CENAIM INFORMA

Boletín Informativo No 157 Agosto 15 del 2009

María Sotomayor, M. Sc.

Evaluación de productos extracelulares(ECPs) de cepas prebióticas y su participación en la digestibilidad en Penaeus vanamei

Introducción

Incrementos en peso de camarones cultivados en sistemas expuestos a probióticos han sido reportados para diferentes especies de *Penaeus*, sin determinarse los mecanismos mediante el cual los probióticos contribuyen a estos resultados. Este estudio, tuvo dos objetivos: 1) cuantificar la actividad de las enzimas amilasa y tripsina en el hepatopáncreas de camarones alimentados con probióticos de. CENAIM y 2) determinar los productos extracelulares (ECPs) de algunas cepas bacterianas capaces de estimular las enzimas amilasa y tripsina. Se realizó además una comparación SDS PAGE de los ECPs a fin de observar diferencias y similitudes en expresión de proteínas entre cepas.

Metodología

Perfil de proteínas por SDS PAGE

Los ECPs de las cepas *V. alginolyticus, V. hepatarius (P.62)*, P. 64, Inv 116, Inv 165, P.63, L9, L3, L1, y L14, cultivadas por 3 días en medios líquidos, fueron purificados por centrifugación y filtración. Se observó el perfil proteico de los ECPs por SDS-PAGE (Sodium Dodécyl Sulfate Poly Acrilamida Gel), previa cuantificación de proteínas totales mediante la técnica de Bradford. Los ECPs se conservaron a -80°C. El perfil proteico de las cepas fue analizado mediante el programa Gene Profiler, utilizándose como marcador de proteína Mark 12 (Invitrogen).

Ensayo 1.

Camarones de *P. vannamei* fueron alimentados con ECPs por un mes a una concentración de 300 ug de proteína/g de alimento, dos veces por día. Posterior a la exposición se realizó la extracción enzimática de los hepatopáncreas que fueron conservados en congelación de forma individual. Posteriormente se realizó la cuantificación de amilasa y tripsina comparándose con un control sin ECPs.

Ensayo 2.

Camarones fueron alimentados con probióticos completos (bacterias vivas y sus ECPs), la concentración de bacterias fue de 1E+05 bacterias/g de alimento, durante tres meses en piscinas de 400 m^2. Posteriormente se cuantificó la actividad de amilasa y tripsina, comparándose con un control sin probiótico. Para ello, se tomaron 4 muestras por piscina/tratamiento, donde cada tratamiento tuvo 4 réplicas. La extracción enzimática se realizó en las mismas condiciones del ensayo 1. Los tratamientos consistieron de la aplicación de las cepas bacterianas L14, L1, P62-P64, Inv 165-116 fresco y liofilizado.

Resultados

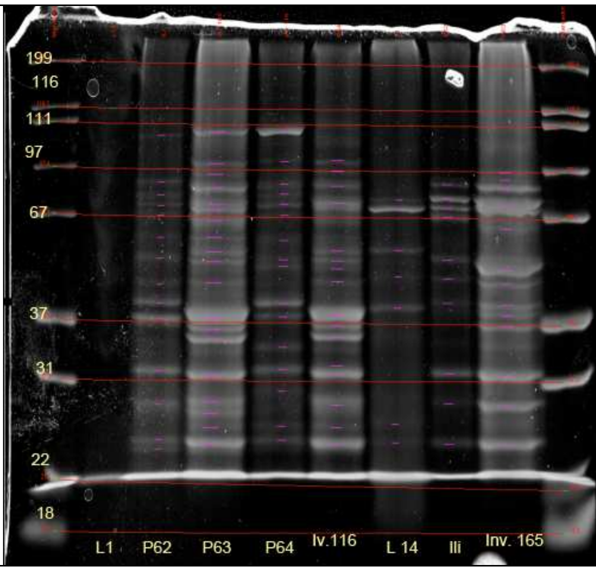
SDS- Page. El perfil proteico de las cepas se presenta en la foto 1. Se observó bandas similares en cepas Gram positivas y negativas (25, 32, 45, 46, 52, y 55 Kda), y otras que se presentaron sólo para las Gram positivas (109, 100 y 35 Kda).

Actividad amilasa en ECPs. Se encontró diferencias significativas respecto al control en el tratamiento de ECPs de la cepa P62 *V. hepatarius* a nivel de amilasa (figura 1). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en tripsina.

Todos los tratamientos alimentados con probióticos completos (paredes y ECPs), estimularon la actividad enzimática de ambas enzimas en el hepatopáncreas. Dónde la cepa L1 presentó mayor estimulación y diferencias significativas entre los otros probióticos y control (figuras 2 y 3).

Fundación CENAIM – ESPOL-Teléfonos:593-4-2269494.Fax:593-4-2269492.ssonnen@cenaim.espol.edu.ec.www.cenaim.espol.edu.ec

Foto 1. Foto 1. Perfil proteico de los ECPs de las cepas probióticas CENAIM –SDS PAGE 10%



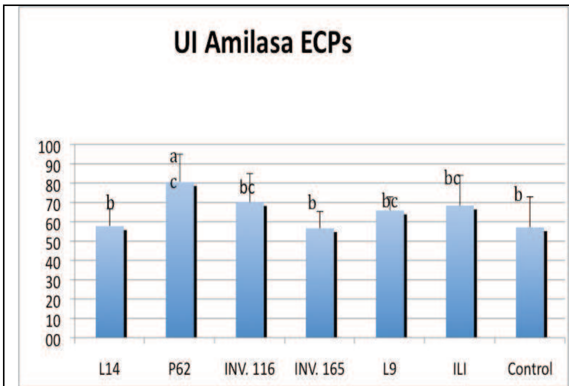


Figura 1. UI amilasa/gramo de hepatopáncreas expresada en camarones alimentados con ECPs por 30 días.

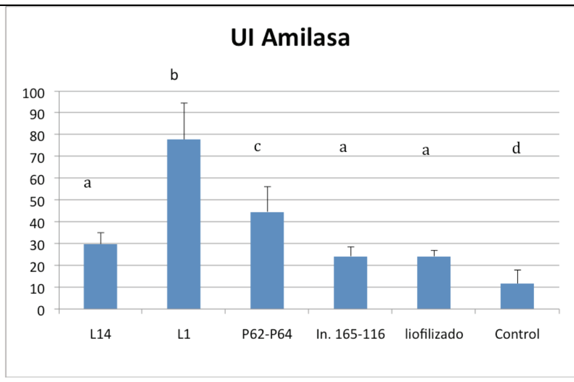


Figura 2. Unidades internacionales de Amilasa / gramo de hepatopáncreas de animales alimentados con productos probióticos.

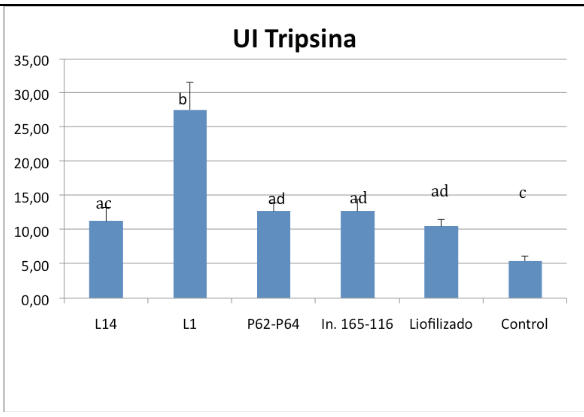


Figura 3. UI tripsina/gramo de hepatopáncreas de animales alimentados con productos probióticos. Donde la cepa L1 presentó mayor estimulación.

María Sotomayor, M. Sc.

Conclusiones y Recomendaciones.

Los productos extracelulares de la cepa P62 (*Vibrio hepatarius*) contribuyen en la estimulación de la actividad amilasa en hepatopáncreas. Mientras que todos los probióticos “bacterianas completas y sus productos ECPs” P62-P64, Inv. 116-165, L1, L14 mostraron estimulación significativa a ambas enzimas respecto al control, lo que podría sería indicativo de que las cepas bacterianas participan en el desdoblamiento de los alimentos, y posiblemente con la participación de sus propias enzimas.

La cepa L1 (bacteria y ECPs) presentó una fuerte estimulación en ambas enzimas. Aunque no se realizó el análisis enzimático de sus ECPs, debe considerarse la identificación de sus bandas proteicas marcadas (71, 48, 40 Kda). Su alta capacidad de estimulación a amilasa y tripsina en comparación a los otros tratamientos debe ser estudiado con mayor profundidad.

Se recomienda determinar cuales de las bandas proteicas (88, 79, 72, 67, 32, 29, y 25 Kda) dentro del perfil de la cepa P62 estimula la actividad de amilasa en los animales. Datos no mostrados, indican que el perfil de proteínas en SDS PAGE para P62 es próximo a ILI y P63 (cepas *Vibrios*), aunque varían en expresión de concentración.

Por presentar buenos resultados en campo el tratamiento Inv. 116-165, la identificación de las bandas predominantes de ambas cepas (109 y 73 Kda) respectivamente, debe ser investigado. Bandas no presentes entre las cepas *Vibrios*, posiblemente estimulan otras enzimas no cuantificadas en este estudio.

Fundación CENAIM – ESPOL-Teléfonos:593-4-2269494.Fax:593-4-2269492.ssonnen@cenaim.espol.edu.ec.www.cenaim.espol.edu.ec