



Caracterización y potencial aplicación industrial de extractos enzimáticos de pacú (*Piaractus mesopotamicus*)

Acevedo Gomez, A.V.^{1,2*} ; Gomez, G.N.^{1,2} ; Medina, D.M.^{1,2} ; Bogado, C.^{1,2};
Bustillo, S.^{1,2} ; Leiva, L.C.¹ 

¹Laboratorio de Investigación en Proteínas (LabInPro), IQUIBA-NEA, UNNE, CONICET, FACENA (Campus “Deodoro Roca” Av. Libertad N° 5460), 3400, Corrientes, Argentina. ²Grupo de Investigaciones Biológicas y Moleculares (GIByM) IQUIBA-NEA, UNNE, CONICET, FACENA (Campus “Deodoro Roca” Av. Libertad N°5460), 3400, Corrientes, Argentina. E-mail: antonellavag@hotmail.com

Resumen

La producción pesquera puede generar cantidades considerables de residuos cuya disposición final inadecuada puede causar daños ambientales. La utilización de estos desechos para la obtención de productos con alto valor agregado y de interés industrial, es una alternativa para la producción acuícola sostenible. En este trabajo se obtuvieron y caracterizaron extractos ácidos ricos en enzimas tipo pepsina (EP) y alcalinos ricos en enzimas tipo tripsina (ET) a partir de vísceras de pacú (*Piaractus mesopotamicus*) evaluando sus potenciales aplicaciones biotecnológicas. EP y ET exhibieron máxima actividad catalítica a pH 2 - 45°C y pH 7 - 45°C; mostraron ser estables en los rangos de pH 1,0 a 3,5 y 7,5 a 10,5 y de temperatura 0 a 37°C y 0 a 45°C, respectivamente. La actividad de EP fue inhibida por pepstatina A pero no por PMSF y SBTI; EDTA y SDS provocaron inhibición parcial, confirmando la presencia de enzimas de tipo pepsina. ET se inactivó en presencia de SBTI pero no por SDS; PMSF y EDTA disminuyeron en un 50% su actividad, confirmando la existencia de enzimas tipo tripsina. Los iones divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) no modificaron la capacidad proteolítica de los extractos, en cambio se redujo a concentraciones crecientes de NaCl. Por otra parte, ET y EP fueron eficaces para hidrolizar el recubrimiento de gelatina impregnado con plata de placas radiográficas usadas y generar fragmentos F(ab')_2 a partir de la degradación de IgG equinas, respectivamente. En conclusión, estos extractos podrían ser aplicables en procesos donde se requiera máxima actividad a temperatura moderada y baja concentración de NaCl; en la recuperación de plata metálica y celuloide de placas radiográficas reveladas como así también la obtención de productos biológicos. Estos resultados abren nuevas perspectivas para la economía circular de las explotaciones acuícolas del pacú.

Palabras clave: Subproductos, *Piaractus mesopotamicus*, extractos enzimáticos, pepsina, tripsina, aplicaciones industriales.

Characterization and potential industrial application of enzymatic extracts from pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

Abstract. Fish production can generate considerable amounts of waste, whose inadequate final disposition could cause environmental damage. The use of these wastes to obtain high value-added products of industrial relevance is an alternative for sustainable aquaculture production. In this study, acidic extracts rich in pepsin-like enzymes (EP) and alkaline extracts rich in trypsin-like enzymes (ET) were obtained and characterized from the viscera of pacu (*Piaractus mesopotamicus*), evaluating their potential biotechnological applications. EP and ET showed maximum catalytic activity at pH 2 - 45°C and pH 7 - 45°C, respectively. They were stable in pH ranges of 1.0 to 3.5 and 7.5 to 10.5 and temperature ranges of 0 to 37°C and 0 to 45°C, respectively. The activity of EP was inhibited by pepstatin A, but not by PMSF and SBTI. EDTA and SDS caused partial inhibition, confirming the presence of pepsin-like enzymes. ET was inactivated in the presence of SBTI but not by SDS. PMSF and EDTA decreased the activity by 50%, confirming the presence of trypsin-like enzymes. Divalent ions (Ca^{2+} and Mg^{2+}) did not alter the proteolytic capacity of the extracts,

but it decreased with increasing NaCl concentration. Moreover, ET and EP were effective in hydrolyzing the silver-impregnated gelatin coating of discarded x-ray films and generating F(ab')₂ fragments from equine IgG degradation, respectively. In conclusion, these extracts could be applicable in processes requiring maximum activity at moderate temperatures and low NaCl concentrations, in the recovery of metallic silver and PET sheet from used x-ray films and in the production of biological products. These results open up new perspectives for the circular economy of pacú aquaculture farms.

Key words: byproducts, *Piaractus mesopotamicus*, enzymatic extracts, pepsin, trypsin, industrial applications.

INTRODUCCIÓN

El continuo crecimiento de la población mundial implica intensificación y diversificación las fuentes de alimentos. En los últimos 20 años, los aportes de la pesca y la acuicultura a la seguridad nutricional y alimentaria mundial han sido esenciales. Desde 1961, el consumo a nivel global de los alimentos de origen acuático incrementó a una tasa promedio anual de 3,0% y se estima que en 2030 su valor será de 21,4 kg per cápita. Este fenómeno es consecuente con la constante expansión del sector, impulsado por la acuicultura y lo cual ha promovido el desarrollo de la producción de peces en aguas continentales. En efecto, en 2020 el 48% de los productos de la acuicultura fueron cultivados bajo este sistema (FAO 2022).

El procesamiento del pescado para consumo humano genera una gran cantidad de desechos, representando desde un 20 hasta un 60% del peso del pescado, dependiendo del grado de industrialización. Las cabezas, huesos, vísceras, escamas y pieles son los subproductos más comunes (FAO 2022), principalmente descartados o empleados para obtener productos de bajo valor agregado (ej. harina de pescado). Esto da lugar a un problema dual que involucra cuestiones medioambientales y aplicaciones menos rentables de estos subproductos y desechos. Es necesario, entonces, lograr la valorización de dichos descartes y subproductos, contribuyendo a generar industrias pesqueras más sostenibles (Korkmaz y Tokur 2022). En este sentido las vísceras de pescado son una fuente valiosa de enzimas digestivas, especialmente de proteasas, tales como pepsina y tripsina. Las proteasas constituyen el grupo de enzimas más utilizadas en los bioprocesos industriales, representan alrededor del 40% al 65% del total de preparados comerciales de enzimas (Friedman y Contreras 2021). La pepsina y la tripsina son ampliamente usadas en la producción de detergentes, la fabricación de alimentos, la industria farmacéutica y la producción de cuero (Zhao et al. 2011). Las preparaciones comerciales utilizan enzimas de origen microbiano, porcino o bovino. Sin embargo, en las últimas décadas se han aislado pepsinas y tripsinas provenientes de distintos organismos acuáticos con el fin de caracterizarlas y estudiar su aplicación. Estas proteasas presentan características diferenciales respecto a las de las fuentes tradicionales, por lo que resultan atractivas para la industria (Zhao et al. 2011, Poonsin et al. 2019, Kuepethkaew et al. 2022) respectively. Based on SDS-PAGE analysis, using proteomics analysis and Isoform-sequencing (Iso-Seq).

La pepsina es una proteasa ácida (máxima actividad catalítica a pH bajo). Se sintetiza en la membrana gástrica del estómago bajo una forma inactiva, el pepsinógeno, estable en medios neutros y ligeramente alcalinos. Se activa a pepsina

al ser expuesto al ácido clorhídrico presente en el jugo gástrico (pH 1,5 - 2,0). La tripsina es una serino proteasas y su mayor actividad enzimática la presenta en un rango alcalino, entre pH 8,0 y 10,0. En los peces con estómago e intestino proximal, la tripsina es producida en su forma inactiva (tripsinógeno) por el ciego pilórico, divertículo embriológica y fisiológicamente equivalente al páncreas de los mamíferos (Baldisserotto et al. 2014). Su activación es catalizada por la enteropeptidasa en el intestino. A la vez, la tripsina ya catalíticamente activa es capaz de activar a otras moléculas de tripsinógeno (Torrissen y Male 2000).

El pacú (*Piaractus mesopotamicus*) es un pez endémico de la cuenca del río Paraguay-Paraná que, debido a su elevada tasa de crecimiento, hábito de alimentación omnívoro, rusticidad y buena calidad muscular se lo produce masivamente en sistemas acuícolas intensivos. En efecto, constituye una de las especies más cultivadas en América del Sur y su producción se ha extendido a países asiáticos como China, Tailandia y Vietnam. Argentina, Brasil y Paraguay son los principales países productores, alcanzando una producción total de 17.282 toneladas en 2017 (Montenegro et al. 2022). Se lo comercializa principalmente en forma de filete lo que implica que, una gran fracción (30 - 80%) del peso del pescado resulte desechado. En este sentido, las vísceras del pacú pueden revalorizarse como fuente de enzimas fuente de enzimas proteolíticas (pepsina y tripsina), contribuyendo a la disminución de los problemas ambientales asociados a su descarte e incrementando el retorno económico de las industrias procesadoras de pacú. Con el propósito de darle un valor agregado a estas enzimas digestivas, es necesario conocer previamente sus propiedades funcionales. Es por ello que, el objetivo de este trabajo fue obtener extractos con actividad pepsina y tripsina de los desechos del procesamiento de pacú obtenido por acuicultura, caracterizarlos y medir sus capacidades hidrolíticas sobre sustratos específicos a fin de evaluar su potencial uso industrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras. Las vísceras de pacú fueron provistas por la empresa Puerto Las Palmas S.A. (Pacú Teko ® -: PLP GROUP). Las mismas fueron colectadas en bolsas de plástico selladas y mantenidas a -20°C hasta su utilización.

Obtención de extractos enzimáticos

Extracto con actividad tripsina (ET). El extracto con actividad tripsina se obtuvo según el procedimiento descrito por Fuchise et al. (2011). Se disgregó el tejido de ciegos pilóricos utilizando buffer Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 7,8 en una relación 1:5 (g tejido

ml⁻¹ de buffer). La solución se sonicó por 15 min, se centrifugó por 10 min a 10.000 g y se recogió el sobrenadante al que se denominó extracto con actividad tripsina (ET). El procedimiento se llevó a cabo a 4°C. El ET se conservó a -20°C hasta su utilización, por un período máximo de 3 meses.

Extracto con actividad pepsina (EP). El extracto con actividad pepsina se obtuvo según el procedimiento descrito por Acevedo Gomez et al. (2018). El tejido de la mucosa gástrica se disgregó utilizando buffer glicina-HCl 0,1 M pH 2 en una relación 1:5 (g tejido ml⁻¹ de buffer). La solución se sonicó por 15 min, se centrifugó por 10 min a 10.000 g, se recogió el sobrenadante al que se denominó extracto con actividad pepsina (EP). El procedimiento se llevó a cabo a 4°C. El EP se conservó a -20°C hasta su utilización, por un período máximo de 3 meses.

Cuantificación de proteínas totales. La concentración de proteínas totales de los extractos enzimáticos se determinó empleando el método descrito por Bradford (1976), empleando albúmina bovina como estándar.

Actividad Enzimática del ET. Se evaluó en medio alcalino sobre dos sustratos diferentes:

Actividad sobre sustrato específico Na-benzoil-DL-arginina-P-nitroanilida (BAPNA). Se empleó el método cinético descrito por Ágeirsson et al. (1989) empleando una solución de BAPNA (al 1% (P/V) en buffer 0,1M Tris-HCl (pH 8,0), la reacción se realizó a 30°C por 6 min. Una unidad de actividad enzimática se definió como cantidad de proteína que genera un aumento de la absorbancia a 410 nm en un valor igual a 1 por minuto.

Actividad sobre azocaseína. Se siguió la metodología descrita por Wang y Huang (2002) empleando una solución de azocaseína (5 mg ml⁻¹ en buffer fosfato PBS, pH 7,2), la reacción se llevó a cabo a 37°C durante 90 min. La actividad proteolítica se expresó como el cambio de absorbancia a 450 nm producido por 45 µL de muestra, respecto a los blancos de reacción (sin ET) en las condiciones de ensayo. Los resultados se expresaron en actividad relativa porcentual respecto al máximo de actividad del ensayo, considerado como 100%.

Actividad enzimática del EP. La actividad proteolítica de los extractos ácidos se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Acevedo Gomez et al. (2018), utilizando como sustrato hemoglobina ácida e incubando con el extracto a 37°C por 30 min. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de proteína que genera un aumento de la absorbancia a 280 nm en un valor igual a 1, durante una incubación de 30 min en las condiciones del ensayo.

Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática. El efecto del pH sobre la actividad enzimática de ET y EP se estudiaron en los rangos de 1,0 a 8,0 y de 1,0 a 10,0, respectivamente, según los métodos descriptos anteriormente (Actividad sobre sustrato específico Na-

benzoil-DL-arginina-P-nitroanilida (BAPNA) y Actividad enzimática del EP). Evaluando para ET los pHs 1,0, 3,6, 5,0, 7,0, 8,0, 9,0 y 10,0; mientras que para EP se estudiaron los pHs 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 y 8,0, atendiendo al rango de actividad de las enzimas de interés en los extractos.

Los buffers utilizados fueron: HCl-KCl 0,1 M (pH 1,0), glicina-HCl 0,1 M (pH 2,0-3,0), acetato 0,1 M (pH 5,0), Tris-HCl 20 mM (pH 7,0-9,0), glicina-NaOH 0,1 M (pH 11,0).

El efecto de la temperatura sobre la actividad de los extractos se evaluó en el rango de 0 a 80°C. Evaluando para ET las temperaturas 0, 10, 25, 37, 45, 60 y 75°C; mientras que para EP se estudiaron las temperaturas 0, 11, 25, 37, 45, 60 y 80°C. Las muestras y los sustratos se pre-incubaron durante 5 min a la temperatura definida antes de cada reacción. Los resultados se expresaron en actividad porcentual respecto al máximo de actividad considerado como 100%.

Estabilidad en función de pH y la temperatura.

La estabilidad frente al pH se estudió siguiendo la metodología descrita por Acevedo Gomez (2019a). Para ello se incubaron los extractos a temperatura ambiente durante 120 min con los buffers a diferentes pHs en proporción 1:1 (muestra:buffer). El intervalo de pH y el sistema de buffers utilizados se corresponden con los evaluados previamente. La actividad proteolítica residual de cada muestra se determinó inmediatamente después de la incubación y luego de que las muestras fueran llevadas previamente al pH apropiado para cada extracto. Se calculó la actividad enzimática comparándola con una muestra control (100% de actividad) pre-incubada con buffers Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 7,8 y glicina-HCl 0,1 M pH 2 para ET y EP, respectivamente.

El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de los extractos se evaluó incubándolos a diferentes temperaturas, 0, 4, 20, 37, 45, 60 y 80°C por 120 min y luego se determinó la actividad proteolítica residual de las muestras respecto a una muestra control sin pre-incubar (100% de actividad). Para este estudio particular, la actividad del extracto con actividad tripsina (ET) se evaluó utilizando como sustrato azocaseína, debido a una limitación metodológica en el espectrofotómetro empleado.

Efecto del NaCl. La influencia del NaCl sobre la actividad enzimática de las muestras se determinó mediante la técnica descrita por Klomklao et al. (2008) con mínimas modificaciones. Se adicionó NaCl a las muestras hasta obtener concentraciones finales de 5, 10, 15, 20, 25 y 30% (P/V) y luego se pre-incubaron a temperatura ambiente por 2 h. Los resultados se expresaron en actividad porcentual respecto a los controles, sin adición de NaCl (100%).

Efecto de iones e inhibidores. Las muestras (200 µL) se pre-incubaron con los inhibidores SDS, PMSF, EDTA, SBTI pepstatina A y los activadores MgCl₂ o CaCl₂ (200 µL) durante 30 min a temperatura ambiente, posteriormente se determinó la actividad proteolítica de las mismas. Las concentraciones ensayadas fueron: SDS 0,1 y 0,005% (P/V); PMSF 1 mM; EDTA 2 mM; SBTI 0,05 mM; pepstatina A 10 µM; MgCl₂ o CaCl₂ 1 y 5 mM. Los resultados se expresaron en actividad porcentual respecto a los controles, sin adición de inhibidores o activadores (100%).

Potenciales aplicaciones industriales

Recuperación de placas radiográficas. Se determinó la capacidad de extractos con actividad tripsina para hidrolizar la capa de gelatina impregnada en plata que recubre las placas radiográficas siguiendo la metodología descrita por Acevedo Gomez et al. (2022), con algunas modificaciones. Se prepararon extractos con agua destilada (ET_{aq}-M1), solución fisiológica (ET_{fis}-M2) y buffer Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 7,8 (ET-M3) de acuerdo con el apartado 2.3. Las placas radiográficas (1 x 1 cm) se sumergieron en 2 ml de los extractos (0,06 U) y se agitaron manualmente durante 2 s cada 5 min hasta que la capa de gelatina de plata se eliminó por completo. El ensayo se realizó a temperatura ambiente (20°C) y la liberación de plata desde la placa al medio se siguió por medición de la turbidez (620 nm) de alícuotas tomadas a diferentes tiempos del medio líquido que baña las placas. Los resultados se expresaron como el incremento porcentual de la turbidez de cada medio respecto a su valor inicial. Se realizaron blancos y controles en iguales condiciones para descontar la influencia de los medios.

Hidrólisis de inmunoglobulinas. Se ensayó la capacidad del EP para clivar IgG equina. Para ello, las IgG se purificaron de suero entero mediante cromatografía de afinidad. Posteriormente se las mezcló en proporción 1:1 con el extracto (136, 7 U mg⁻¹) e incubó a 37°C. A los tiempos 1, 3, 12 y 24 h se tomaron alícuotas que se neutralizaron con buffer tris-HCl 1M pH 9 y congelaron hasta su posterior análisis. Se realizaron controles en iguales condiciones incubados por 24 h reemplazando el EP por PBS - control negativo- y por una solución de pepsina porcina (5 mg ml⁻¹ en buffer glicina-HCl 0,1M pH 2- Sigma Aldrich®, ≥250 U mg⁻¹) - control positivo-. Las muestras se sometieron a un análisis por SDS-PAGE en condiciones no reductoras según el método de Laemmli et al. (1970) y empleando Coomassie Blue R-250 para la tinción.

Análisis estadístico. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. La significancia de las diferencias entre las medias fue evaluada mediante ANOVA siguiendo el test de Tukey para comparaciones múltiples entre grupos. Los valores de p menores a 0,05 fueron considerados significativos estadísticamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extractos con actividad tripsina y pepsina. A partir de los ciegos pilóricos y la mucosa del estómago de ejemplares de pacú de un promedio de 1,5 kg se obtuvieron los extractos con actividad tripsina (ET) y pepsina (EP) cuyas concentraciones proteicas y actividades proteolítica media resultaron 3,79 ± 0,31 mg ml⁻¹ y 0,78 ± 0,06 U/mg⁻¹; 0,05 ± 0,01 mg ml⁻¹ y 10,59 ± 0,30 U mg⁻¹ empleando los sustratos BApNa y hemoglobina ácida, respectivamente. Para ET se utilizó un mínimo de tres ciegos pilóricos (masa promedio 2,90 g) resultando un volumen promedio de 4,67 ml ET/ciego pilórico; mientras que para el EP se empleó un mínimo de tres estómagos (masa promedio 0,26 g mucosa/estómago) resultando un volumen promedio de 18,73 ml EP/estómago.

Previamente, se ha reportado que los extractos con actividad pepsina de los peces de agua dulce sábalo (*Prochilodus lineatus*), surubí (*Pesudoplatistoma* sp.), pez disco (*Symphysodon aequifasciata*), carpa india mayor (*Labeo rohita*) exhibieron actividades 43,4; 205; 0,64 y 2,9 U mg⁻¹ frente al sustrato hemoglobina ácida (Acevedo Gomez et al. 2018:2019b, Chong et al. 2002, Mohanty et al. 2020). En este trabajo, los resultados obtenidos para el EP de pacú evidenciaron un valor intermedio entre los informados por la literatura. No se encontró una correlación entre tipo de alimentación y actividad del tipo pepsina exhibida por estos extractos dada la amplitud en el rango de valores que se reportan para diferentes especies.

El ET presentó una actividad similar a la de los extractos crudos de los peces raya espinosa (*Raja clavata*) y pez disco (*S. aequifasciata*) y superiores al del lenguado (*Paralichthys orbignyanus*), cuyos valores reportados fueron 0,87; 0,79 y 0,51 U mg⁻¹ frente al sustrato BApNa (Chong et al. 2002, Lassoued et al. 2015, Candiottto et al. 2017).

Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática. Los extractos EP y ET exhiben actividad proteolítica en rangos de pH claramente diferenciados con una pérdida de la misma más acentuada para el primero, tal como se muestra en la Figura 1 (A).

En general las proteasas digestivas ácidas de organismos acuáticos son activas a pH ácido, presentan sus óptimos en el rango de 2,0 a 3,5 y cuando el medio se desvía de estos valores la actividad disminuye (Zhao et al. 2011). El rango de pHs con actividad enzimática del EP de pacú (pHs 1,0 a 3,5) resultó similar a lo reportado para los extractos de surubí, lenguado y jaurel amarillo (Candiottto et al. 2017; Acevedo Gomez et al. 2022; Silva et al. 2022a). Además, el pH óptimo de actividad (pH 2) coincide con los valores reportados para extractos similares de los peces sábalo, surubí, lenguado y cojinúa amarilla (*Carangoides bartholomaei*) (Acevedo Gomez et al. 2018:2019b, Candiottto et al. 2017, Silva et al. 2022b). La determinación del pH óptimo de una enzima es esencial ya que constituye un indicador para su potencial aplicación en diferentes procesos (Mohanty et al. 2020). Estos resultados indican que tanto el EP, como las pepsinas de pacú, podrían ser utilizadas para la hidrólisis de proteínas alimentarias. El medio ácido que requieren para su funcionalidad sería una ventaja adicional ya que contribuiría a minimizar la posible contaminación, impidiendo el óptimo crecimiento de un gran número de bacterias (Kuepethkaew et al. 2022).

Por otro lado, las proteasas digestivas alcalinas de peces son activas a valores de pH neutro o ligeramente alcalino. Para diversos sustratos sus óptimos se sitúan en el rango de pH 7,5 - 11,0, mientras que en medios ácidos se tornan inestables perdiendo actividad debido a su desnaturalización (Bougatef 2013). La actividad proteolítica del ET de pacú se mantuvo en un rango entre 5,5 y 10,0, similar a lo reportado para la raya espinosa (*Raja clavata*), el pez gato (*Pangasianodon gigas*) y la carpa mayor india (Vannabun et al. 2014, Lassoued et al. 2015, Younes et al. 2015). Presentó una actividad catalítica máxima a pH 7, valor inferior a lo reportado para los extractos con actividad tripsina de los peces lenguado, cuchumite (*Centropomus parallelus*) y carpa mayor india de 9,5; 8,0 y 10,0, respectivamente (Candiottto et al. 2017, Jesús-Ramirez et al. 2017, Mohanty et al. 2020).

El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de los extractos se puede observar en la Figura 1 (B).

Los óptimos de actividad para los extractos EP y ET coinciden en 45°C. A temperaturas inferiores, la capacidad proteolítica de ambos extractos disminuye siguiendo un mismo patrón de comportamiento. EP y ET retienen un 60% de la actividad máxima a 10°C y sólo un 20% a 0°C. Por encima de los 45°C, la actividad de EP disminuye rápidamente, inactivándose a los 60°C, mientras que esta pérdida es menos acentuada en ET, conservando el 60% de la actividad máxima a los 80°C. Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los reportados para los extractos con actividad pepsina y tripsina obtenidos de los peces gato, carpa india mayor y cuchumite (Vannabun et al. 2014, Jesús-Ramírez et al. 2017, Mohanty et al. 2020).

Al comparar los óptimos de actividad de los extractos de pacú (45°C para ambos extractos) con los de las enzimas comerciales de pepsina y tripsina de origen porcino (60°C), se puede observar que la disponibilidad de fuentes de enzimas proteolíticas que operen a temperaturas moderadas resultaría atractiva para la industria. El uso de pepsinas y tripsinas aisladas de peces tendría un impacto positivo en la disminución de los costos de servicio auxiliar de los procesos que utilizan estas enzimas.

Efecto del pH y la temperatura sobre la estabilidad enzimática. Los extractos con actividad pepsina y tripsina mostraron ser estables en rangos acotados de pH (Figura 1 C).

EP conservó actividades iguales o superiores al 60% de su actividad inicial en el rango de pH de 1,0 a 3,5, su capacidad proteolítica decae rápidamente a pHs mayores a 3,0 y se inactiva a pH 4,0. El comportamiento de EP frente al pH es similar al reportado por Bougatef et al. (2008) para la pepsina del tiburón *Smooth hound*.

Por lo general, las proteasas ácidas de peces no son estables a pHs diferentes a su óptimo (Silva et al. 2022a). Sin embargo, existen varios estudios de extractos de proteasas ácidas de peces que muestran que estas enzimas conservan elevada capacidad proteolítica hasta pH neutros o parcialmente alcalinos (Vannabun et al. 2014, Acevedo Gomez et al. 2018:2022).

Por otra parte, ET fue estable en los intervalos de pH 7,5 - 10,5, conservando actividades iguales o superiores al 60% de su capacidad proteolítica inicial. Su actividad decrece a pH mayores a 10,0 e inferiores a 8,0 siendo más acentuado este último. Este mismo comportamiento se observó para los extractos con actividad tripsina de los peces escorpión rojo, pez gato, el jaurel amarillo y la raya espinosa al incubarse a diferentes pHs por 2h (Vannabun et al. 2014, Lassoued et al. 2015, Younes et al. 2015, Silva et al. 2022a).

Según Mohanty et al. (2020), las variaciones en las propiedades moleculares de las enzimas, incluyendo la estabilidad estructural, son los factores determinantes de las diferencias que se observan en la estabilidad frente al pH de las proteasas en las diferentes especies.

La estabilidad de los extractos en función de la temperatura se muestra en la Figura 1 (D). EP preservó más del 90% de su capacidad proteolítica inicial en el intervalo de 0 a 37°C, a temperaturas superiores la actividad residual decae marcadamente inactivándose a 60°C. El comportamiento de ET fue similar al de EP hasta los 37°C, a temperaturas superiores, sin embargo, la pérdida de actividad que experimenta es menos pronunciada. ET conserva el 89% de su capacidad proteolítica inicial a 60°C, mientras que luego de ser incubado por 2 h a 75°C pierde completamente su actividad proteolítica.

Los extractos con actividad pepsina y tripsina de pacú evidenciaron ser estables a temperaturas similares a las reportadas para los extractos de los peces lenguado, sábalo y pez gato (Acevedo Gomez et al. 2018, Candiottio et al. 2017, Vannabun et al. 2014).

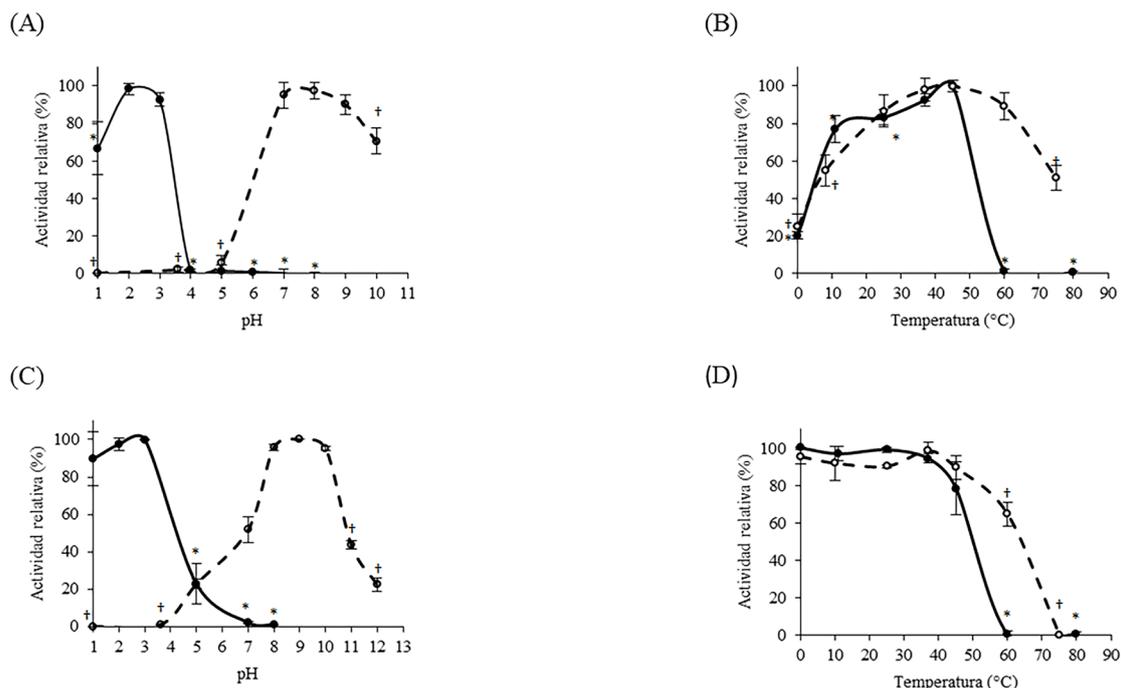


Figura 1. Efectos del pH (A) y la temperatura (B) en la actividad proteolítica de los extractos con actividad pepsina -EP- (●) y tripsina -ET- (○) de pacú (*Piaractus mesopotamicus*). Efecto del pH (C) y la temperatura (D) en la estabilidad enzimática de los extractos EP (●) y ET (○) luego de ser incubados durante 120 min en las condiciones seleccionadas. Los resultados se presentan como la media \pm SD (n = 3, * p < 0,05; EP, †p < 0,05; ET).

Efecto del NaCl en la actividad enzimática. En este trabajo al evaluar la actividad de los extractos EP y ET en un rango de 0 - 30% NaCl se observó un decaimiento de la actividad conforme se incrementa la concentración de la sal (Figura 2).

EP demostró ser más sensible que ET a la presencia de NaCl, registrando una disminución de su actividad proteolítica en un rango del 35 al 60% de su actividad inicial después de ser incubado con concentraciones de NaCl entre 15 y 30%. Este comportamiento es consistente con la disminución de la actividad proteolítica reportada para los extractos de los peces cojinúa amarilla, sábalo, carpa india mayor y jaurel amarillo expuestos a concentraciones crecientes de NaCl (Acevedo Gomez et al. 2018, Mohanty et al. 2020, Silva et al. 2022a, Silva et al. 2022b).

En contraste, ET preservó entre el 90 y el 61% de su actividad proteolítica inicial al pre-incubarse 2 h con el mismo rango de concentración de NaCl. Resultados similares fueron reportados para los extractos alcalinos de los peces sardina real (*Sardinops melanostictus*) y pez gato (Klomklao et al. 2008, Vannabun et al. 2014).

Khaled et al. (2011) han sugerido que la disminución en la actividad proteolítica de las proteasas de peces frente al NaCl se debe al efecto de *salting-out*. Es posible que al incrementar la fuerza iónica del medio el NaCl compita con la enzima en la unión del agua, generando una interacción proteína-proteína más fuerte que conduce a su precipitación.

El interés industrial en estudiar el efecto de elevadas concentraciones de NaCl sobre la actividad de las enzimas proteolíticas radica en evaluar la factibilidad de emplearlas como aditivos para acelerar la fermentación en productos con alto contenido de sales, por ejemplo, en la salsa de pescado (20-25% de NaCl) (Vannabun et al. 2014). Así, los resultados aquí obtenidos demuestran que ET tendría más potencial que EP para ser utilizado en estos procesos.

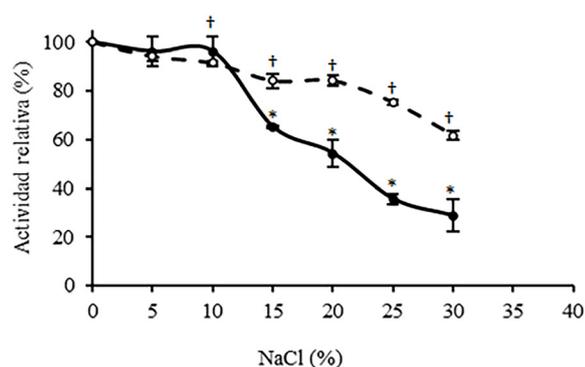


Figura 2. Efectos del NaCl en la actividad proteolítica de los extractos con actividad pepsina - EP- (●) y tripsina -ET- (○) de pacú (*Piaractus mesopotamicus*) luego de ser incubados durante 2 h en las condiciones seleccionadas utilizando hemoglobina ácida y BApNA como sustratos, respectivamente. Los resultados se presentan como la media \pm SD (n = 3, * p<0,05; EP, †p<0,05; ET).

Efecto de iones e inhibidores. En general, la presencia de los cationes divalentes Ca^{+2} y Mg^{+2} incrementa la capacidad proteolítica de las proteasas digestivas, tanto alcalinas como ácidas (Zhao et al. 2011, Bougategf 2013, Lassoued et al. 2015, Younes et al. 2015). No obstante, en

el presente trabajo se observó una disminución significativa en la actividad de EP y ET (aproximadamente 10%), luego de ser pre-incubadas por 30 min con 5 mM de Ca^{+2} y Mg^{+2} (Tabla 1). Un efecto similar se ha reportado para el extracto con actividad pepsina del pez cojinúa amarilla que redujo el 16 y 18% de su capacidad proteolítica al ser incubado con 10 mM Ca^{+2} y Mg^{+2} , respectivamente (Silva et al. 2022b). Si bien el mecanismo por el cual la actividad de las proteasas digestivas disminuye en presencia de algunos iones metálicos no se ha dilucidado completamente, se estima que influyen en la interacción de la enzima con el sustrato en el sitio activo (Silva et al. 2022a).

Los extractos de vísceras de peces pueden contener una gran diversidad de proteasas por lo que el uso de inhibidores específicos sobre estos proporciona datos valiosos sobre la naturaleza de las enzimas que se encuentran actuando en ellos.

La pepstatina A es un pentapéptido que inhibe específicamente las proteinasas aspárticas al unirse de forma no covalente con la hendidura del sitio activo de estas enzimas, bloqueando la accesibilidad del sustrato a esta región (Nalinanon et al. 2010). Este inhibidor no tuvo efecto en la actividad proteolítica del ET, en cambio prácticamente inhibió la actividad del EP (1,02% de actividad residual), Tabla 1. Este resultado confirma la presencia de proteasas ácidas tipo pepsina en el EP de pacú y es coincidente con lo reportado para extractos gástricos ácidos de diferentes especies de peces, así como para las pepsinas aisladas de esta fuente (Nalinanon et al. 2010, Candiottto et al. 2017, Acevedo Gomez et al. 2018, Kuepethkaew et al. 2022, Silva et al. 2022b).

El SBTI y el PMSF son inhibidores específicos de tripsinas y serino proteasas, respectivamente. Luego de incubar los extractos enzimáticos con estas moléculas se observó un efecto marcado en la disminución de la actividad del ET, no así en la del EP (Tabla 1). En efecto, la actividad proteolítica del ET fue inhibida completamente por SBTI y disminuyó aproximadamente un 34% en presencia del PMSF. Estos resultados confirman la presencia de proteasas alcalinas tipo tripsina en el ET de pacú. Lassoued et al. (2015) y Nasri et al. (2015) reportaron inhibiciones similares para los extractos alcalinos de raya espinosa, y el serrano (*Serranus scriba*). En consonancia, las tripsinas purificadas de los peces dorado común (*Coryphaena hippurus*) y lisa común (*Mugil spp*) mostraron inhibiciones cercanas al 100% al ser expuestas a SBTI y PMSF (Pavlisko et al. 1999, Cardoso et al. 2020).

El EDTA es un agente quelante de iones metálicos, por lo que se lo emplea como inhibidor de metaloproteasas. En este trabajo, la actividad del EP se vio reducida parcialmente por este inhibidor, en cambio, su efecto sobre EP generó una reducción del 50% de su capacidad proteolítica (Tabla 1).

Resultados similares fueron publicados por Chong et al. (2002) quienes caracterizaron los extractos de proteasas alcalinas y ácidas del pez disco y encontraron que en presencia de EDTA su actividad proteolítica se inhibía aproximadamente un 50% y 5%, respectivamente. En consonancia, los extractos alcalinos de proteasas de los peces

El SDS (dodecilsulfato de sodio) es un surfactante iónico ampliamente utilizado para la producción de agentes

limpiadores y en múltiples aplicaciones biotecnológicas. En este trabajo se determinó la influencia del SDS a 0,05-0,10% (P/V) en la actividad enzimática de los extractos de pacú (Tabla 1).

EP disminuyó un 6% su actividad enzimática luego de ser incubado con SDS 0,005% y fue completamente inhibido con SDS 0,1% (P/V). Resultados similares fueron reportados para extractos gástricos de atún de diferentes especies con SDS 0,1%, (Nalinanon et al. 2008). La reducción de la actividad de las enzimas en presencia del SDS podría deberse a la alteración de sus estructuras debido a la interacción con este surfactante.

Por otra parte, el SDS en las concentraciones ensayadas ocasionó una disminución máxima de un 5% de la actividad enzimática inicial del ET. Estos resultados concuerdan con los reportados para diversos extractos alcalinos con actividad tripsina de peces que han demostrado una resistencia similar a la presencia de este detergente iónico. En efecto, los extractos con actividad tripsina de los peces escorpión rojo y atún blanco mantuvieron el 73 y 99% de su actividad inicial luego de ser pre-incubados con SDS 0,1% (Younes et al. 2015, Poonsin et al. 2019).

La estabilidad que muestran las proteasas alcalinas recuperadas de los desechos de pescado frente a agentes tensioactivos es lo que las convierte en potenciales aditivos para detergentes comerciales. En este sentido la economía en la producción/obtención de estas enzimas, asociadas al procesamiento y reutilización de los residuos de procesamiento de pescado, haría que estos productos sean de bajo costo para la industria (Bougatf 2013).

Potenciales aplicaciones industriales

Recuperación de placas radiográficas. El *stripping* enzimático emplea proteasas para reciclar placas radiográficas usadas mediante la hidrólisis de la capa de gelatina que las recubre, recuperando así las placas de polietilenglicol (PET) y la plata en solución (Nakiboğlu et al. 2001). En este estudio, se evaluó la capacidad de los extractos de los ciegos pilóricos de pacú preparados con agua potable (ET_{aq}-M1), solución fisiológica (ET_{fis}-M2) y buffer Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 7,8 (ET-M3) para hidrolizar el recubrimiento de placas radiográficas desechadas. Todos los extractos fueron capaces de degradar la capa de gelatina, siendo más eficiente el preparado con agua potable (Figura 3 A). El ET_{aq} logró remover completamente la capa de gelatina en 10 min, mientras que ET_{fis} y ET requirieron 3 y 10 veces más de tiempo para lograrlo (29 min y 104 min, respectivamente). Se constató también, que los medios en los que se prepararon los extractos no fueron capaces *per se* de remover la capa de gelatina que recubre las placas de PET (Figura 3 B).

Son escasos los estudios reportados de *stripping* enzimático para el reciclado de placas radiográficas con proteasas alcalinas de peces. Geethanjali (2016) reportó el uso del extracto de proteasas alcalinas del pez rhou (*Labeo rohita*) a pH 8 y 40°C para recuperar placas de 2 x 2 cm, sin embargo, sin reportar el tiempo requerido para la hidrólisis completa.

Estos resultados son alentadores para el desarrollo de biorrefinerías combinadas de residuos, empleando procesos simples y de bajo costo.

Tabla 1. Efecto de iones e inhibidores en la actividad proteolítica de los extractos con actividad pepsina (EP) y tripsina (ET) de pacú (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando hemoglobina ácida y BApNA como sustratos, respectivamente.

Iones Inhibidores ²	Concentración	Actividad relativa (%) ¹	
		Extracto con actividad pepsina	Extracto con actividad tripsina
Control		100	100
<i>Iones</i>			
Ca ⁺²	1 mM	92,58 ± 1,68	96,8 ± 5,92
	5 mM	92,91 ± 3,55	95,9 ± 5,48
Mg ⁺²	1 mM	90,77 ± 6,09	86,4 ± 1,77
	5 mM	88,21 ± 5,01	91,4 ± 3,53
<i>Inhibidores</i>			
Pepstatina A	10 µM	1,02 ± 0,10	100 ± 0,35
PMSF	1 mM	100 ± 5,90	66,1 ± 4,99
SBTI	0,05 Mm	100,89 ± 1,96	ND
EDTA	2 mM	93,92 ± 5,56	50,2 ± 3,77
SDS	0,10% (P/V)	ND	95,0 ± 2,97
	0,005% (P/V)	93,67 ± 0,47	97,6 ± 1,77

¹ Los resultados se presentan como la media ± SD (n = 3).

² PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo. SBTI: inhibidor de la tripsina de soja. EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético. SDS: dodecilsulfato de sodio ND: no detectable.

Hidrólisis de inmunoglobulinas. La pepsina porcina es utilizada a escala industrial para la obtención de productos terapéuticos basados en anticuerpos dada su capacidad de escindir las inmunoglobulinas tipo G (IgG) generando

fragmentos F(ab')₂ que retienen la capacidad de reconocimiento del antígeno (Kittipongwarakarn et al. 2011) pepsin was highly effective at digesting all unwanted serum components to low molecular weight (≤13 kDa).

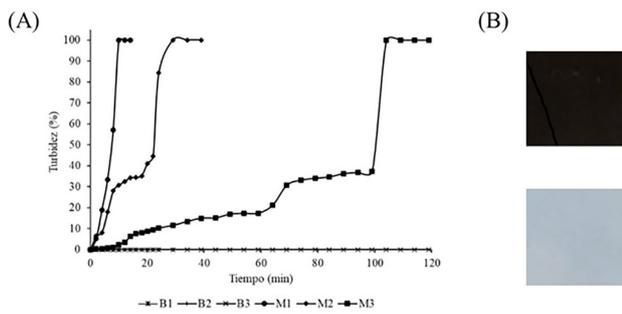


Figura 3. Remoción de la película de gelatina que recubre las placas rayos X por el extracto con actividad tripsina (ET) preparado con diferentes medios. A) Cinética de la hidrólisis de la capa de gelatina seguida de medidas de turbidez a 620 nm. Siendo M1 (●): extracto con actividad tripsina preparado con agua potable -ET_{aq}-; M2(◆): extracto con actividad tripsina preparado con solución fisiológica -ET_{fis}-; M3 (■): extracto con actividad tripsina preparado con Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 7,8; B1 (×): blanco de ensayo de agua; B2 (l): blanco de ensayo de solución fisiológica - NaCl 0,9 % (P/V) -; B3 (x): potable blanco de ensayo de Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 7,8. B) Placas de rayos X antes y después del tratamiento de hidrólisis enzimática.

Hasta el momento no existen estudios que hayan reportado el uso de extractos gástricos de peces con actividad pepsina o de pepsinas aisladas de estos organismos para este fin. En este estudio, se puede constatar mediante SDS-PAGE la capacidad del EP para obtener estos fragmentos a partir de un pool de IgG equinas (Figura 4).

En la electroforesis (línea 1) se muestra que, en el control negativo (pool de IgG incubado por 24 h con PBS) no se produjeron cambios observándose la banda correspondiente a la IgG (150 KDa). Por el contrario, en el control positivo (línea 2), constituido por IgG incubada por 24 h con pepsina porcina, se puede observar un patrón de bandas que indican que la enzima clivó las IgG produciendo un fragmento F(ab')₂ estable de 100 kDa y fragmentos con pesos moleculares inferiores a 50 kDa. Esto es coincidente con lo reportado por Moraes y Massaldi (2005) al digerir IgG purificada de suero equino con pepsina porcina (1 g L⁻¹ - 600 U mg⁻¹) a pH 3 y 37°C por 24 h.

Respecto a la capacidad de EP para la generación de fragmentos F(ab')₂, se determinó su eficacia a distintos períodos de incubación. En la electroforesis (líneas 3 a 6) se observa, para los distintos tiempos, la disminución en la intensidad de la banda correspondiente a la IgG (150 KDa), la aparición de bandas compatibles con F(ab')₂ (100 kDa) y con fragmentos de tamaño variable provenientes de la región Fc (≤ 50 kDa). Luego de 3h de reacción las IgG se degradan completamente y la intensidad de las bandas compatibles con los fragmentos F(ab')₂ es máxima. A mayores periodos de incubación la intensidad de los fragmentos F(ab')₂ disminuye, como consecuencia de la acción proteolítica del EP que genera un aumento en la intensidad de las bandas de menor peso molecular. De acuerdo a los perfiles electroforéticos, el óptimo para la obtención de los fragmentos F(ab')₂ en las condiciones ensayadas es 3 h.

Si bien el clivado con pepsina se debe optimizar para cada tipo de anticuerpo, estos resultados preliminares son alentadores para una nueva aplicación de estas enzimas de peces.

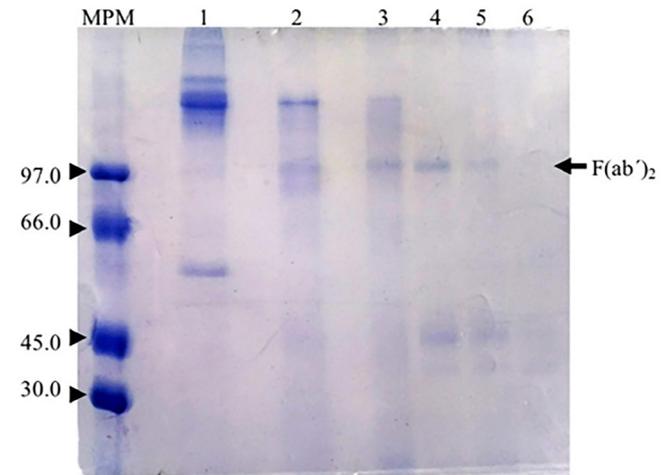


Figura 4. Digestión de inmunoglobulinas G (IgG) por acción del extracto con actividad pepsina (EP) de pacú (*Piaractus mesopotamicus*) evaluado por SDS-PAGE en condiciones no reductoras (gel separador 10%). Siendo MPM: marcadores de peso molecular; línea 1: control negativo de IgG incubado con PBS 24 h; línea 2: control positivo de IgG degradado con pepsina porcina (0,5 mg ml⁻¹ - Sigma-Aldrich) 24 h a pH 2; línea 3: IgG incubadas con EP durante 1 h a pH 2; línea 4: IgG incubadas con EP durante 3 h a pH 2; línea 5: IgG incubadas con EP durante 12 h a pH 2; línea 6: IgG incubadas con ET durante 24 h a pH 2.

CONCLUSIONES

En conclusión, este estudio muestra que los desechos viscerales del pacú contienen proteasas ácidas y alcalinas con actividad enzimática que los vuelve aptos para un potencial uso industrial. Su aprovechamiento para obtener productos con alto valor agregado podría representar un doble beneficio, económico y ambiental, contribuyendo a resolver los problemas de polución resultantes de su inadecuada disposición final. Se constató que los extractos EP y ET contienen enzimas del tipo pepsina y tripsina, respectivamente. Estos poseen potencial aplicación en procesos en los que se desea la máxima actividad a temperatura moderada y baja concentración de NaCl, la recuperación de plata metálica y celuloide de placas radiográficas reveladas y la obtención de productos terapéuticos. Estos resultados abren nuevas perspectivas para la economía circular de las explotaciones acuícolas del pacú.

Agradecimientos. Este trabajo fue apoyado por la ‘Secretaría General de Ciencia y Técnica’, Universidad Nacional del Nordeste (F013-2019. Res. 1015/19 CS; PICTO-UNNE 2019-00011. RESOL-2020-45-APN-DANPIDTYI#ANPIDTYI) y la Secretaría de Políticas Universitarias a Proyectos de Vinculación Tecnológica (RESOL-2018-109-APN-SECPU#MECCYT), Argentina. Los autores agradecen a la empresa Puerto Las Palmas S.A. (PLP GROUP, Chaco, Arg.) a por brindar de forma desinteresada las muestras de pacú (Pacú Teko ®.) Antonella

Acevedo Gomez y Gabriela Gomez han recibido becas de posgrado de CONICET-UNNE y Daiana Medina ha recibido beca una posgrado de CONICET, Argentina.

ORCID

Acevedo Gomez, A.V.  <https://orcid.org/0000-0001-8970-4730>

Gomez, G.N.  <https://orcid.org/0000-0001-8918-8174>

Medina, D.M.  <https://orcid.org/0009-0000-8180-2272>

Bustillo, S.  <https://orcid.org/0000-0002-1875-7664>

Leiva, L.N.  <https://orcid.org/0000-0002-3468-6499>

REFERENCIAS

1. Acevedo Gomez AV, Gomez G, Chamorro E, Bustillo S, Leiva LC. Digestive aspartic proteases from sábalo (*Prochilodus lineatus*): Characterization and application for collagen extraction. *Food Chem.* 2018; 269: 610-617.
2. Acevedo Gomez AV. Caracterización de pepsina de sábalo (*Prochilodus lineatus*). Evaluación de su potencial aplicación industrial. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina. 2019a. p. 40-41.
3. Acevedo Gomez AV, Gómez G, Leiva L, Bustillo S, Nerli B. Estudio de la influencia del pH en la actividad y estabilidad de un extracto gástrico con actividad pepsina de surubí. XXV Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas UNNE, Resistencia, Argentina. 2019b.
4. Acevedo Gomez AV, Bustillo S, Nerli BB. Recovery of acid proteases from fishery discards with aqueous micellar two-phase systems and their use for X-ray film recycling. *Process Biochem.* 2022; 122: 194-204.
5. Ágeirsson B, Fox JW, Bjarnason JB. Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. *Eur J Biochem.* 1989; 180(1): 85-94.
6. Baldissarotto B, Cyrino JEP, Urbinati EC. Biología e fisiología de peixes neotropicais de água doce. Jaboticabal: FUNEP; UNESP; c2014. p.243., Scope and Relevance. New York: Nova Science Publishers; c2014. p. 173-196.
7. Bougatef A. Trypsins from fish processing waste: Characteristics and biotechnological applications - Comprehensive review. *J Cleaner Prod.* 2013; 57: 257-265.
8. Bougatef A, Balti R, Zaied SB, Souissi N, Nasri M. Pepsinogen and pepsin from the stomach of smooth hound (*Mustelus mustelus*): Purification, characterization and amino acid terminal sequences. *Food Chem.* 2008; 107(2): 777-784.
9. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72(1-2): 248-254.
10. Candiottto FB, Freitas-Júnior ACV, Neri RCA, Bezerra RS, Rodrigues RV, Sampaio LA, Tesser MB, Candiottto FB, Freitas-Júnior ACV, Neri RCA, Bezerra RS, Rodrigues RV, Sampaio LA, Tesser MB. Characterization of digestive enzymes from captive Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Braz J. Biol.* 2017; 78: 281-288.
11. Cardoso R, Souza CBD, Sarmiento F, Albuquerque D, Juarez H, Pereira V. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Trypsin purified from *Coryphaena hippurus* (*Common dolphinfish*): Purification, characterization, and application in commercial detergents. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2020; 25: 101584.
12. Chong AS, Hashim R, Chow-Yang L, Ali AB. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquacul.* 2002; 203(3-4): 321-333.
13. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. 2022. Disponible en: <https://doi.org/10.4060/cc0461en>. Último acceso #####2023
14. Friedman IS, Contreras EM. Digestive proteinases from the marine fish processing wastes of the South-West Atlantic Ocean: Their partial characterization and comparison. *J. Fish Biol.* 2021; 100: 150-160.
15. Fuchise T, Sekizaki H, Kishimura H, Klomklao S, Nalinanon S, Benjakul S, Chun BS. Simple preparation of pacific cod trypsin for enzymatic peptide synthesis. *Journal of amino acids.* 2011; 2011: 8.
16. Geethanjali S. Fish visceral protease – an alternative source for recovery of silver from waste X ray photographic films. *Asian J. Anim. Sci.* 2016; 11:159-162.
17. Jesús-Ramirez F, Álvarez-González CA, Nolasco-Soria HG, Pena E, Martínez-García R, Camarillo-Coop S, Pohlenz C. Partial characterization of digestive proteases of fat snook (*Centropomus paralellus*). *Hydrobiologica.* 2017; 27(3): 419-427.
18. Khaled HB, Ghorbel-Bellaaj O, Hmidet N, Jellouli K, Ali NEH, Ghorbel S, Nasri M. A novel aspartic protease from the viscera of Sardinelle (*Sardinella aurita*): Purification and characterisation. *Food Chem.* 2011; 128(4): 847-853.
19. Kittipongwarakarn S, Hawe A, Tantipolphan R, Lim-suwun K, Khomvilai S, Puttipipatkachorn S, Jiskoot W. New method to produce equine antirabies immunoglobulin F(ab')₂ fragments from crude plasma in high quality and yield. *European. J Pharm.* 2011; 78(2): 189-195.
20. Klomklao S, Kishimura H, Benjakul S. Endogenous proteinases in true sardine (*Sardinops melanostictus*). *Food Chem.* 2008; 107(1): 213-220.
21. Kuepethkaew S, Zhang Y, Kishimura H, Kumagai Y, Simpson BK, Benjakul S, Damodaran S, Klomklao S. Enzymological characteristics of pepsinogens and pepsins purified from lizardfish (*Saurida micropectoralis*) stomach. *Food Chem.* 2022; 366: 130532.
22. Laemmli RU, Beguin F, Gujer-Kellenberger G. Un factor que previene la agregación aleatoria de la principal proteína de la cabeza del bacteriófago T4. *J Mol Biol.* 1970; 47 (1): 69-85.

23. Lassoued I, Hajji S, Mhamdi S, Jridi M, Bayouhd A, Barkia A, Nasri M. Digestive alkaline proteases from thornback ray (*Raja clavata*): characteristics and applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015; 80: 668-675.
24. Mohanty B, Majumdar RK, Mohanty U, Mehta NK. Partial Purification and Characterization of Proteases from the Visceral Waste of Indian Major Carp, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *Int. J. Curr. Microbiology and Applied Sciences.* 2020; 9(2): 1326-1342.
25. Montenegro LF, Cunzolo S, Preussler CA, Hennig HH, Descalzo AM, Pérez CD. Effects of stocking density on productive performance, economic profit and muscle chemical composition of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) cultured in floating cages. *Aquacult Res.* 2022; 53(9): 3379-3391.
26. Morais V, Massaldi H. Effect of pepsin digestion on the antivenom activity of equine immunoglobulins. *Toxicon.* 2005; 46(8): 876-882.
27. Nakiboğlu N, Toscali D, Yaşa İ. Silver recovery from waste photographic films by using enzymatic method. *Turk J Chem.* 2001; 25(3): 349-353.
28. Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H. Biochemical properties of pepsinogen and pepsin from the stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Food Chem.* 2010; 121(1): 49-55.
29. Nalinanon S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H. Tuna pepsin: Characteristics and its use for collagen extraction from the skin of threadfin bream (*Nemipterus spp.*). *J. Food Sci.* 2008; 73(5): 413-419.
30. Nasri R, Abed H, Karra-châabouni M, Nasri M, Bougatef A. Digestive alkaline proteinases from *Serranus scriba* viscera: Characteristics, application in the extraction of carotenoproteins from shrimp waste, and evaluation in laundry commercial detergents. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2015; 4(3): 355-361.
31. Pavlisko A, Rial A, Coppes Z. Purification and characterization of a protease from the pyloric caeca of menhaden (*Brevoortiu spp*) and mullet (*Mugil spp*) from the southwest atlantic region. *J Food Biochem.* 1999; 23(2): 225-241.
32. Poonsin T, Simpson BK, Benjakul S, Visessanguan W, Yoshida A, Osatomi K, Klomklao S. Anionic trypsin from the spleen of albacore tuna (*Thunnus alalunga*): Purification, biochemical properties and its application for proteolytic degradation of fish muscle. *Int J Biol Macromol.* 2019; 133: 971-979.
33. Korkmaz K, Tokur B. Optimization of hydrolysis conditions for the production of protein hydrolysates from fish wastes using response surface methodology. *Food Biosci.* 2022; 45, 101312
34. Silva JAF, Silva MKS, Silva TA, Costa LDA, Leal MLE, Bezerra RS, Costa HMS, Freitas-Júnior ACV. Obtainment and characterization of digestive aspartic proteases from the fish *Caranx hippos* (Linnaeus, 1766). *Braz. J. Biol.* 2022 a; 82: 1-7.
35. Silva MKS, Silva TA, Silva JAF, Costa LDA, Leal MLE, Bezerra RS, Costa HMS, Freitas-Júnior ACV. *Carangoides bartholomaei* (Cuvier, 1833) stomach: A source of aspartic proteases for industrial and biotechnological applications. *Braz. J. Biol.* 2022 b; 82: 1-8.
36. Torrisen KR, Male R, Trypsin Isozymes: Development, Digestion, and Structure. In: Haard NF, Simpson BK, editors. *Seafood enzymes: utilization and influence on postharvest seafood quality.* New York: Marcel Dekker Inc., c2000. p.215.
37. Vannabun A, Ketnawa S, Phongthai S, Benjakul S, Rawdkuen S. Characterization of acid and alkaline proteases from viscera of farmed giant catfish. *Food Biosci.* 2014; 6: 9-16.
38. Wang WJ, Huang TF. Purification and characterization of a novel metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Thrombosis and haemostasis.* 2002; 87(04): 641-650.
39. Younes I, Nasri R, Bkhairia I, Jellouli K, Nasri M. New proteases extracted from red scorpionfish (*Scorpaena scrofa*) viscera: Characterization and application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. *Food Bioprod. Process.* 2015; 94: 453-462.
40. Zhao L, Budge MS, Ghaly EA, Brooks SM. Extraction, Purification and Characterization of Fish Pepsin: A Critical Review. *J. Food Process Technol.* 2011; 02(06): 1-14.