

EFECTO DEL ALMACENAMIENTO SOBRE LA ESTABILIDAD DE PROTEASAS DE VÍSCERAS DE PEZ DIABLO (*Hypostomus plecostomus*)

Álvaro Gálvez-Rongel, Víctor Manuel Ocaño-Higuera, Ramón Pacheco-Aguilar,
Francisco Javier Castillo-Yáñez, María Elena Lugo-Sánchez, Santiago Valdez-Hurtado
y Enrique Márquez-Ríos

RESUMEN

Se evaluó la estabilidad de proteasas digestivas en un extracto crudo obtenido a partir de vísceras de pez diablo. Se determinó el efecto de la refrigeración, congelación y liofilización sobre la actividad enzimática. Se monitoreó la actividad proteolítica total (APT) y la actividad proteolítica específica (APE) para las enzimas tripsina y quimotripsina. En refrigeración dicha actividad se midió cada 3 días hasta el día 30, mientras que en congelación y liofilización la actividad enzimática se midió al tiempo cero y después de un mes de almacenamiento. La APT mostró una mayor actividad en la región alcalina, atribuyén-

dose ésto a la acción de las enzimas tripsina y quimotripsina. Ésta última presentó mayor estabilidad al no presentar cambios significativos ($P \geq 0,05$) en su actividad durante los primeros 15 días en refrigeración, mientras que la tripsina mostró un agudo decrecimiento en su actividad ($P < 0,05$) al tercer día de almacenamiento. En congelación y liofilización, tanto la APT como la APE no mostraron cambios significativos ($P \geq 0,05$). Las vísceras de pez diablo pueden ser una fuente importante en la elaboración de un concentrado enzimático siempre y cuando este se maneje liofilizado o congelado.

Introducción

El pez diablo (*Hypostomus plecostomus*) es una especie originaria de Sudamérica. Sin embargo, de forma accidental ahora se lo puede encontrar en el Embalse Adolfo López Mateos, Michoacán, México. La proliferación de este pez en el embalse se ha convertido en un problema de invasión y sustitución, ya que por cada 200kg de tilapia capturadas, se capturan 800kg de pez diablo, el cual es ya considerado como una plaga. Todos esos peces, terminan tirados en la orilla de la presa, ya que no son aprovechables para comercialización, constituyendo una fuente de contaminación. Por ello, se ha propuesto la posibilidad de utilizarlo para producir harina de pescado u otros productos tales

como alimentos balanceados para ganado. Sin embargo, hasta ahora esto no ha tenido éxito debido a la falta de recursos económicos para ello (Villalba-Villalba *et al.*, 2011).

El pez puede ser utilizado de manera íntegra, ya sea para consumo humano directo o indirecto, o bien extrayéndose componentes bioactivos como lo pueden ser las enzimas digestivas de su tracto intestinal. Tomando en cuenta el amplio espacio visceral de este organismo, resulta interesante estudiar las enzimas digestivas de este pez con la finalidad de generar conocimiento básico que pueda ser utilizado por empresarios en el ramo de la tecnología de enzimas.

Un uso común de las vísceras es su utilización como materia prima en la elabora-

ción de concentrados enzimáticos, los cuales pueden ser utilizados en una gran variedad de procesos industriales. Las proteasas tienen un uso muy amplio en el sector alimentario, farmacéutico, y en la industria de los detergentes, entre otros (Castillo-Yáñez *et al.*, 2006).

Actualmente una gran cantidad de recursos se destinan al estudio de proteasas marinas debido a características muy particulares, que hacen a estas biomoléculas atractivas de estudiar. Una de éstas características es que las proteasas de origen marino poseen mayor actividad que su contraparte terrestre aún a bajas temperaturas, ya que los peces son organismos de sangre fría y en consecuencia sus enzimas deben poseer buena actividad aún a bajas tempe-

raturas, tal como sucede en las estaciones de otoño e invierno (Castillo-Yáñez *et al.*, 2009). Otra característica sobresaliente es que pueden inactivarse muy rápidamente cuando se eleva la temperatura por encima de los 55°C. Aunado a esto, estas enzimas poseen una excelente estabilidad en función del pH (Mathews y Van-Holde, 1998). Sin embargo poco se ha estudiado sobre la estabilidad de estas enzimas durante su almacenamiento. Es por ello que el presente trabajo se centra en el estudio de la estabilidad enzimática durante la refrigeración, congelación y liofilización de un extracto crudo de vísceras de pez diablo. Se monitoreó la actividad proteolítica total, así como la actividad tipo tripsina y quimotripsina, con la finalidad

PALABRAS CLAVE / Actividad Proteolítica / *Hypostomus plecostomus* / Pez Diablo / Quimotripsina / Tripsina /

Recibido: 15/12/2010. Modificado: 25/07/2011. Aceptado: 26/07/2011.

Álvaro Gálvez-Rongel. Licenciado en Química de Alimentos y estudiante de postgrado, Universidad de Sonora (USon), México.

Víctor Manuel Ocaño-Higuera. Doctor en Ciencias, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), México. Profesor, USon, México.

Ramón Pacheco-Aguilar. Ph.D. en Ciencias y Tecnología de Alimentos, Oregon State University. Investigador, CIAD, Hermosillo México.

Francisco Javier Castillo-Yáñez. Doctor en Ciencias, CIAD, México. Profesor-Investigador, USon, México.

María Elena Lugo-Sánchez. Maestra en Ciencias, CIAD, México. Investigadora, CIAD, Hermosillo, México.

Santiago Valdez-Hurtado. Doctor en Ciencias, CIAD, México. Investigador, CIAD, Las Delicias, Chihuahua, México.

Enrique Márquez-Ríos. Doctor en Ciencias, CIAD, México. Investigador, USon, México. Dirección: Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora, Encinas y Rosales s/n. Hermosillo, Sonora, 83000. México. e-mail: emarquez@guayacan.uson.mx

EFFECT OF STORAGE ON THE STABILITY OF PROTEASES OF VISCERA FROM LORICARIID CATFISH (*Hypostomus plecostomus*)

Álvaro Gálvez-Rongel, Víctor Manuel Ocaño-Higuera, Ramón Pacheco-Aguilar, Francisco Javier Castillo-Yáñez, María Elena Lugo-Sánchez, Santiago Valdez-Hurtado and Enrique Márquez-Ríos

SUMMARY

The stability of digestive proteases was evaluated in a crude extract obtained from viscera of loricariid catfish. The effect of freezing and freeze-drying were determined on the enzymatic activity. Total proteolytic activity (TPA) was monitored as well as specific proteolytic activity (EPA) for the enzymes trypsin and chymotrypsin. During refrigerated storage the specific activity was measured every 3 days until day 30, while in frozen and freeze-dried samples the enzyme activity was measured at zero time and after one month of storage. The TPA showed increased activity in the alkaline region, thought to be due to

the action of trypsin and chymotrypsin enzymes. The activity of the latter showed no significant differences ($P \geq 0.05$) and it had a higher stability during the first 15 days under refrigeration, while trypsin showed a sharp decrease in activity ($P < 0.05$) on the third day of storage. In frozen and freeze-dried samples, both the TPA and EPA did not show significant changes ($P \geq 0.05$). The viscera from loricariid catfish can be an important source for the preparation of enzyme concentrates as long as handling is in lyophilized or frozen form.

EFEITO DO ARMAZENAMENTO SOBRE A ESTABILIDADE DE PROTEASES DE VÍSCERAS DO PEIXE CASCUDO (*Hypostomus plecostomus*)

Álvaro Gálvez-Rongel, Víctor Manuel Ocaño-Higuera, Ramón Pacheco-Aguilar, Francisco Javier Castillo-Yáñez, María Elena Lugo-Sánchez, Santiago Valdez-Hurtado e Enrique Márquez-Ríos

RESUMO

Avaliou-se a estabilidade de proteases digestivas em um extrato cru obtido a partir de vísceras do peixe cascudo. Determinou-se o efeito da refrigeração, congelamento e liofilização sobre a atividade enzimática. Monitorou-se a atividade proteolítica total (APT) e atividade proteolítica específica (APE) para as enzimas tripsina e quimotripsina. Em refrigeração dita atividade se mediu cada 3 dias até o dia 30, enquanto que em congelamento e liofilização a atividade enzimática se mediu ao tempo zero e depois de um mês de armazenamento. A APT mostrou uma maior atividade na região alcalina, atribuindo-se

isto à ação das enzimas tripsina e quimotripsina. Esta última apresentou maior estabilidade ao não apresentar mudanças significativas ($P \geq 0,05$) em sua atividade durante os primeiros 15 dias em refrigeração, enquanto que a tripsina mostrou um agudo decréscimo em sua atividade ($P < 0,05$) ao terceiro dia de armazenamento. Em congelamento e liofilização, tanto a APT como a APE não mostraram mudanças significativas ($P \geq 0,05$). As vísceras de peixe cascudo podem ser uma fonte importante na elaboração de um concentrado enzimático sempre e quando este esteja liofilizado ou congelado.

de observar cual es el efecto de estos procesos sobre la actividad enzimática de un extracto crudo.

Materiales y Métodos

Obtención de muestras

El muestreo de pez diablo se realizó en el Embalse Adolfo López Mateo en el Estado de Michoacán, México. Las muestras se obtuvieron con ayuda de pescadores domésticos con una red agallera de monofilamento. Los especímenes vivos se enhielaron totalmente en una hielera, colocando capas alternadas de hielo-pescado-hielo, y se trasladaron inmediatamente a las

instalaciones de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en donde se procedió a la evisceración. Se obtuvieron cuidadosamente las vísceras y se enhielaron apropiadamente, para posteriormente ser trasladadas vía aérea al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Hermosillo, Sonora, México.

Preparación del extracto crudo

El extracto crudo se obtuvo homogeneizando 50g de vísceras con tres volúmenes de agua fría (0-3°C) durante 1min, luego se centrifugó a 15,000g durante 30min. Des-

pués de separar la grasa se recogió el sobrenadante, donde se encuentran las enzimas digestivas (Martínez y Serra, 1989). Una vez obtenidos los extractos crudos, éstos fueron almacenados mediante refrigeración (30 días, evaluándose la actividad enzimática cada 3 días), congelación (1 mes) y liofilización (1 mes). Se determinó la actividad proteolítica total (APT) y la actividad proteolítica específica (APE) tipo tripsina y quimotripsina.

Actividad proteolítica total

Se determinó la actividad proteolítica a diferentes pH de acuerdo a Simpson y Haard (1988) en el intervalo ácido

(Glicina-HCl 0,1M a valores de pH de 2,0; 2,5 y 3,0) y alcalino (Trizma base 0,1M a pH 8,0; 8,5 y 9,0). Se mezclaron 200µl de extracto crudo con 1000µl de sustrato disuelto en el buffer correspondiente (hemoglobina 1% a pH ácidos y caseína 1% a pH alcalinos). La mezcla se incubó durante 20min a 25°C y la reacción se detuvo con 500µl de ácido tricloroacético (TCA) 20%. La actividad proteolítica se cuantificó por medio del aumento en la absorbancia de la mezcla a 280nm en el sobrenadante obtenido después de haber sido centrifugado a 6,500g durante 5min. La actividad se expresó en términos de unidades de actividad (U),

la cual en este caso corresponde al incremento en absorbancia (280nm) en 20min, por mg de proteína, bajo las condiciones del ensayo. El contenido de proteína se cuantificó de acuerdo a la metodología descrita por Bradford (1976).

Actividad tipo tripsina

Se utilizó la metodología descrita por Erlanger *et al.* (1961) con pequeñas modificaciones en donde una alícuota de 10µl de extracto crudo se mezcló con 990µl de sustrato específico BAPNA 1mM disuelto en TRIS·HCl 50mM pH 8,0 y CaCl₂ 10mM a 25°C, en una celda de cuarzo. Se registró la producción de p-nitroanilina (producto de la hidrólisis de BAPNA) monitoreando el incremento en la absorbancia a 410nm durante 10min. La actividad enzimática se calculó mediante la fórmula Unidades BAPNA = $A_{(410)} / (10\text{min} \times 1000 \times 1/8800 \times \text{mg enzima})$, donde 8800 es el coeficiente de extinción molar de la p-nitroanilina.

Actividad tipo quimotripsina

Se realizó según la técnica descrita por Tsai *et al.* (1986), en donde una alícuota de 10µl de extracto crudo se mezcló con 990µl de SAAPNA 0,1mM disuelto en amortiguador Trizma base 50mM pH 8,0 y CaCl₂ 10mM a 25°C. Se registró la producción de p-nitroanilina (producto de la hidrólisis de SAAPNA), monitoreando el incremento en la absorbancia a 410nm durante 10min. La actividad enzimática se calculó mediante la fórmula Unidades SAAPNA = $A_{(410)} / (10\text{min} \times 1000 \times 1/8800 \times \text{mg enzima})$ donde 8800 es el coeficiente de extinción molar de la p-nitroanilina.

Análisis estadístico

Se hicieron tres réplicas para cada tratamiento, realizándose por duplicado cada uno de los análisis. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza de una vía utilizando el paquete esta-

dístico JMP versión 5.0.1. La comparación de medias fue realizada mediante rangos múltiples de Tukey-Kramer utilizando un nivel de significancia del 5%.

Resultados y Discusión

Actividad proteolítica total

En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de actividad proteolítica total. La mayor actividad en la región ácida se registró a pH 2,0, lo cual puede ser atribuido a la acción de la pepsina, que es la principal enzima que actúa a pH ácido (de Oña *et al.*, 2002). En la región alcalina el pH de óptima actividad fue de 8,0. Lo anterior puede deberse principalmente a la acción de tripsina y quimotripsina, las cuales tienen un pH óptimo de 7,5 a 8,0 (Martínez y Serra, 1989). Resultados similares han sido reportados por Castillo-Yáñez *et al.* (2004), así como también por Hideki *et al.* (2005), quienes trabajaron con vísceras de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) y atún de cola amarilla (*Seriola quinqueradiata*), respectivamente. La actividad proteolítica total del pez diablo en la región alcalina fue de 122U/ml, la cual se halla dentro del intervalo normal, ya que especies como la sardina monterey y atún cola amarilla presentan 108U/ml y 150U/ml, respectivamente (Castillo Yáñez *et al.*, 2004; Hideki *et al.*, 2005). Debido a que los mayores registros de actividad en las regiones ácidas y alcalinas se obtuvieron a pH de 2,0 y 8,0 respectivamente, estos fueron los pH utilizados para evaluar la estabilidad en refrigeración, congelación y liofilización.

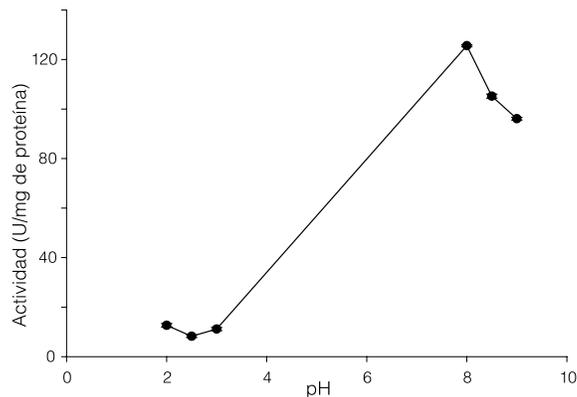


Figura 1. Actividad proteolítica total a diferentes pH. Las barras de error señalan la desviación estándar.

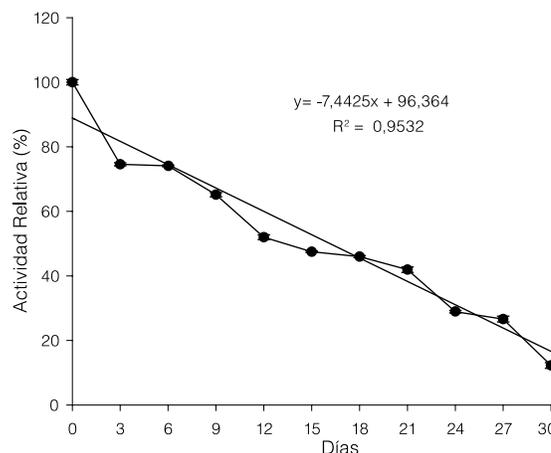


Figura 2. Actividad proteolítica total a pH 2,0 durante almacenamiento en refrigeración. Las barras de error señalan la desviación estándar.

Al almacenar el extracto crudo en refrigeración (Figura 2) se observó un decaimiento significativo ($p < 0,05$) durante el tiempo de almacenamiento en la actividad proteolítica de aquellas enzimas cuya actividad óptima es en medio ácido. Tal reducción siguió un comportamiento lineal ($y = -7,44x + 96,36$, $r^2 = 0,953$). Bajo las condiciones experimentales utilizadas en este estudio, este comportamiento ayuda a predecir de forma fácil y precisa la actividad proteolítica remanente en cualquier día del almacenamiento. La reducción en actividad hace suponer que la enzima pepsina de pez diablo posee baja estabilidad durante el almacenamiento en refrigeración bajo las condiciones de trabajo utilizadas en este estudio. La anterior presunción se basa en el supuesto de que la pepsina es una de las princi-

pales enzimas responsables de la actividad en la región ácida (de Oña *et al.*, 2002). No existen reportes en donde se evalúe la estabilidad de enzimas ácidas en un extracto crudo almacenado en refrigeración, y en consecuencia resulta difícil comparar los presentes resultados con estudios previos. No obstante esta reducción abrupta de su actividad puede atribuirse a las condiciones del almacenamiento, es decir, al pH del mismo extracto crudo, el cuál fue ligeramente alcalino (7,2). En la mayoría de los casos reportados el pH de mayor estabilidad de una enzima es aquel cercano a su actividad óptima (Mathews y Van Holde, 1998), es decir, si el pH del extracto crudo fuera cercano a 2,0 probablemente la estabilidad de las enzimas ácidas de las vísceras del pez diablo presentarían una mejor estabilidad en el almacenamiento en refrigeración.

Por otra parte, existe la posibilidad de que las proteasas alcalinas, quimotripsina y tripsina, hubiesen digerido a las otras proteasas extraídas. La baja estabilidad de proteasas ácidas durante su almacenamiento en refrigeración marca la pauta respecto a formas o estrategias de manejo para un extracto crudo en donde el interés sea la acción de estas proteasas. En consecuencia, un extracto crudo obtenido de vísceras de pez diablo debe ser utilizado inmediatamente si se desea mantener una alta actividad de proteasas ácidas, o bien almacenar el extracto crudo a pH bajo.

Por otra parte, al evaluar la actividad proteolítica en la región alcalina se encontraron mejores resultados con respecto a la actividad proteolítica

ca ácida, ya que se registró mayor estabilidad. El comportamiento de la actividad proteolítica alcalina en un extracto crudo sometido a refrigeración disminuyó de forma lineal ($y = -7,007x + 89,37$, $R^2 = 0,88$) respecto al tiempo de almacenamiento, tal como se muestra en la Figura 3. Nuevamente, bajo las condiciones del presente estudio se pone de manifiesto la pobre estabilidad de un extracto crudo de

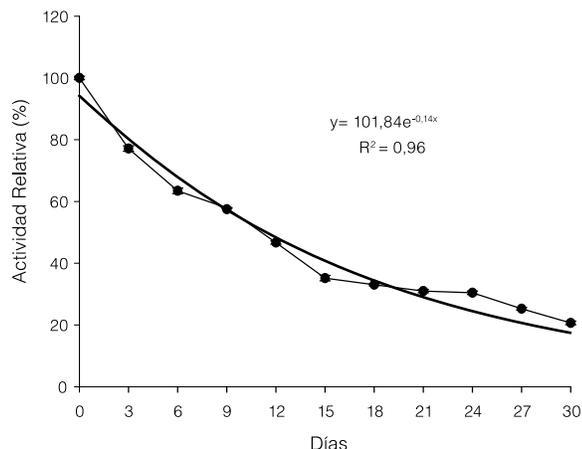


Figura 3. Actividad proteolítica total a pH 8,0 durante almacenamiento en refrigeración. Las barras de error señalan la desviación estándar.

vísceras de pez diablo sobre la actividad proteolítica, pero ahora en la región alcalina. Los resultados señalan la importancia de la rápida utilización de un extracto crudo una vez elaborado si se desea explotar al máximo su potencial proteolítico. Sin embargo, es necesario realizar más estudios con la finalidad de darle mayor estabilidad al extracto enzimático obtenido.

La evaluación de la actividad proteolítica ácida y alcalina por efecto de la congelación y liofilización se muestran en la Figura 4, donde se aprecia que tanto la congelación como la liofilización pueden ser buenas alternativas en la preservación de la actividad proteolítica de un extracto crudo a partir de vísceras de pez diablo. No se encontraron diferencias significativas ($P \geq 0,05$) al evaluar la actividad proteolítica (pH 2 y 8) de un extracto crudo recién elaborado y extractos crudos almacenados durante un mes en congelación y liofilización. En un extracto crudo, tanto enzimas ácidas como alcalinas pueden ser preservadas por cualquiera de ambos métodos sin modificar en gran medida sus características proteolíticas, sin embargo cuando se trata de almacenamiento en refrigeración su actividad enzimática se ve seriamente afectada.

Actividad proteolítica específica

La Figura 5 muestra los resultados obtenidos en relación a la actividad específica tipo tripsina y quimotripsina durante el almacenamiento en refrigeración. En lo que respecta a la actividad tipo tripsina se aprecia una disminución drástica, cercana al 80%, de actividad durante los primeros tres días de almacenamiento, para después disminuir su actividad lentamente en el periodo restante. Por otra parte, la actividad específica tipo quimotripsina mostró buena estabilidad durante 21 días de almacenamiento, para después disminuir marcadamente su actividad durante el almacenamiento. Este experimento demuestra que la reducción de actividad proteolítica

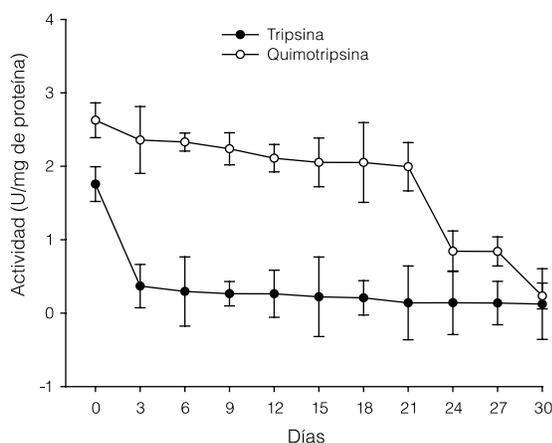


Figura 5. Efecto del almacenamiento en refrigeración sobre la actividad de tripsina y quimotripsina. Las barras de error señalan la desviación estándar.

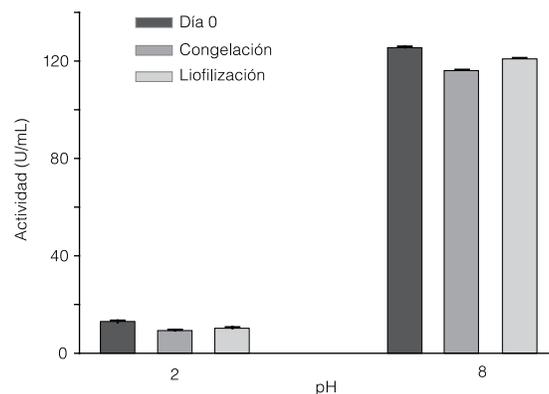


Figura 4. Estabilidad de la actividad proteolítica total a pH 2,0 y 8,0. Las barras de error señalan la desviación estándar.

en la región alcalina se debió principalmente a la pobre estabilidad de la tripsina durante el almacenamiento en refrigeración. Los resultados resaltan la gran estabilidad de quimotripsina en un extracto crudo, característica que podría ser sumamente útil si lo que se desea es explotar la actividad de esta enzima.

La evaluación de la actividad específica tipo tripsina y quimotripsina como resultado del almacenamiento en congelación y liofilización se muestran en la Figura 6. La tripsina es altamente inestable si se mantiene en refrigeración; sin embargo una buena alternativa para preservar o conservar su actividad enzimática es mediante la congelación o liofilización ya que ambos procesos prácticamente mantienen intactas sus propieda-

des catalíticas; es decir, no hubo diferencias significativas ($P \geq 0,05$) en la actividad de un extracto crudo recién elaborado y aquellos extractos crudos que se sometieron a almacenamiento en congelación y liofilización durante un mes. Por otra parte, la quimotripsina presenta muy buena estabilidad durante la refrigeración; sin embargo, si el extracto enzimático es sometido a congelación o liofilización su actividad enzimática se reduce significativamente ($P < 0,05$). Por lo tanto, si se desea explotar la actividad tipo quimotripsina de un extracto de vísceras de pez diablo, este puede refrigerarse hasta por 21 días manteniendo una buena actividad, y después podría ser congelado o liofilizado, dependiendo de las necesidades o capacidad de la

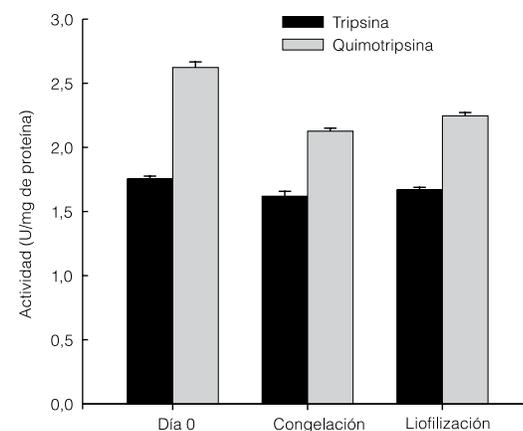


Figura 6. Estabilidad de tripsina y quimotripsina en congelación y liofilización. Las barras de error señalan la desviación estándar.

industria. No obstante, como ya se mencionó anteriormente, es necesario realizar nuevos estudios encaminados a obtener una mayor estabilidad de las proteasas presentes en el extracto enzimático. El almacenamiento de dicho extracto a distintos pH, fuerza iónica, concentración de proteínas, etc., probablemente mejoren la estabilidad de las enzimas proteolíticas del extracto obtenido del pez diablo. Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente estudio indican que las vísceras del pez diablo son una buena fuente de enzimas proteolíticas ácidas y alcalinas, las cuales podrían ser de gran utilidad en procesos industriales, principalmente en la industria alimentaria o bien en el tratamiento de aguas residuales con alta carga orgánica.

Conclusiones

Bajo las condiciones experimentales del presente estudio, la conservación de un extracto crudo mediante refrigeración no parece ser la metodología más viable para preservar la actividad catalítica

de las proteasas presentes en él. Solo en el caso de quimotripsina la refrigeración es una alternativa viable hasta por un periodo de tres semanas; no obstante, el pH de almacenamiento pudo haber jugado un papel fundamental. Por otra parte, tanto la congelación como la liofilización parecen ser tecnologías adecuadas para la preservación de las propiedades catalíticas de proteasas presentes en un extracto, sin embargo ambos procesos reducen significativamente la actividad específica tipo quimotripsina. Se requiere de estudios adicionales enfocados al mantenimiento de las buenas propiedades proteolíticas de proteasas presentes en un extracto crudo sometido a refrigeración, así como estudios de congelación y liofilización cuyo tiempo de almacenamiento sea más prolongado que el explorado, todo ello acompañado del uso de distintos estabilizantes.

REFERENCIAS

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the

principle of dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Castillo-Yáñez FJ, Pacheco-Aguilar R, García-Carreño FL, Navarrete-Del Toro MA (2006) Purification and biochemical characterization of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caeruleus*). *Food Chem.* 99: 252-259.

Castillo-Yáñez FJ, Pacheco-Aguilar R, García-Carreño FL, Navarrete-Del Toro MA (2004) Characterization of acidic proteolytic enzymes from monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. *J. Food Chem.* 85: 343-350.

Castillo-Yáñez FJ, Pacheco-Aguilar R, Lugo-Sánchez ME, García-Sánchez G, Quintero-Reyes IE (2009) Biochemical characterization of an isoform of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*), and comparison with bovine chymotrypsin. *Food Chem.* 112: 634-639.

De Oña C, Gaviño MD, Martínez TF, Alarcón FJ, Díaz M, Abellán E (2002) Caracterización de proteasas ácidas del dentón (*Dentex dentex*), pargo (*Pagrus pagrus*) y del híbrido *Dentex x pagrus*. *IX Congreso Nacional de Acuicultura*. Cádiz, España (mayo, 2003). pp. 101-105.

Erlanger BF, Kokowski N, Cohen W (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin.

Arch. Biochem. Biophys. 95: 271-278.

Hideki K, Yusuke T, Sappasith K, Scoottawat B, Seiichi A (2005) Comparative study of enzymatic characteristics of trypsin from the pyloric ceca of yellow tail (*Seriola quinqueradiata*) and brown hake (*Physiculus japonicus*). *J. Food Biochem.* 30: 521-534.

Martínez A, Serra JL (1989) Proteolytic activities in the digestive tract of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 93B: 61-66.

Mathews C, Van Holde E (1998) *Bioquímica*. 2ª ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. pp. 854-855

Simpson BK, Haard NF (1988) Trypsin and trypsin-like enzymes from the stomachless cunner (*Tautoglabrus adspersus*). Catalytic and other physical characteristics. *J. Food Biochem.* 17: 97-113.

Villalba-Villalba AG, Pacheco-Aguilar R, Ramírez-Suárez JC, Valenzuela-Soto EM, Castillo-Yáñez FJ, Márquez-Ríos E (2011) Partial characterization of alkaline proteases from viscera of vermiculated sailfin catfish *Pterygoplichthys disjunctivus*, Weber, 1991. *Fish. Sci.* 77: 697-705.

Tsai I, Chuang K, Chuang J (1986) Chymotrypsins in digestive tracts of crustacean decapods (shrimps). *Comp. Biochem. Physiol.* 85B: 235-239.