bersano, JGF, Carrasco, JF, Dhont, J, Fuentes, L, Linares, F, Muñoz, JL, Okumura, S, Roo, J, Meeran, T van der, Vidal, EAG, Villanueva, R (2007) Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture* 266: 1-15.
 Perrin, MA (2004). Etude expérimentale des capacités digestives chez la seiche, *Sepia officinalis* L. (Mollusque, Cephalopode): impact de l'alimentation, indice de condition nutritionnelle et formulation d'un aliment artificiel. Thèse Doctorale, Université de Caen, Normandie, France, 145 p.