



**CENTRO DE INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS DEL NOROESTE**

Programa de Estudios de Posgrado

“Lipasas digestivas de camarón blanco *Penaeus vannamei*”

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

Presenta

Crisalejandra Rivera Pérez.

La Paz B.C.S. Agosto, 2007

Resumen

El ciclo de muda en los crustáceos involucra una serie de estadios con diferentes comportamientos alimenticios incluyendo el ayuno y de esta manera, el uso de diferentes fuentes de energía. La habilidad de un organismo para sobrevivir y recuperarse de largos periodos de ayuno es vital, por ello es necesario el uso de reservas energéticas, tales como los lípidos. El principal órgano de almacenamiento de lípidos en crustáceos es la glándula digestiva. Durante la alimentación y el ayuno, los crustáceos pueden usar estos lípidos como reserva de energía, esto involucra la hidrólisis de triacilglicéridos para liberar ácidos grasos por medio de lipasas. Las lipasas son fisiológicamente importantes porque hidrolizan grasas a ácidos grasos libres que se absorben a través de la membrana celular, y transforman los triacilglicéridos a moléculas más polares.

En este trabajo, se investigó el efecto del ayuno en la actividad de lipasa digestiva del camarón patiblanco *Penaeus vannamei*. Los organismos ayunados fueron muestreados periódicamente por 120 h y comparados con un grupo alimentado. Se evaluó la composición de proteína de los extractos de la glándula digestiva de *P. vannamei* por el método de Bradford y la actividad de lipasas usando β -naftilcaprilato como sustrato y medido espectrofotométricamente. La liberación de ácidos grasos de la emulsión de tributirina fue medido por titulación en un pH-stat a pH 8. La masa molecular de esta enzima fue determinado por electroforesis, SDS-PAGE. Los resultados sugieren que *P. vannamei* esta bien adaptado a largos periodos de ayuno y es capaz de almacenar energía como grasas cuando el alimento esta disponible y posteriormente un claro proceso secuencial de movilización de reservas energéticas cuando hay ayuno.

Abstract

Molting in crustaceans involves a series of stages with different feeding behavior and therefore, energy from food available. The ability of an organism to survive and recover from long periods of starvation is vital. The main lipid storage organ in crustaceans is midgut gland, during fasting and starvation, crustacean must use their energy reserves to meet their need. This involves the hydrolysis of triglycerides to free fatty acids by lipases. Lipases are physiologically important because they digest fats into fatty acids for absorption across a cell membrane, and transform triglycerides into more polar molecules.

In this work we investigated the effect of starvation as a stimulant of the digestive system on digestive lipase activity in the white-leg *Penaeus vannamei*. The starved organisms were sampled periodically for 120 hours and compared with a continuously fed group. Midgut gland extracts from *P. vannamei* were evaluated for protein profile by Bradford method and lipase activity using β -naphthylcaprylate as substrate and measured by spectrophotometry. The liberation of fatty acids from tributyrin emulsion was measured by titrating in pH-stat at pH 8. The molecular mass of this enzyme was determined by SDS-PAGE electrophoresis. The results of this study suggest that *P. vannamei* is well adapted to cope with extended periods of food deprivation, storing energy as fats when food is readily available and having a clearly sequential process for mobilizing energy when food is scarce.

INDICE

LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABLAS	6
I. INTRODUCCIÓN.....	7
II. ANTECEDENTES.....	11
2.1 Características biológicas.....	11
2.2 Desarrollo del camarón.....	11
2.3 El sistema digestivo de los decápodos.....	13
2.4 Función de la glándula digestiva.....	14
2.5 Enzimas digestivas.....	14
2.5.1 Lipasas.....	16
2.5.1.1 Diferencias entre lipasas verdaderas y carboxilesterasas.....	17
2.5.1.2 Propiedades catalíticas de las lipasas.....	18
2.5.1.3 Estructura y mecanismo de catálisis de lipasas.....	20
2.5.1.4 El sitio activo de las lipasas.....	22
2.5.1.5 Mecanismo de catálisis de las lipasas.....	23
2.5.1.6 Activación interfacial.....	25
2.5.1.7 Lipasas en invertebrados.....	27
2.5.1.8 Métodos para la determinación de lipasas.....	29
2.6 Requerimientos de lípidos en crustáceos.....	33
2.7 Utilización de lípidos durante el ayuno.....	35
2.8 Potencial de las lipasas en Biotecnología.....	37
III. HIPÓTESIS.....	40
IV. OBJETIVOS.....	40
4.1 Objetivo General.....	40
4.2 Objetivos Específicos.....	40
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
5.1 Muestras biológicas y aclimatación.....	41
5.2 Experimentación ayuno-muda.....	41
5.3 Evaluación de la actividad enzimática.....	42
5.3.1 Actividad de lipasa.....	42
5.3.2 Electroforesis.....	44
5.3.3 Identificación de lipasas verdaderas.....	45
5.4 Análisis estadístico.....	45
VI. RESULTADOS.....	46
6.1 Efecto del ayuno sobre el índice hepatosomático.....	46
6.2 Efecto del ayuno sobre el contenido de proteína de la glándula digestiva de camarón blanco.....	47
6.3 Efecto del ayuno y realimentación sobre la actividad de lipasa.....	48
6.4 Lipasa verdadera en glándula digestiva de camarón.....	49
6.5 Perfil de proteína por SDS-PAGE.....	50
6.6 Zimogramas de lipasas.....	53
VII. DISCUSION.....	54
VIII. CONCLUSIONES.....	63

IX. REFERENCIAS.....	64
----------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Hidrólisis de triacilglicéridos.....	17
Fig. 2 Representación esquemática de la estructura canónica de una a/b hidrolasa	21
Fig. 3 Mecanismo de catálisis de lipasas.....	23
Fig. 4 Actividad enzimática de carboxilesterasas y lipasas verdaderas.....	25
Fig. 5 Representación molecular de la lipasa gástrica.....	27
Fig. 6 Cambios en el índice hepatosomático durante condiciones de ayuno en <i>P. vannamei</i>	47
Fig. 7 Contenido de proteína soluble de homogenados de glándula digestiva de <i>P. vannamei</i> a diferentes tiempos de muestreo.....	48
Fig. 8 Actividad de lipasa de homogenados de glándula digestiva de <i>P. vannamei</i> empleando β -naftilcaprilato como sustrato.....	49
Fig. 9 Actividad de lipasa de homogenados de glándula digestiva de <i>P. vannamei</i> a diferentes tiempos de muestreo empleando tributirina como sustrato.....	50
Fig. 10 Efecto del ayuno en la composición de proteína por medio de SDS-PAGE.....	51
Fig. 11 Zimograma (SDS-PAGE, 12%) de extractos de glándula digestiva de <i>P. vannamei</i> , 10 mU de actividad fueron corridos por muestra.....	52
Fig. 12 Zimograma (SDS-PAGE, 12%) de extractos de glándula digestiva de <i>P. vannamei</i>	53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias entre lipasas y estererasas.....	18
Tabla 2. Reacciones catalizadas por lipasas.....	19
Tabla 3. Ensayos para la determinación de actividad de lipasas.....	31
Tabla 4. Efecto del ayuno sobre la masa corporal y la glándula digestiva de <i>P. vannamei</i>	46

I. INTRODUCCIÓN

Las actividades acuícolas desde hace varios decenios, han estado enfocadas al cultivo de especies de elevado interés productivo o de precio alto en el mercado, como el ostión y camarón. La producción de camarón a nivel mundial supera el millón de toneladas. En los últimos diez años, esta actividad ha tenido un gran crecimiento en México, teniendo una producción de un poco más de 10,000 toneladas en 1990 y pasando a más de 20,000 toneladas en el 2000 (Unzueta, 2002).

El desarrollo de la acuicultura de los crustáceos a conducido a la necesidad de un mejor entendimiento de la relación entre la anatomía y la función del tracto digestivo de los crustáceos decápodos, en particular los camarones peneidos (Ceccaldi, 1997). Así mismo, ha llevado a generar un número de investigaciones acerca de los procesos digestivos que realizan, enfocándose en la evaluación de la habilidad de los organismos a hidrolizar, absorber y asimilar los principales nutrientes de los alimentos (Guzmán *et al.*, 2001). Dentro de estas investigaciones, el estudio de las enzimas digestivas constituye un elemento clave en cuanto al entendimiento del sistema digestivo y de los requisitos nutricionales en estadios específicos de desarrollo (Le Moullac *et al.*, 1996). La relación entre la actividad de las diferentes enzimas digestivas y el crecimiento, puede asistir en la definición de la calidad de los alimentos para camarones a diferentes edades (Lee y Lawrence, 1985), debido a que el rompimiento químico del alimento es lo que determina en última instancia los tipos de nutrientes que estarán disponibles para la asimilación (Lee *et al.*, 1984).

Los peneidos como otros crustáceos dependen de etapas para poder crecer, este acto lo pueden realizar mediante la exuvia, que no es sino el desprendimiento del exoesqueleto viejo. El proceso por el cual el camarón logra la exuvia es conocido como ciclo de muda. La muda influye en los crustáceos tanto en su morfología, fisiología y conducta (Dall *et al.*, 1990).

Muchos estudios se han realizado con el fin de conocer las enzimas digestivas endógenas presentes en la glándula digestiva del camarón *P. vannamei*, es así que se han encontrado enzimas tales como tripsina, quimotripsina, aminopeptidasas, lipasas, carbohidrasas, carboxipeptidasas A y B (van Wormhoudt *et al.*, 1995; van Wormhoudt *et al.*, 1996; Le Boulay *et al.*, 1996). La tripsina representa, ella sola, hasta el 60% de la actividad proteolítica y el 6 % de la proteína soluble de la glándula digestiva (Galgani, 1985); en tanto que la α -amilasa representa el 1% de la proteína soluble siendo una importante glucosidasa de *P. vannamei* (van Wormhoudt *et al.*, 1996).

La importancia del proceso fisiológico del ciclo de muda en los crustáceos es indiscutible, ya que está relacionado con la mayoría de los sistemas que controlan los procesos metabólicos y reproductivos del camarón, como también esta relacionado con la reducción del consumo de alimento, provocando el ayuno fisiológico y éste puede propiciar una deficiencia de nutrientes en el organismo. Por lo que, llevar a cabo estudios de ayuno puede ser útil para determinar el recambio de compuestos metabólicos y energéticos (Guderley *et al.*, 2003). El conocimiento derivado del entendimiento de los procesos bioquímicos puede ser la base para optimizar los esfuerzos de cultivo de estas especies.

El efecto del ayuno ha sido estudiado sobre la fisiología de varias especies de crustáceos, donde se ha observado que por periodos prolongados de ayuno, existe una disminución en el índice hepatosomático, tal es el caso de *Penaeus japonicus* (Cuzon *et al.*, 1980), *Metapenaeus ensis* (Leung *et al.*, 1990) y *Penaeus vannamei* (Sánchez-Paz *et al.*, 2003). La disminución que se presenta por efecto al ayuno se atribuye al uso preferencial de reservas energéticas, mismo que se ha observado ser especie-dependiente (Sánchez-Paz *et al.*, 2006).

Una de las estrategias empleadas para evaluar el efecto del ayuno sobre la digestión de estos crustáceos, ha sido con base a la variación en la actividad de sus enzimas endógenas. Las enzimas más abundantes en la glándula digestiva de camarón, son las proteasas (tripsina y quimotripsina) (Dall *et al.*, 1990), las lipasas por otro lado, son las encargadas de la hidrólisis de triacilglicéridos; los productos de la hidrólisis son empleados como fuente de energía en invertebrados marinos incluyendo el camarón, sirviendo así como energía almacenada (Yepiz-Plascencia *et al.*, 2000). En los crustáceos, los lípidos neutros, principalmente triacilglicéridos, son preferencialmente catabolizados durante el ayuno, mientras los lípidos polares son conservados como componentes estructurales de las membranas celulares (Hervant *et al.*, 1999). En *Penaeus esculentus*, el músculo abdominal es la principal fuente de proteínas y lípidos durante 14 días de ayuno (Barclay *et al.*, 1983).

La actividad de las lipasas ha sido reconocida en muchas especies (Berner and Hammond, 1970), pero pocos estudios han sido reportados en decápodos. El primer reporte de la presencia de una lipasa verdadera (glicerol-ester hidrolasa E.C. 3.1.1.3) en decápodos fue en la langosta *Homarus americanus* (Brockeroff *et al.*, 1970), mediante la digestión de trioleína por el jugo gástrico. Berner and Hammond (1970), reportaron la

actividad de lipasa en la glándula digestiva de *Cambarus virilis*, empleando Tween 60 como sustrato. [Loizzi and Peterson \(1971\)](#), localizaron sitios de actividad lipolítica en la glándula digestiva de *Procambarus clarkii*, incluyendo el lumen, y las células F, B y R. [Besiot y Capuzzo \(1990\)](#), determinaron la actividad de lipasa en larvas de *H. americanus* usando trioleína. Otro reporte de lipasa fue obtenido en *Cherax quadricarinatus* ([López-López et al., 2003](#)) y en el camarón blanco *Penaeus vannamei* ([Gamboa-Delgado et al., 2003](#)).

La información que existe acerca de lipasas verdaderas en crustáceos es escasa, [Lee y Lawrence \(1985\)](#), encontraron actividad de lipasa en el sistema digestivo de *Penaeus setiferus* usando tributirina como sustrato. En 1994, [González y Carrillo](#) encontraron actividad de esta enzima en el estadio de protozoa de *Litopenaeus schmitti*. [Deering and Hewitt \(1996\)](#), evidenciaron actividad en la glándula digestiva de *Penaeus monodon* siendo esta específica en la posición 1 de la trioleína. [González-Baro \(2000\)](#), estudió la actividad de lipasa en diferentes estadios embrionarios de *Macrobrachium borelli*, encontrando la mayor actividad de esta enzima en el estadio V. En 2001, [Moss et al.](#) evidenciaron la actividad de lipasa en la glándula digestiva de *Penaeus vannamei* empleando β -naftilnonanoato como sustrato.

Por lo anterior, el objetivo principal de este trabajo está enfocado en complementar la información existente acerca de la estrategia alimenticia que permite optimizar el alimento digerido y almacenado en la glándula digestiva, en función de la actividad enzimática, ya que los tipos y propiedades de las enzimas digestivas de los camarones definen la capacidad digestiva y por lo tanto, definen los ingredientes a ser incluidos en los alimentos para camarón ([Divakaran y Ostrowski, 1990](#)).

II. ANTECEDENTES

2.1 Características biológicas

El camarón blanco *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) se encuentra distribuido a lo largo de la costa del Océano Pacífico desde Sonora en México hasta Tumbes en Perú. Tiene preferencia por fondos de sedimento suave y habita desde la línea costera hasta los 72 m de profundidad (Dore y Frimodt, 1987). Algunos rasgos que caracterizan a la familia de los peneidos, son cuerpo poco comprimido, rostro bien desarrollado. El cuerpo de los crustáceos se divide en tres partes: cefalotórax, abdomen y telson. El cefalotórax esta conformado por anténulas, antenas, mandíbulas, maxilas, maxilípedos y pereiópodos; el abdomen esta formado por seis segmentos en los que se encuentran cinco pares de pleópodos, cuya función es natatoria, al igual que los urópodos que se encuentran en el telson; la mayor parte de los órganos se encuentran en el cefalotórax (Martínez-Córdova, 2001); el cual suele tener extremidades que se emplean para la locomoción, en ésta región del cuerpo se encuentra también el sistema respiratorio, nervioso y el sistema digestivo. Éste último se conforma por la boca, esófago, cámara gástrica, glándula digestiva e intestino (Martínez-Córdova, 2001).

2.2 Desarrollo del camarón

El camarón, como otros organismos de vida libre, está sujeto a variaciones en la disponibilidad de nutrientes. La respuesta de estos organismos a los periodos de ayuno a los que se someten, es un proceso complejo en que la fisiología de la muda como el comportamiento de los organismos debe tomarse en cuenta. En los peneidos el proceso de muda se divide en cinco estadios principales –A, B, C, D y E-, (Dall *et al.*, 1990). El

estadio A (post-muda) y el estadio B marcan el comienzo del ciclo de muda y la alimentación. En el estadio C (intermuda) el exoesqueleto se encuentra completamente formado y el organismo posee todas las facultades anatómicas para poder alimentarse. Durante los estadios D0 a D4 (premuda), la alimentación cesa. Finalmente, el estadio E (ecdisis), que se caracteriza por la separación del viejo exoesqueleto, impone al organismo restricciones para alimentarse. Durante la muda tardía y mientras que el exoesqueleto no se encuentre lo suficientemente firme en la postmuda, el organismo no se alimenta (Dall *et al.*, 1990), pudiendo someterse a condiciones de ayuno por periodos de 2 a 5 días.

En los crustáceos como el camarón, el proceso de muda implica periodos de ayuno en los cuales el organismo no puede alimentarse y que afecta la producción de enzimas por la glándula digestiva, necesarias para la digestión de los alimentos. En el camarón blanco, *Penaeus vannamei*, el ayuno prolongado (hasta 120 horas) puede alterar la expresión del gen de tripsina en la glándula digestiva, como una estrategia efectiva para soportar los efectos del ayuno (Muhlia-Almazán *et al.*, 2002; Sánchez-Paz *et al.*, 2003). Por otro lado, en los camarones alimentados con dietas con cantidades limitadas de carbohidratos, se ha observado una disminución en la actividad de amilasa (Le Moullac *et al.*, 1997). Sin embargo, y a pesar de ser un recurso económicamente importante y de saberse que este organismo en vida libre puede soportar periodos prolongados sin alimentarse, aún se desconoce la respuesta global de la expresión genética de este organismo para tolerar esta condición.

2.3 El sistema digestivo

La digestión es el proceso mediante el cual las moléculas que componen el alimento ingerido son digeridas, proceso químico conocido como hidrólisis, hasta moléculas más pequeñas, de manera que puedan ser absorbidas por las células del intestino. Este proceso es llevado a cabo por las enzimas digestivas, y depende en gran medida de la anatomía y fisiología del sistema digestivo de un organismo. Se ha establecido que el principal órgano de síntesis y secreción de enzimas digestivas de los crustáceos es la glándula digestiva, mismo que a diferencia del intestino y estómago, cámara gástrica, presenta una mayor actividad enzimática (Guillaume y Ceccaldi, 2001). Este órgano suele ser compacto, pareado y ocupa la cavidad cefalotorácica. Cada una de las mitades del órgano se encuentra compuesta usualmente de dos o tres lóbulos, aunque el número de lóbulos suele variar por especie (Gibson y Barker, 1979; Icely y Nott, 1992). Estos lóbulos contienen a su vez varios túbulos, los cuales se encuentran alineados y recubiertos en su región interna por un tejido epitelial lineal formado de diferentes tipos celulares (Al-Mohanna *et al.*, 1985a; Al-Mohanna y Nott, 1989; Dall *et al.*, 1990). La glándula digestiva está involucrada en varias actividades metabólicas, una de ellas es la síntesis y secreción de enzimas digestivas y absorción de nutrientes. Además se utiliza como un órgano de reserva de compuestos inorgánicos, de lípidos y carbohidratos (Gibson y Barker, 1979; Rosas *et al.*, 1995), por lo que es un órgano que presenta una actividad metabólica constante, en donde, su tasa de recambio celular es activa y por ello, es uno de los tejidos más utilizados para evaluar la expresión de genes en camarón.

2.4 Función de la glándula digestiva.

En la glándula digestiva del camarón se producen diversas enzimas digestivas que son secretadas al lumen de los conductos de la misma para la digestión del alimento; entre ellas se encuentran proteasas, lipasas, carbohidrasas (Dall y Moriarty, 1983). Estas enzimas son las que se encargan de hidrolizar las proteínas, lípidos y carbohidratos. La amilasa, digiere el almidón contenido en los alimentos (Resch-Sedlmeier y Gand-Sedlmeier, 1999), la tripsina y quimotripsina, que son las proteinasas digestivas más abundantes en peneidos como el camarón *Penaeus japonicus* y digieren proteínas (Eisen y Jeffres, 1969); también existen lipasas y otras enzimas intracelulares que son importantes para la hidrólisis del alimento.

Además de producir las enzimas digestivas, este órgano es el principal depósito de lípidos (Dall *et al.*, 1990). Los lípidos son transportados por medio de lipoproteínas, vía hemolinfa, hacia la glándula digestiva para almacenamiento, de donde son de nuevo movilizados a otros tejidos para su utilización (Yepiz-Plascencia *et al.*, 2000). La lipoproteína de alta densidad o HDL-BGBP (High Density Lipoprotein-Beta Glucan Binding Protein, siglas en inglés), también se sintetiza en la glándula digestiva (Romo-Figueroa *et al.*, 2004), y es secretada a la hemolinfa en donde lleva a cabo el transporte de los lípidos hacia otros tejidos.

2.5 Enzimas digestivas

La glándula digestiva a diferencia de otros órganos, presenta una mayor actividad enzimática, esto sugiere la importancia de este órgano en la síntesis y secreción de enzimas digestivas (Chiang y Jenn, 1985; Tsai *et al.*, 1986; Ceccaldi, 1989). El camarón al presentar características de omnívoro y carnívoro se alimenta de organismos invertebrados y plancton presentes en agua y suelo, organismos que están compuestos

por proteína, lípidos y carbohidratos, por lo tanto requiere para su asimilación y digestión, enzimas digestivas (Dall, 1992).

Algunas de las enzimas endógenas que se han estudiado en *P. vannamei* son: tripsina, quimotripsina, aminopeptidasas, lipasas, carbohidrasas, carboxipeptidasas A y B, β -glucosidasa y laminarasa (Galgani, 1985; Galgani, 1988; Dall, 1992; Omondi y Stark, 1995; Le Moullac *et al.*, 1997). Las tripsinas y quimotripsinas son endopeptidasas de la clase serino. La eficiencia catalítica de las tripsinas de los crustáceos peneidos es mayor a la de tripsinas de los vertebrados (van Wormhoudt *et al.*, 1996) y en *P. vannamei*, es la enzima más activa de todas las proteasas caracterizadas (Lemos *et al.*, 2000).

La digestión de los carbohidratos es llevada a cabo por carbohidrasas, como la α -amilasa, la cual es una glicoproteína carbohidrasa que cataliza la hidrólisis de los enlaces 1-4 de los carbohidratos. Tres isoformas de la amilasa se han determinado en *P. vannamei* (van Wormhoudt *et al.*, 1996) y en cuanto a posibles zimógenos, no ha sido caracterizado ninguno para esta enzima en crustáceos (Carrillo y González, 1998).

La hidrólisis de los lípidos esta asegurada por las lipasas (E.C. 3.1.1.3) y esterases. Los lípidos deben pasar por dos etapas previas para ser absorbidos, una emulsificación y una hidrólisis. La lipasa actúa sobre los lípidos emulsionados y las esterases continúan la digestión enzimática sobre los productos hidrosolubles obtenidos.

Dada la característica hidrofóbica de las grasas estas tienden a resistir la digestión. En vista de este inconveniente los animales usualmente sobrellevan el problema emulsificando las grasas para que las enzimas tengan acceso a ellas. En los crustáceos los compuestos emulsificantes que dispersan las grasas antes de su digestión (función desempeñada por la bilis en los mamíferos), son derivados de la taurina y del ácido cólico y desoxicólico (Cruz-Suárez, 1994).

La síntesis de las enzimas digestivas es dictada por una serie de factores como: parámetros físico-químicos del agua (pH, oxígeno, salinidad y temperatura), edad y tamaño del camarón, estado fisiológico de la muda, fuente de alimento y frecuencia de alimentación. En vista que son muchas las causas que afectan la actividad de las enzimas, es importante maximizar la digestión y absorción de los nutrientes para aprovechar al máximo la capacidad de las enzimas digestivas. Por lo anterior, se han llevado a cabo estudios para entender la habilidad de los organismos a adaptarse a fluctuaciones en las condiciones alimentarias, para su sobrevivencia.

2.5.1 Lipasas

Las lipasas están ampliamente distribuidas entre bacterias, hongos, plantas y animales (Bornscheuer, 2002). Sus funciones fisiológicas no son claras en muchos de ellos, aunque estas enzimas parecen participar, en general, en la bioconversión de lípidos, principalmente triacilglicéridos (TAG) en diferentes organismos (Pandey *et al.*, 1999). Algunas lipasas participan en la alteración de la composición de la membrana celular, con la finalidad de modificar su función a fin de que el organismo pueda adaptarse a cambios ambientales, también participan en la destrucción intracelular (vacuolas), en citólisis (Schmid y Verger, 1998; Titball, 1998), como también en la detoxificación de agentes contaminantes (Khalameyzer *et al.*, 1999), o bien en patogénesis, actuando como factores de virulencia (Jaeger y Eggert, 2004).

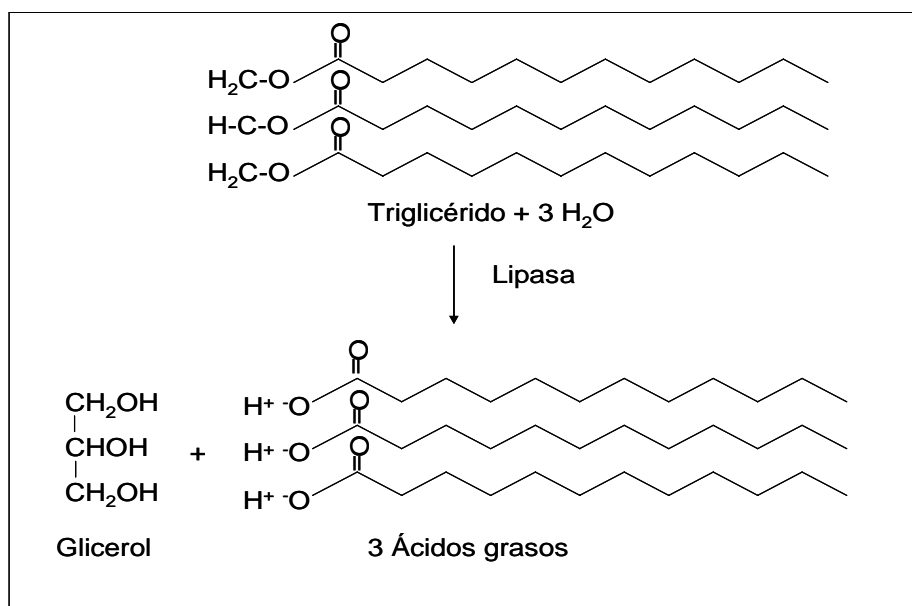


Figura. 1. Hidrólisis de triacilglicéridos

Las “lipasas” o “enzimas lipolíticas” son un término genérico que incluye dos principales grupos de enzimas: 1) carboxilesterasas, por su preferencia en sustratos de cadena corta y 2) lipasas “verdaderas”, por su preferencia en sustratos de cadena larga (Fig. 1). Sin embargo, otras enzimas pueden ser capaces de hidrolizar ácidos grasos (AG), tales como las cutinasas, o lípidos similares (fosfolipasas, etc.), estos son también considerado por algunos autores como enzimas lipolíticas (Fojan *et al.*, 2000). Las lipoproteínas lipasas (EC 3.1.1.34), son enzimas que hidrolizan triacilglicéridos de quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), y están cercanamente relacionadas con las lipasas de vertebrados superiores, por lo que también pueden ser consideradas como lipasas, pese a que son contempladas como un grupo separado.

2.5.1.1 Diferencias entre lipasas verdaderas y carboxilesterasas

Existen diversos criterios (tabla I) que han sido empleados para diferenciar una lipasa “verdadera” (EC 3.1.1.3), también conocida como triacilglicerol lipasa, de una

carboxilesterasa (EC 3.1.1.1), también llamadas esterases. Así mismo, la especificidad por el sustrato es uno de los criterios válidos para la distinción de estas enzimas (Jaeger *et al.*, 1999; Fojan *et al.*, 2000; Bornscheuer, 2002).

Tabla I. Diferencias entre lipasas y esterases.

Propiedad	Lipasas “verdaderas”	Carboxilesterasas
Sustrato de preferencia	Triacilglicéridos de cadena larga	Acilglicéridos de cadena corta
Hidrofobicidad del sustrato	Alta	Baja
Estado físico del sustrato	Insoluble y agregado	Soluble
Activación interfacial y “lid” o tapadera	Si	No
Aminoácidos expuestos y aminoácidos del sitio activo.	Mayormente no polares	Mayormente polares
Rango de pH óptimo	Mayormente 8-9, pero 5-6 algunas de ellas.	5.5-7
Regio- y estereoselectividad	Alta	Baja tendiendo a nula
Actividad y estabilidad en solventes orgánicos	Alta	Baja

2.5.1.2 Propiedades catalíticas de las lipasas

Las lipasas son enzimas muy versátiles y catalizan una gran cantidad de reacciones (tabla II). Ellas catalizan la hidrólisis de AG y de una amplia variedad de esteres (esteres simples, fosfolípidos, acilglicósidos, etc), incluyendo sustratos no naturales. Cuando actúan en presencia de solventes orgánicos (algunas veces con requerimientos de agua), son capaces de llevar a cabo reacciones reversibles (síntesis de esteres), o intercambio de grupos acilo (inter y transesterificación) por diferentes AG, alcoholes, esteres, glicósidos y aminas, o bien por diferentes grupos químicos del mismo compuesto (Schmidt-Dannert, 1999; Pandey *et al.*, 1999; Ferrer *et al.*, 2000; Bornscheuer, 2002; Gupta *et al.*, 2004).

Tabla II. Reacciones catalizadas por lipasas

Hidrólisis de ésteres:	$R_1-COO-R_2 + H_2O \rightarrow R_1-OH + R_2-COOH$ $R_1-COO-R_2 + H_2O_2 \rightarrow R_1-OH + (Peroxid)R_2-COOH$
Síntesis de ésteres	$R_1-OH + R_2-COOH \rightarrow R_1-COO-R_2 + H_2O$
Esterificación intramolecular	$HO-R-COOH \rightarrow R-COO-R$ (Lactonas)
Síntesis de estópidos y otros polímeros	$R_1-COOH + HO-R_2-COOH \rightarrow R_1-COO-R_2-COOH$
Interesterificación	$R_1-COO-R_2 + R_3-COO-R_4 \rightarrow R_1-COO-R_4 + R_3-COO-R_2$
Transesterificación por acidólisis	$R_1-COO-R_2 + R_3-COOH \rightarrow R_1-COO-R_3 + R_2-COOH$
Transesterificación por alcoholólisis	$R_1-COO-R_2 + R_3-OH \rightarrow R_1-COO-R_3 + R_2-OH$
Transesterificación por aminólisis	$R_1-COO-R_2 + R_3-NH_2 \rightarrow R_1-CONH-R_3 + R_2-OH$

Las lipasas usualmente llevan a cabo estas reacciones con una alta quimio-, regio- o enantio-selectividad, la cual puede ser diferente entre las reacciones de hidrólisis y las reacciones de síntesis o intercambio de acilos (Gunstone, 1999), por eso, las lipasas pueden ser:

- ✓ Específicas sobre un sustrato: presentan diferente grado de lipólisis cuando actúan sobre compuestos como triacilglicéridos (TAG), diacilglicéridos (DAG), monoacilglicéridos (MAG) u otro éster (Pandey *et al.*, 1999).
- ✓ No específicas o regio-específicas: las lipasas no específicas actúan de manera aleatoria sobre los TAG, los cuales resultan en AG y glicerol. Por otro lado, muchas lipasas extracelulares son regio-específicas, es decir, tienen una preferencia en la posición de un enlace éster a hidrolizar. Las lipasas regio-específicas son usualmente específicas para la posición 1,3 del triacilglicérido. Sin embargo, también hay lipasas específicas para la posición 2 de los triacilglicéridos, produciendo 1,3 DAG (Gunstone, 1999).

- ✓ Específicas a AG: estas lipasas exhiben una preferencia por un AG o por un rango de AG (Gupta *et al.*, 2004). Éstas son capaces de distinguir características estructurales de cadenas acilo tales como longitud, número, posición o configuración de dobles enlaces, o la presencia de algún grupo (alquilo) en particular (Gunstone, 1999).
- ✓ Enantio-estereoselectivas: estas lipasas son capaces de discriminar entre los enantiómeros de una mezcla racémica. La estereo-especificidad de una lipasa depende de la estructura del sustrato, como también de las interacciones con el sitio activo y las condiciones de reacción. La estero-especificidad es una de las propiedades más importantes de las lipasas dada su aplicación en biotecnología (Muralidhar *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2004).

2.5.1.3 Estructura y mecanismo de catálisis de las lipasas

El número de lipasas que se han estudiado en la última década ha crecido considerablemente, algunos de estas se han estudiado por cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear (RMN) (Fojan *et al.*, 2000). En estos estudios se revela que la mayoría de las lipasas tienen una estructura similar, sin embargo la secuencia de éstas difiere considerablemente (Jaeger *et al.*, 1999). La estructura de estas enzimas es denominada α/β hidrolasas (Fig. 2), misma que es común para las lipasas y otras hidrolasas (Ollis *et al.*, 1992).

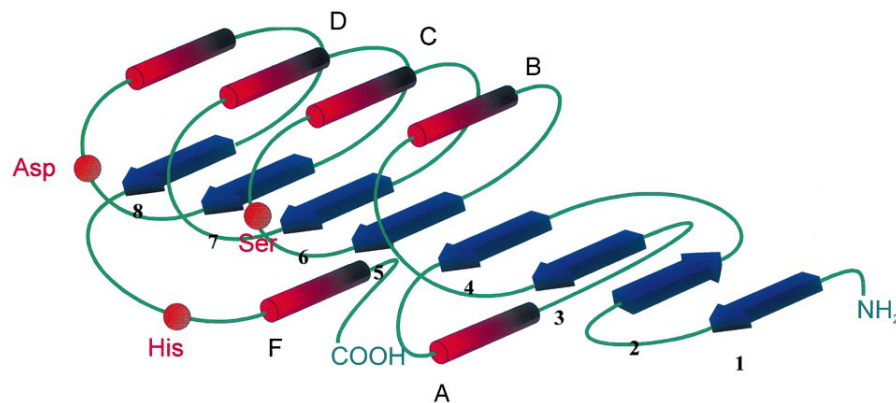


Figura. 2. Representación esquemática de la estructura canónica de una α/β hidrolasa. Las placas β (1-8) se muestran en color azul y las α -hélices (A-F) se muestran en color rojo. La posición relativa de los aminoácidos de la triada catalítica está indicada por círculos rojos (Bornscheuer, 2002).

La estructura canónica de las α/β hidrolasas (Fig. 2) consiste en 8 placas β con la segunda placa antiparalela que se encuentran en la parte central de la molécula. Las placas paralelas β_3 a β_8 están conectadas por α -hélices. Las placas β tienen una superhélice que cubre la superficie de las placas. La curvatura de las placas β puede diferir significativamente entre enzimas y también, la posición de las α -hélice puede variar considerablemente. La estructura de las lipasas conocidas presentan esta conformación base, sin embargo pueden presentar variaciones en el número o en la disposición de las α -hélices y placas β (Schrag y Cygler, 1997).

Así mismo, muchas de las lipasas verdaderas tienen una estructura en particular, denominada como *lid*, la cual se encuentra localizada en la superficie de la proteína, cercana al sitio activo. Esta *lid* consiste en una α -hélice, la cual es principalmente hidrofóbica por la parte expuesta al sitio activo e hidrofílica en la superficie externa. La *lid* presenta una disposición que varía de acuerdo al ambiente fisicoquímico de la enzima (Grochulski *et al.*, 1994; Cygler y Schrag, 1997). Por lo anterior, la *lid* cubre el sitio activo de la enzima en presencia de un medio no polar. Por el contrario, la presencia de una interfase, producida por una emulsión (agua-aceite) produce un arreglo

estructural que desplaza la *lid*, la cual es estabilizada por interacciones hidrofóbicas con la superficie de la enzima, permitiendo el libre acceso del sustrato y el solvente al sitio activo de la enzima. Sin embargo, hay excepciones, como la lipasa pancreática de cerdo que no tiene *lid* (Verger, 1997; Jaeger *et al.*, 1999; Cygler y Schrag, 1997).

2.5.1.4 El sitio activo de las lipasas

El sitio activo de las enzimas α/β hidrolasas tienen tres residuos de amino ácidos: un residuo nucleofílico (serina, cisteína o aspártico), un residuo catalítico ácido (ácido aspártico o glutámico) y un residuo de histidina, siempre en ese orden en la secuencia (Ollis *et al.*, 1992).

El residuo nucleofílico serina está localizado en una región conservada formada por 5 aminoácidos Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly (Ollis *et al.*, 1992). Esta secuencia puede ser usada como indicador para la clasificación de lipasas, cabe destacar que la clasificación de lipasas se ha generado principalmente de estudios realizados en microorganismos, así mismo existen excepciones para usar el pentapéptido como indicador, ya que en algunas subfamilias, la primera Gly es reemplazada por alanina, por otro lado en la familia II, presentan Gly-Asp-Ser-(Leu) (Arpingy y Jaeger, 1999), y finalmente esta región conservada también se ha encontrado en otras proteínas (Fojan *et al.*, 2000).

Los residuos ácidos (Asp o Glu) de las α/β hidrolasas, se encuentran posicionados en la placa $\beta 7$. Sin embargo, la posición de los residuos ácidos puede variar, aunque esta posición en el sitio activo es conservada en diferentes lipasas. Los residuos ácidos están unidos a la histidina de la triada catalítica por puentes de hidrógeno, la cual está localizada en un giro, el cual presenta una longitud variable y se encuentra después de la placa 8 (Ollis *et al.*, 1992; Jaeger *et al.*, 1999).

El sitio activo de las lipasas contiene también otras estructuras que facilitan el proceso de catálisis tales como el “sitio de unión de los lípidos”, el cual es un bolsillo responsable del acomodo de la cadena acilada de los esteres que van a ser hidrolizados. Este bolsillo contribuye a mantener el sustrato unido al sitio activo de la enzima durante la catálisis (Jaeger *et al.*, 1999).

2.5.1.5 Mecanismo de catálisis de las lipasas.

De acuerdo a varios estudios realizados, particularmente análisis de complejos lipasa-inhibidor, se tienen evidencias del mecanismo de hidrólisis de esteres. Este proceso está constituido por cuatro pasos, los cuales se presentan en la figura 3.

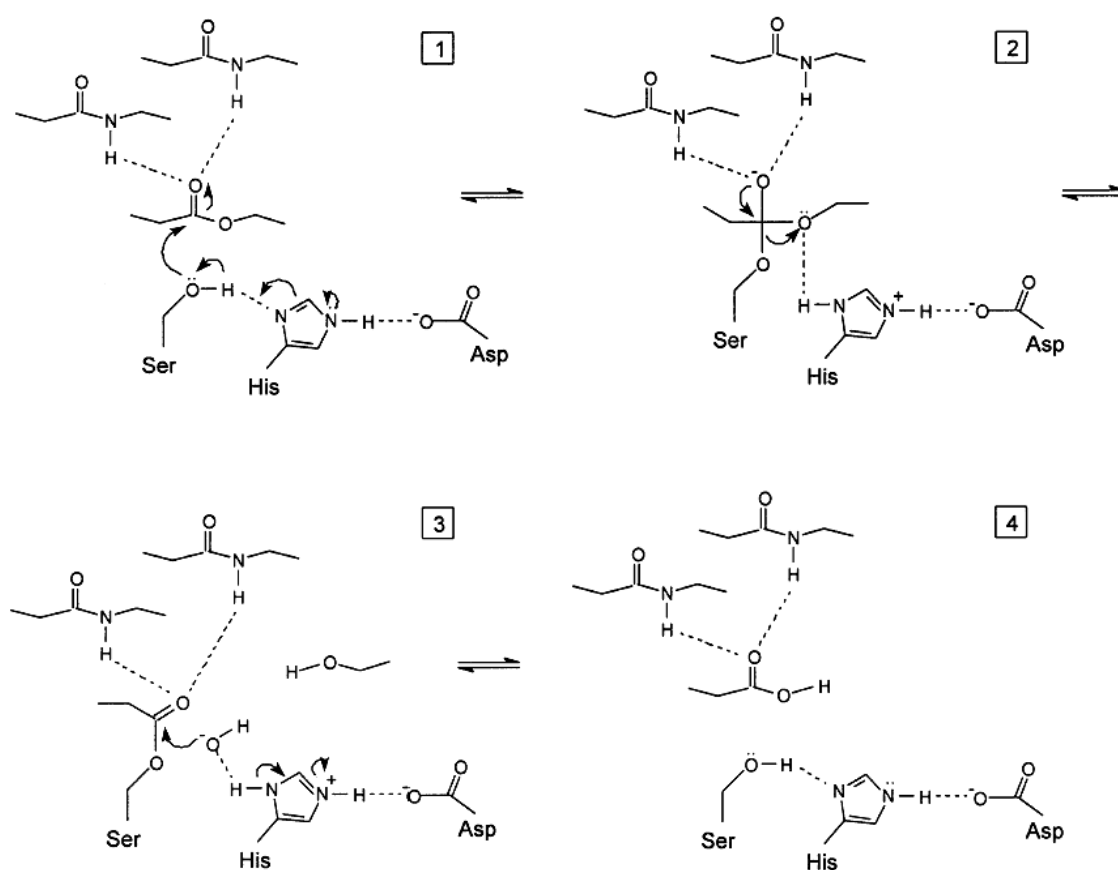


Figura. 3. Mecanismo de catálisis de las enzimas lipasas.

1) La hidrólisis inicia con la unión del lípido y la activación de los residuos Ser e His, por lo que un protón del grupo hidroxilo de la Ser es transferido. La transferencia del protón facilita la presencia del residuo ácido catalítico, el cual orienta el anillo imidazol de la His y neutraliza parcialmente la carga. La activación es seguida por un ataque por el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de la Ser sobre el grupo carbonilo del enlace éster del lípido (Jaeger *et al.*, 1999).

2) Posteriormente el “intermediario tetraédrico” es formado, el cual está caracterizado por una carga negativa del átomo de oxígeno del grupo carbonilo del enlace éster y cuatro átomos unidos al C del grupo carbonilo, organizados en forma tetraédrica. Este intermediario está estabilizado por el α -hélice C, y por el enlace de hidrógeno entre la carga negativa del átomo de oxígeno del grupo carbonilo (oxianión) y los dos grupos NH (agujero del oxianión). Posteriormente, el protón de la His es donado al oxígeno del enlace éster. Hasta este punto, el componente ácido del sustrato es esterificado a la Ser nucleofílica (intermediario covalente) (Jaeger *et al.*, 1999).

3) En la siguiente etapa, se lleva a cabo una deacilación, en la cual una molécula de agua es incorporada para llevar a cabo la hidrólisis del intermediario covalente (acil-enzima) y el componente ácido del sustrato es esterificado al residuo Ser de la enzima. La His catalítica activa la molécula de agua, los hidroxilos producidos propician un ataque nucleofílico sobre el carbono carbonilo del grupo acilo, el cual se une covalentemente a la Ser. Una vez más, un intermediario tetraédrico es formado (con carga negativa), el cual es estabilizado por interacciones con el oxianión (Jaeger *et al.*, 1999).

4) El residuo de His dona un protón adicional al átomo de oxígeno del residuo Ser, el cual rompe el enlace éster unido entre la Ser y el componente acilo, y produce el producto acilo. Después de la difusión del producto acilo, la enzima esta lista para otro ciclo de catálisis (Jaeger *et al.*, 1999).

2.5.1.6 Activación interfacial

Muchas de las lipasas verdaderas se caracterizan por un fenómeno denominado “activación interfacial” (Fig. 4), la cual consiste en el incremento de la actividad cuando la enzima actúa en la interfase agua-lípido de sustratos emulsificados o en micelas (Sarda y Desnuelle, 1958). Este incremento en la actividad enzimática es provocado por ciertos arreglos estructurales de la región del sitio activo de las lipasas (Fojan *et al.*, 2000). Sin embargo, este fenómeno depende de la estabilidad de la interfase de los sustratos empleados, a esta estabilidad se le denomina concentración micelar crítica (CMC); como también de las condiciones de reacción: fuerza iónica, presencia de detergentes o agentes emulsificantes, agitación, etc. (Verger, 1997).

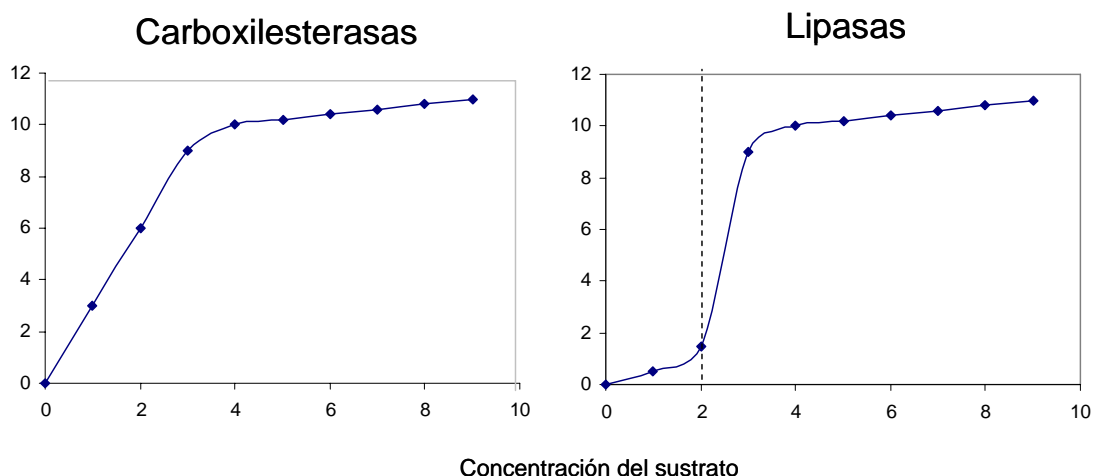


Figura. 4. Actividad enzimática de carboxilesterasas y lipasas verdaderas.

Las carboxilesterasas muestran un comportamiento típico de Michaelis-Menten con una relación proporcional del incremento en la actividad con respecto al incremento de la concentración de sustrato. Estas enzimas tienen preferencia por sustratos de cadena corta, que permanecen como monómeros en la reacción. Por el contrario, las lipasas verdaderas presentan una fase *lag* de baja actividad a baja concentración del sustrato, hasta que el sustrato alcanza una concentración suficiente para formar una emulsión o micelas (línea punteada), es entonces cuando la actividad incrementa en forma proporcional a la concentración del sustrato, a esto se denomina activación interfacial.

Las lipasas verdaderas presentan un incremento en el contenido de residuos no polares (usualmente valina, leucina e isoleucina). Estos residuos pueden facilitar la unión de la lipasa al sustrato hidrofóbico, y posteriormente llevar a cabo el arreglo estructural responsable de la apertura de la *lid* (Fojan *et al.*, 2000). Una vez que la *lid* se abre, el sitio activo está accesible al sustrato, el cual puede explicar el incremento en la actividad (activación interfacial) de la enzima. Por esta razón, las lipasas que no tienen *lid* no muestran activación interfacial (Verger, 1997; Jaeger *et al.*, 1999). Sin embargo, hay lipasas de origen bacteriano, que tienen *lid* pero no muestran activación interfacial, tal es el caso de la lipasa de *Pseudomonas glumae*, o bien tienen *lid* pero sólo muestran activación interfacial sobre algunos sustratos, como la lipasa de *Staphylococcus hycus* (Verger, 1997; Schmid y Verger, 1998).

La conformación cerrada de las lipasas verdaderas, el sitio activo cubierto por la *lid*, predomina en solución acuosa, además una baja actividad de la enzima indica que la enzima se encuentra bajo esta conformación. Sin embargo, la conformación abierta de las lipasas verdaderas producida por la apertura de la *lid* predomina cuando la proteína se encuentra en contacto con los componentes hidrofóbicos de la interfase lípido-agua.

La conformación abierta hace que exista acceso del sustrato a los residuos de la triada catalítica y provoque el arreglo estructural para exponer los residuos hidrofóbicos de la superficie alrededor de los residuos catalíticos (Fig 5; [Cygler y Schrag, 1997](#)). El incremento del contenido de residuos no polares en la región del sitio activo de las lipasas verdaderas en comparación con las carboxilesterasas y otras enzimas, permite un incremento en la interacción del sustrato con el sitio activo de las lipasas verdaderas, y así mismo un incremento en la actividad enzimática cuando la *lid* se mueve ([Fojan et al., 2000](#)).

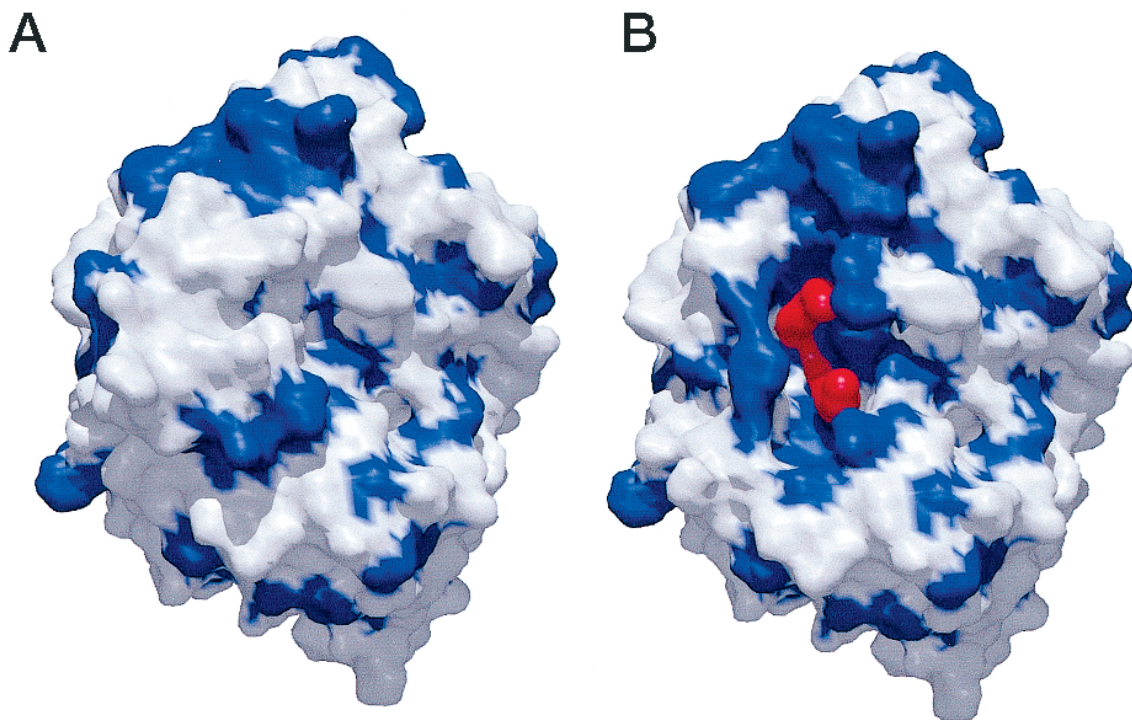


Figura. 5 Representación molecular de la lipasa gástrica humana. A. Conformación cerrada de la enzima; B. Conformación abierta de la enzima, los aminoácidos del sitio activo se muestran de color rojo. Los residuos hidrofóbicos de color azul ([Roussel et al., 1999](#)).

2.5.1.7 Lipasas en invertebrados

La actividad del sistema enzimático involucrado en la activación y degradación de AG, y en la síntesis de TAG y fosfolípidos han sido estudiados en diferentes invertebrados.

Sin embargo, la presencia de una verdadera lipasa (E.C. 3.1.1.3) en crustáceos ha sido demostrada en pocas especies, *Homarus americanus* (Besito y Capuzzo, 1990), y *Penaeus monodon* (Deering y Hewitt, 1996).

Los diferentes estudios desarrollados para evaluar el metabolismo energético en la ontogenia de diferentes invertebrados muestran que puede haber variaciones dependiendo del estadio de desarrollo en el que se encuentre el organismo. Estas variaciones permiten definir el tipo de reservas energéticas que se movilizan durante la ontogenia. En *Macrobrachium borelli* (González-Baró *et al.*, 2000), se ha demostrado que la participación más activa de la enzima es durante la organogénesis, misma que se desarrolla en el estadio V. Por otro lado, Johnston *et al.* (2004) observaron que la actividad lipasa decrecía significativamente en el estadio larvario I y IV de *Jasus edwardsii*, sugiriendo que los lípidos son reservados para estadios tardíos del desarrollo. Mientras que en peneidos como *Litopeaneus schmitti* se ha observado que la actividad más alta registrada, ha sido durante el estadio de zoea (González *et al.*, 1994).

Con la finalidad de caracterizar las lipasas presentes en estos invertebrados, se ha puesto mucha atención en la purificación de estas enzimas. Y esto, ha permitido observar que las características que presentan las lipasas de invertebrados difieren de las de vertebrados. Recientemente, una lipasa de escorpión ha sido caracterizada, ésta presenta una masa molecular de 50 kDa y tiene una preferencia por sustratos de cadena larga, 33 aminoácidos del extremo amino han sido identificados, de los cuales 13 aminoácidos presentan homología con los de *Drosophila melanogaster* (Zouari *et al.*, 2005). Por otro lado, la lipasa caracterizada de *Cephaloleia presignis*, presenta una masa molecular de 31 kDa y ha sido identificada como una glicoproteína con un pI de 6.9 (Arreguín-Espinosa *et al.*, 2000).

Las relaciones de diferentes órganos en coordinación con el metabolismo celular bajo diferentes condiciones fisiológicas han sido extensamente estudiadas. Sin embargo, los mecanismos genéticos y moleculares que regulan estos procesos son poco conocidos. El estudio de la expresión de este gen ha sido evaluado en diferentes tejidos del gusano de la seda *Bombyx mori*, siendo la glándula digestiva el único órgano donde se evidenció la expresión del gen de lipasa (Kangayam *et al.*, 2003), lo que da un indicio de su participación en digestión. Ingo *et al.* (2002), en un trabajo con larvas de *Drosophila* sometidas a ayuno total o alimentadas exclusivamente con azúcar, reportaron, mediante la utilización de microarreglos, la existencia de cerca de 40 genes cuya expresión se modificó como respuesta al ayuno. Uno de los genes en los que el efecto fue más notorio fue el gen lip3 (lipasa 3).

Se desconoce la respuesta que los peneidos presentan ante estímulos estresantes como el ayuno por medio de reacciones clave en el metabolismo intermedio. Por lo que la evaluación de posibles cambios en la actividad de lipasas durante y después del estrés alimentario dará pistas sobre la regulación fisiológica ante esta condición natural de los peneidos.

2.5.1.8 Métodos para la evaluación de la actividad de lipasas

La actividad lipolítica es difícil de determinar dado que las lipasas son solubles en agua y actúan en sustratos hidrófobos. Además, factores como la concentración del sustrato en la interfase o el uso de detergentes, deben ser considerados para interpretar la actividad y las cinéticas obtenidas. Por esta razón, un gran número de métodos para cuantificar la actividad de lipasas, o su inhibición, han sido reportados (Beisson *et al.*, 2000; Wahler y Reymond, 2001; Pencreac'h *et al.*, 2002). Estos métodos difieren en el

proceso de solubilización del sustrato y en el sistema de detección, lo cual hace difícil realizar comparaciones (Beisson *et al.*, 2000). Por otro lado, muchos de los métodos usados no son convenientes para extractos crudos o para realizar una gran cantidad de ensayos, ya que son caros, consumen tiempo o están limitados a un escaso número de muestras. Por lo que existe una preferencia sobre los ensayos cromogénicos y fluorométricos, por la sencillez y reproducibilidad de éstos (Whaler y Reymond, 2001). Los métodos más comunes para la medición de actividad de lipasas se resumen en la tabla III.

Tabla III. Ensayos para la determinación de la actividad de lipasa.

Ensayo y sustrato	Producto analizado	Principio	Comentarios	Referencias
<i>Ensayo en placa</i>				
Tributirina, acilgliceroles y esteres de AG.	AG	Halo basado en el cambio de color de fenol rojo/azul victoria/azul sulfato o medición por fluorescencia después de el complejo de AG con colorantes fluorescentes (Rodamina B)	Conveniente y rápido.	Jaeger <i>et al.</i> , 1999 Samad <i>et al.</i> , 1989 Kouker y Jaeger, 1987
<i>Titulación</i>				
AG y aceites, TAG, metil esteres	AG	Reacción de neutralización por pH-stat o indicadores de pH.	Más conveniente que el análisis espectrofotométrico y comúnmente usado.	Beisson <i>et al.</i> , 2000
<i>Espectrofotométricos</i>				
AG conjugados de β -naftol	β -naftol	Estimación de β -naftol por complejo con Fast Blue BB	No es estable a pH extremos.	Verger, R. 1980
<i>p</i> -nitrofenil esteres	<i>p</i> -nitrofenol	Producto colorido medido a 410 nm.	Método conveniente. Preferido durante procesos de purificación.	Jaeger <i>et al.</i> , 1999
	AG	Precipitación de AG con calcio o cobre y medición por turbidimetría.	Simple, reproducible y sensible, puede ser usado para ensayos cuantitativos.	Beisson <i>et al.</i> , 2000
<i>Ensayos de fluorescencia</i>				
TAG con grupos alquilo sustituidos	Grupos fluorescentes	Fluorescencia después de hidrólisis	Ensayo rápido, pero los	Beisson <i>et al.</i> , 2000

con grupos fluorógenos.	libres	de TAG.	sustratos son caros.	
<i>Procedimientos cromatográficos</i> (TLC/GC/HPLC)				
TAG, AG y aceites	AG	Análisis y cuantificación del producto o sustrato residual a través de columnas.	Su uso depende de la disponibilidad del instrumento, su realización consume mucho tiempo.	Beisson, et al., 2000
<i>Presión interfacial</i> Método de monocapa	AG	Cambio en la presión superficial por ruptura de TAG.	Altamente sensible.	Jaeger et al., 1999
<i>Presión interfacial:</i>	AG	Regiones de la bicapa hidrolizada por lipasas muestran profundos defectos por la fuerza atómica.	Provee un esquema cinético de la degradación de lípido a nanoescala. Se requiere de sofisticados instrumentos.	Beisson et al., 2000
<i>Espectroscopia de IR</i> Aceites Triocatanoglicerol.	vegetales, Esteres de AG y AG libres.	Lipólisis monitoreada por IR.	Se requiere de equipo sofisticado y es un método costoso.	Walde y Luisi., 1989

2.6 Requerimientos de lípidos en crustáceos

Los lípidos constituyen un importante componente en la dieta pues son utilizados como productores de energía y son esenciales para el desarrollo del metabolismo de crustáceos. Como macronutrientes son componentes esenciales de todas las membranas celulares y subcelulares y ayudan a mantener la estructura e integridad de las mismas. Son además fuente de ácidos grasos esenciales y vehículo biológico en la absorción de ciertos nutrientes y vitaminas liposolubles.

Los camarones peneidos no tienen una exigencia lipídica definida. El aspecto de la nutrición de lípidos más estudiado es el requerimiento de ácidos grasos polinsaturados, fosfolípidos y esteroides (Shiau, 1998). La demanda de lípidos en la dieta de crustáceos varía con la especie, edad, fuente de lípidos y otros nutrientes contenidos en el alimento (Sheen *et al.*, 1994).

Ya se ha demostrado que los camarones están limitados a sintetizar de novo los AG *sn*-6 y *sn*-3, incluyendo el ácido oleico (18:2 Δ 6) y el ácido linoleico (18:3 Δ 3). Así mismo están limitados a elongar los PUFAs a MUFAs como el ácido araquidónico (20:4 Δ 6, AA), eicosapentanoico (20:5 Δ 3, EPA) y docosahexanoico (22:6 Δ 3, DHA). Estos AG son considerados esenciales. Algunas combinaciones de AG *sn*-3 y *sn*-6 parecen ser requeridos en las dietas (Jones *et al.*, 1997). Se ha estudiado el crecimiento de peneidos, con diferentes concentraciones de lípidos y se ha observado que existe un mayor crecimiento de *Farfantepenaeus chinensis* cuando es alimentado con 0.5% de ácido linoleico y oleico (Xu *et al.*, 1994), así mismo, este mismo efecto fue observado en *Farfantepenaeus indicus* (Chandge y Paulraj, 1998). Sin embargo para especies como *P.*

monodon, la concentración óptima fue en un radio de 2:3 de ácido oleico y linoelico (Glencross y Smith, 1999).

Por su parte, los triacilglicéridos también juegan un papel importante en la fisiología de camarón como componentes de membrana celular por lo que el aporte adecuado de triacilglicéridos es importante en el crecimiento y reproducción. Los triacilglicéridos se almacenan en la glándula digestiva y funcionan como fuente de energía durante el ayuno (Stuck *et al.*, 1996) y las reservas se agotan rápidamente en animales con alimentación deficiente (Stuck *et al.*, 1996).

Por otro lado, los fosfolípidos en la nutrición de los peneidos son componentes de estructuras de membrana, mediadores y moduladores de señales transmembranales, así mismo actúan como emulsificantes, facilitando la digestión y absorción de AG, sales biliares y otros materiales liposolubles. Los fosfolípidos son uno de los lípidos más importantes ya que presentan diferentes funciones, como el transporte de lípidos absorbidos del hepatopáncreas a hemolinfa (Coutteau *et al.*, 1997), donde son los principales componentes lipoproteicos (Yepiz-Plascencia *et al.*, 2000; González-Félix *et al.*, 2002).

Los lípidos presentes en el alimento son digeridos y absorbidos a través del tracto digestivo y posteriormente son transportados a células especializadas para su almacenamiento o utilización. Los lípidos que se almacenan en la glándula digestiva, son movilizados de este órgano por lipoproteínas que se unen y acarrean moléculas hidrofóbicas en el ambiente acuoso de la hemolinfa. Las principales lipoproteínas presentes en crustáceos se denominan lipoproteínas de alta densidad (HDL, High Density Lipoprotein, por sus siglas en inglés) y lipoproteínas de muy alta densidad (VHDL, Very

High Density Lipoprotein, por sus siglas en inglés) (Yepiz-Plascencia *et al.*, 2000; Yepiz-Plascencia *et al.*, 2002).

Uno de los roles más importantes de los lípidos en crustáceos está relacionado con la reproducción, ya que están asociados con la maduración de los oocitos y, dado que durante los primeros estadios de desarrollo, no se encuentra desarrollado el tracto digestivo de las larvas, los lípidos son la principal fuente de energía, lo que permite la sobrevivencia de las larvas de camarón. Los esteroides libres son comúnmente encontrados en el desarrollo de los ovarios, éstos contribuyen a la estructura de la membrana, así mismo participan como precursores de hormonas y esteroides. Un incremento de lípidos se ha observado durante la vitolegenesis, alrededor del 18-41% del total de masa seca al final de la maduración. En muchas especies, los fosfolípidos, TAG y esteroides son los lípidos más abundantes en los ovarios (Lee y Lawrence, 1995). Los lípidos que se almacenan en el hepatopáncreas son transportados a los ovarios durante la vitelogenesis (Harrison, 1990). Sin embargo, la cantidad almacenada en los ovarios es superior a la que se almacena en la glándula digestiva, por lo que se ha propuesto que una síntesis de lípidos es llevada a cabo en los ovarios y en el desarrollo de los oocitos.

2.7 Utilización de lípidos durante el ayuno

Durante la ontogenia de los peneidos, el ayuno ocurre como un fenómeno natural, que se presenta cuando existe una pérdida del viejo exoesqueleto, por lo que no se encuentran aptos para ingerir alimento. De acuerdo con Ritar *et al.* (2003), durante el ayuno, estos organismos en todos los estadios de la ontogenia, se presentan tres fases diferentes de degradación de biomasa: al principio, los lípidos son preferencialmente movilizados, esto

se ve reflejado en un decremento en el radio lípido-proteína, el cual se hace presente en periodos cortos de ayuno. Cuando los lípidos de reserva han sido agotados, las proteínas son empleadas. Una parte de los lípidos forma parte en las estructuras celulares como membranas y normalmente no están disponibles para la obtención de energía. Es en esta fase donde el catabolismo de proteínas se hace presente, reflejándose en un incremento del radio lípido-proteína, manifestando así la degradación de estructuras como músculo y tejido nervioso. En la fase final del ayuno, los lípidos estructurales pueden ser degradados, por lo que el radio lípido-proteína decrece nuevamente. Es en este punto, cuando las larvas no pueden recobrase después de ser realimentadas (Sánchez-Paz *et al.*, 2006). El ayuno puede provocar severas deficiencias de nutrientes. Por lo que, estudios de ayuno pueden permitir determinar las principales fuentes energéticas y metabólicas (Guderley *et al.*, 2003). El entendimiento de estos procesos bioquímicos puede servir para optimizar recursos en el cultivo de estos organismos.

Los lípidos neutros, principalmente TAG, son preferencialmente catabolizados durante el ayuno, mientras que los lípidos polares (fosfolípidos y colesterol) son conservados para participar en funciones estructurales como componentes de membrana celular (Hervant *et al.*, 1999). Muchas especies de peneidos han sido evaluados bajo condiciones de ayuno, reportes de *P. esculentus* indican que la masa muscular es la principal fuente de proteínas y lípidos cuando ha estado sujeto a 14 días de ayuno (Barclay *et al.*, 1983).

El metabolismo de lípidos puede sufrir variaciones dependiendo del estadio de desarrollo. En la langosta *J. edwardsii*, se observó que alrededor de 6-11 días de ayuno, los lípidos fueron la principal fuente de energía en los últimos estadios larvarios, mientras que el catabolismo de lípidos se hizo predominante en el primer estadio larvario (Ritar *et al.*,

2003). Las diferencias en el uso de reservas energéticas pueden ser específicas para ciertas especies, sin embargo, para poder elucidar la fuente de energía es necesario evaluar las biomoléculas (carbohidratos, proteínas y lípidos) en el mismo crustáceo y bajo las mismas condiciones de ayuno, estadio de desarrollo y estadio de muda, ya que son factores que afectan considerablemente la actividad enzimática.

2.8 Potencial de las lipasas en Biotecnología

Las lipasas representan una de las enzimas más versátiles en aplicaciones biotecnológicas y química orgánica. Esto se ve reflejado por la cantidad de artículos sobre lipasas y sus aplicaciones que asciende a más de 1000 referencias. Las razones por las que las lipasas son tan útiles en biotecnología son:

1.-Versatilidad: las lipasas catalizan diferentes reacciones de hidrólisis, en solventes orgánicos, intercambio de grupos acilo y síntesis, usando una amplia variedad de sustratos naturales y no naturales (Bornscheuer, 2002; Gupta *et al.*, 2004).

2.-Especificidad y selectividad: algunas de las enzimas lipolíticas muestran una alta especificidad, quimo-, regio- y estero-selectividad por sustratos (Gunstone, 1999; Jaeger *et al.*, 2002).

3.-Ausencia de subproductos: muchas de las lipasas no producen reacciones laterales (Jaeger y Eggert, 2002).

4.-Estabilidad: las lipasas son activas y estables en solventes orgánicos, y actúan un amplio rango de pH y temperatura (Schmidt-Dannert, 1999; Gupta *et al.*, 2004).

5.-Disponibilidad: las lipasas se originan bacteriano están disponibles en grandes cantidad por procesos de fermentación (Schmidt-Dannert, 1999; Gupta *et al.*, 2004).

6.-Cofactores: Muchas lipasas no requieren cofactores para la catálisis (Gupta *et al.*, 2004).

Algunas de las aplicaciones más comunes de las lipasas se resumen a continuación:

1.-Industria alimentaria: las lipasas son usadas, con otras enzimas durante la elaboración de pan, queso y otros alimentos para propiciar ciertas propiedades reológicas, o bien producir aromas o emulgentes. Así mismo, son usadas para producir aromas y modificar la composición de AG por inter- o transesterificación, para obtener AG con valor nutricional, o para mejorar su digestibilidad (Gunstone, 1999; Reetz, 2002).

2.-Química orgánica: Las lipasas se usan en la química orgánica, siendo esta una de sus principales aplicaciones después de la industria alimentaria. Ellas son usadas para producir compuestos específicos que no pueden ser sintetizados químicamente, o bien, cuando la elaboración de productos químicos es difícil o costosa. Por ejemplo, son empleadas en farmacéutica e industria agroquímica para la modificación o síntesis de antibióticos, compuestos anti-inflamatorios, pesticidas, etc. (Gunstone, 1999; Pandey *et al.*, 1999; Reetz, 2002).

3.- Detergentes: Una aplicación importante de las lipasas resistentes a altas temperaturas, proteólisis y desnaturalización por surfactantes, es su uso en la formulación de detergentes para la remoción de lípidos. También son empleados en la síntesis de surfactantes como jabones, shampoo y productos de limpieza (Schmidt *et al.*, 1998; Pandey *et al.*, 1999).

4.-Industria papelera: Las enzimas lipolíticas son empleadas para remover la fracción lipídica de la madera que interfiere durante la elaboración de la pulpa del papel (Pandey *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2001).

5.-Manejo de compuestos tóxicos: las lipasas pueden ser usadas en el manejo de aguas residuales producidas durante el procesamiento de alimentos, y el tratamiento de lodos activados. También son útiles en el tratamiento de biopelículas, contaminantes de suelos, etc. (Pandey *et al.*, 1999).

6.-Otras aplicaciones: Las lipasas pueden usarse en sinergia con celulasas, pectinasas y proteasas en la elaboración y blanqueado de fibras de algodón (Li y Hardin, 1997). Estas enzimas también son empleadas como biosensores, en la producción de biodiesel, en la síntesis de biopolímeros, lubricantes o cosméticos (Schmidt *et al.*, 1998; Schmidt-Dennert, 1999; Pandey *et al.*, 1999; Reetz, 2002).

III. HIPÓTESIS

La actividad de la enzima lipasa en la glándula digestiva del camarón blanco, *Penaeus vannamei*, es modulada en respuesta al tiempo de ayuno, dado que las grasas neutras son empleadas como fuente de energía.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del ayuno y realimentación sobre la actividad de lipasa de *Penaeus vannamei*.

4.2 Objetivos Específicos

- a.** Evaluar el efecto del ayuno sobre el índice hepatosomático.
- b.** Evaluar el efecto del ayuno sobre el contenido de proteína de la glándula digestiva de camarón blanco.
- c.** Determinar el efecto del ayuno sobre la actividad de lipasa digestiva de camarón blanco.
- d.** Determinar si la actividad de lipasa presente en la glándula digestiva del camarón corresponde a una “lipasa verdadera”.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Muestras biológicas y aclimatación

Se aclimataron 350 juveniles de *P. vannamei* con un peso promedio de 23.0 g (\pm 1.0 g), proporcionados por el CIBNOR, durante 7 días, divididos en 2 tinas de 800 L. Los organismos se mantuvieron en agua de mar natural filtrada, una temperatura de 28°C, salinidad de 34 ppm, y concentración de oxígeno disuelto de 7.4 mg/ml y recambio de agua del 70% una vez al día. Durante este periodo se les proporcionó alimento PIASA 35% (el 3% de su peso), dos veces al día. Los restos del alimento y las excretas se retiraron por sifoneo.

5.2 Experimentación ayuno-muda.

Después de la aclimatación, los organismos se sometieron al siguiente tratamiento: los camarones del grupo control (C1, C2 y C3) fueron muertos, 2 h después de alimentarse. Al igual que los organismos bajo tratamiento 1 (A1, A2 y A3), los cuales estuvieron en ayuno, y posteriormente muertos a las 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h. Un subgrupo de 15 organismos del grupo ayunado se extrajo (R1, R2 y R3) y se realimentó a las 96 h de ayuno con el 3% de su peso con el alimento antes mencionado, éstos fueron muertos a las 120 h. Durante este bioensayo las condiciones fueron idénticas a las del proceso de aclimatación. De cada tratamiento se colectaron tres organismos, por réplica, en el estadio de muda C. La identificación del estadio de muda se realizó revisando en el microscopio las características de las setas y epidermis de los urópodos con base a la metodología propuesta por [Chan et al., 1988](#).

Al finalizar el periodo de mantenimiento y ya identificado el estadio de muda, se procedió a la recuperación de la glándula digestiva, los organismos fueron muertos por decapitación, las muestras fueron colocadas en microtubos de 2 ml y se mantuvieron en hielo.

5.3 Evaluación de la actividad enzimática

Las glándulas digestivas se homogenizaron individualmente con tres volúmenes de buffer (TRIS•HCl, 50 mM, pH 8.0). El material homogenizado se centrifugó (10,000 g, 5°C, 30 min). El sobrenadante acuoso se usó como extracto enzimático, una vez obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso. El contenido total de proteína de cada extracto enzimático se evaluó usando el método descrito por [Bradford \(1976\)](#). Seroalbúmina se empleó como proteína estándar.

5.3.1 Actividad de lipasa

La actividad de lipasa se evaluó de acuerdo a la técnica descrita por [Versaw et al., 1989](#), empleando β -naftilcaprilato como sustrato. La mezcla de reacción contiene: 30 μ l de 100 mM de taurocolato de sodio (SIGMA); 570 μ l de TRIS•HCl 50 mM, pH 8.0; 6 μ l de extracto enzimático y 6 μ l de 200 mM de β -naftilcaprilato (disuelto en dimetil sulfóxido [DMSO], SIGMA). La mezcla se incubó a 25°C por 30 min, posteriormente se adicionaron 6 μ l de 100 mM de Fast Blue BB (disuelto en DMSO, SIGMA). La concentración final del sustrato es de 2 mM en 1% de solvente. La reacción se detuvo con 60 μ l de 0.72 N de ácido tricloroacético y finalmente el volumen se ajustó a 1.5 ml con

1:1 v/v de etilacetato/etanol (SIGMA); 300 μ l del producto coloreado se leyó a una longitud de onda de 540 nm en un lector de microplaca Versamax (Molecular Devices). La actividad de la enzima lipasa se expresó como Unidad de actividad por mg de proteína (Una unidad de lipasa es la cantidad de enzima requerida para incrementar la absorbancia 0.01 unidades a 540 nm). Cada ensayo incluye blanco. Se utilizó una lipasa pancreática porcina comercial (1 mg/ml, SIGMA) como control positivo.

Para determinar si la lipasa es verdadera, se llevó a cabo la técnica descrita por [Mining et al., 1998](#), la cual emplea tributirina (C4:0, SIGMA) como sustrato. Tributirina (20 mM) fue emulsificado en agua destilada conteniendo 0.5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (w/v) y 2% (w/v) de goma arábica como estabilizante usando un homogenizador (licuadora casera) por 7 min a velocidad máxima. El sustrato (10 ml) fue calentado a 30°C y se ajustó a un pH de 8.0, después se adicionaron 30 mUA. La actividad enzimática se evaluó con un pH-stat (Metrohm, 718 STAT Titrino). Los ácidos grasos liberados se titularon automáticamente con 0.01 N NaOH para mantener el pH constante a 8.0.

La actividad de lipasa se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$U/L = (T/t_T - B/t_B) \times 0.01 \times 10^4$$

Donde U es definida como los micromoles de ácidos grasos formados por minuto; T y B representan el volumen de 0.01 N NaOH (μ l), usados para titular el ensayo y el blanco, respectivamente; t_T y t_B indican el tiempo de reacción (min), para el ensayo y para el blanco, respectivamente; y 10^4 convierte los 100 μ l de muestra a litros.

5.3.2 Electroforesis

La composición de proteínas de los extractos enzimáticos se evaluó por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) de acuerdo a [Laemmli, 1970](#). La preparación enzimática, 0.02 mg de proteína de cada extracto individual (un volumen de muestra con un volumen de buffer de carga) se cargaron por carril, a una temperatura controlada de 4°C en un equipo de electroforesis (Hoefer, modelo SE 245). Los marcadores de peso molecular (4 µl) se incluyeron en cada corrida. La electroforesis se llevó a cabo a 15 mA por gel. Después la proteína de los geles se tiñó con una solución conteniendo 40% de etanol, 10% de ácido acético y 0.1% de azul brillante de Coomassie R-250 (SIGMA). Después de 24 h de teñido, los geles se destiñeron con la misma solución sin el colorante.

Con la finalidad de asignar actividad de lipasa a las bandas encontradas por electroforesis de proteína, se cargó una alícuota de cada muestra conteniendo 10 mU de actividad en un gel de poliacrilamida (12%). Después de la separación de las proteínas en el gel, éste se sumergió en una solución A conteniendo: 10 mg de α -naftil acetato (SIGMA), 2.5 ml de acetona (SIGMA), 25 ml de TRIS•HCl 50 mM pH 8.0 y se incubó por 10 min, el gel fue lavado con agua destilada y se sumergió en una solución B conteniendo: 25 mg de Fast Red (SIGMA), Tritón 0.1% y 25 ml de TRIS•HCl 50 mM pH 8.0. El desarrollo de bandas rojizas indicó la presencia de lipasas esterases en gel. Se empleó como control positivo una lipasa comercial (lipasa pancreática porcina tipo II, SIGMA).

5.3.3 Identificación de lipasas verdaderas

Con la finalidad de identificar las bandas de actividad de lipasas verdaderas en geles de poliacrilamida, se llevó a cabo una segunda electroforesis. Se hizo un extracto enzimático, como se describió anteriormente, de 5 organismos. Una alícuota de 10 μ l (10 μ g de proteína) fue cargada en un gel de poliacrilamida (12%). Después de la separación de las proteínas en el gel, éste se lavó por 30 min en un solución de Tritón X-100[®] (SIGMA) a temperatura ambiente, posteriormente se lavó con buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.0 y finalmente se cubrió el gel con una solución de MUF-oleato (4-metilumbeliferona, SIGMA) 100 μ M (Díaz *et al.*, 1999). Después de 30 min de incubación, las bandas de actividad fueron observadas cuando el gel fue expuesto a 280 nm en un transluminador .

5.4 Análisis estadístico

Se comprobó la normalidad de los valores obtenidos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad por medio de la prueba de Barlett. Luego se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Los cálculos se realizaron utilizando el paquete de Statgraphics versión 5.0.

VI. RESULTADOS

6.1 Efecto del ayuno sobre el índice hepatosomático.

El ayuno afectó la masa corporal significativamente ($p < 0.05$); tabla IV. El peso de la glándula digestiva no fue afectado significativamente a lo largo de 96 h de ayuno, sin embargo se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) a las 120 h, con respecto a los organismos alimentados.

Tabla IV. Efecto del ayuno sobre la masa corporal y la glándula digestiva de *Penaeus vannamei*.

Tiempo de ayuno (h)	Peso del camarón (g)		Peso de la glándula digestiva (g)	
	Control	Ayunados	Control	Ayunados
2	20.7 ± 0.8 <i>a</i>	20.7 ± 0.8 <i>a</i>	1.19 ± 0.2 <i>a</i>	1.19 ± 0.2 <i>a</i>
4	20.9 ± 0.3 <i>a</i>	22.2 ± 0.2 <i>b</i>	1.34 ± 0.3 <i>a</i>	0.56 ± 0.2 <i>b</i>
8	20.7 ± 0.8 <i>a</i>	18.9 ± 0.9 <i>b</i>	1.16 ± 0.2 <i>a</i>	1.19 ± 0.8 <i>a</i>
12	20.9 ± 0.9 <i>a</i>	18.8 ± 1.0 <i>b</i>	1.17 ± 0.2 <i>a</i>	1.14 ± 0.2 <i>a</i>
24	21 ± 1.12 <i>a</i>	17.7 ± 0.3 <i>b</i>	1.31 ± 0.3 <i>a</i>	1.08 ± 0.1 <i>a</i>
48	20.5 ± 1.2 <i>a</i>	17.3 ± 0.3 <i>b</i>	1.23 ± 0.4 <i>a</i>	0.81 ± 0.1 <i>b</i>
72	19.4 ± 1.2 <i>a</i>	17.8 ± 0.3 <i>b</i>	0.9 ± 0.1 <i>b</i>	0.68 ± 0.1 <i>c</i>
96	20 ± 1.1 <i>a</i>	16.6 ± 1.8 <i>b</i>	0.94 ± 0.1 <i>b</i>	0.79 ± 0.2 <i>c</i>
120	20.5 ± 1.0 <i>a</i>	16.8 ± 1.1 <i>b</i>	1.15 ± 0.2 <i>a</i>	0.59 ± 0.1 <i>c</i>
120R	20.5 ± 1.0 <i>a</i>	16.4 ± 1.4 <i>b</i>	1.15 ± 0.2 <i>a</i>	0.59 ± 0.2 <i>c</i>

Cada valor representa la media ± D.S. de triplicados. Las letras itálicas diferentes muestran las diferencias entre los grupos alimentados y los ayunados ($p < 0.05$).

El índice hepatosomático, la relación que existe entre el peso de la glándula digestiva y el peso total del organismo, fue calculado para evaluar el efecto del ayuno sobre la glándula digestiva. Éste valor se obtuvo individualmente para los organismos alimentados (control) y los organismos ayunados. No se encontraron diferencias significativas en los organismos control. Mientras que en los organismos ayunados se observó una diferencia significativa a las 4 h de ayuno, posteriormente se observó un decremento del índice

hepatosomático después de 24 h de ayuno ($p < 0.05$). No se presentaron diferencias significativas cuando los organismos fueron realimentados a las 96 h (Fig. 6).

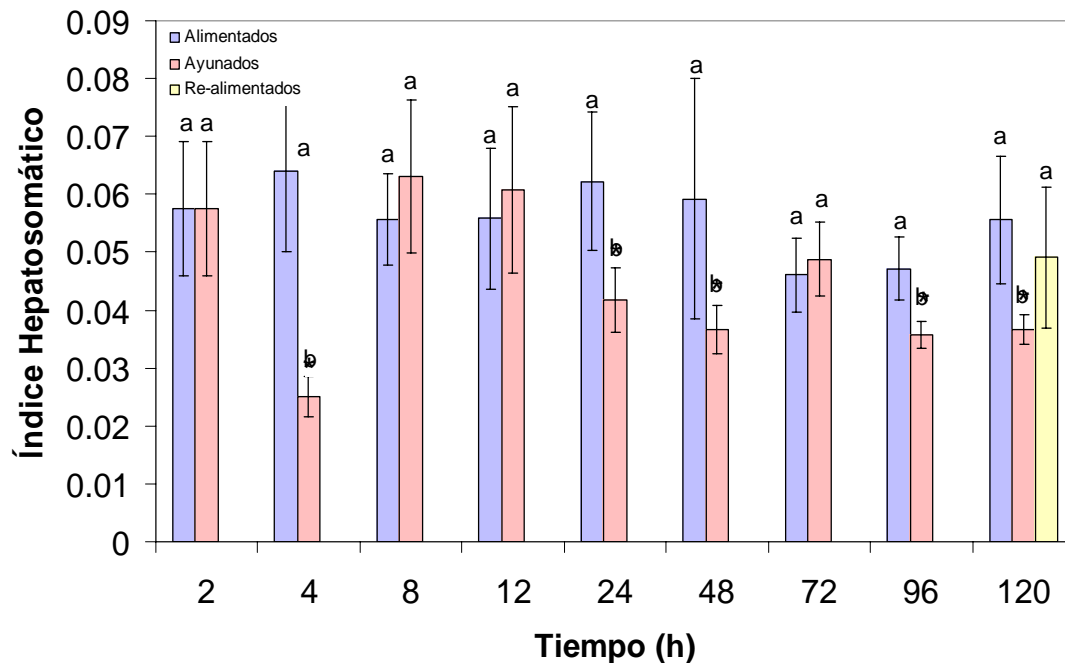


Figura. 6 Cambios en el índice hepatosomático durante condiciones de ayuno en *Penaeus vannamei*. Diferencias significativas fueron observadas entre los grupos ($p < 0.05$). Los valores representan las medias \pm DS del análisis por triplicado, $n=9$. * $p < 0.05$ versus organismos alimentados.

6.2 Efecto del ayuno sobre el contenido de proteína de la glándula digestiva de camarón blanco.

El ayuno demostró ser un importante inductor de respuesta fisiológica en el camarón blanco. El efecto de un periodo de ayuno fue evaluado en organismos experimentales en estadio de intermuda (C), observándose respuestas variadas de acuerdo al tiempo de ayuno. Los datos del contenido de proteína de la glándula digestiva de acuerdo al análisis estadístico realizado arrojaron diferencias significativas por efecto del ayuno en

intermuda (C) ($p < 0.05$). En este estudio, el contenido de proteína decreció después de 72 h de ayuno confirmando las observaciones realizadas por *Cuzon et al. (1980)* y *Barclay et al (1983)* (Fig. 7), este mismo efecto fue observado por *Sánchez-Paz et al. 2006*, en la misma especie cuando los organismos fueron ayunados por 120 h.

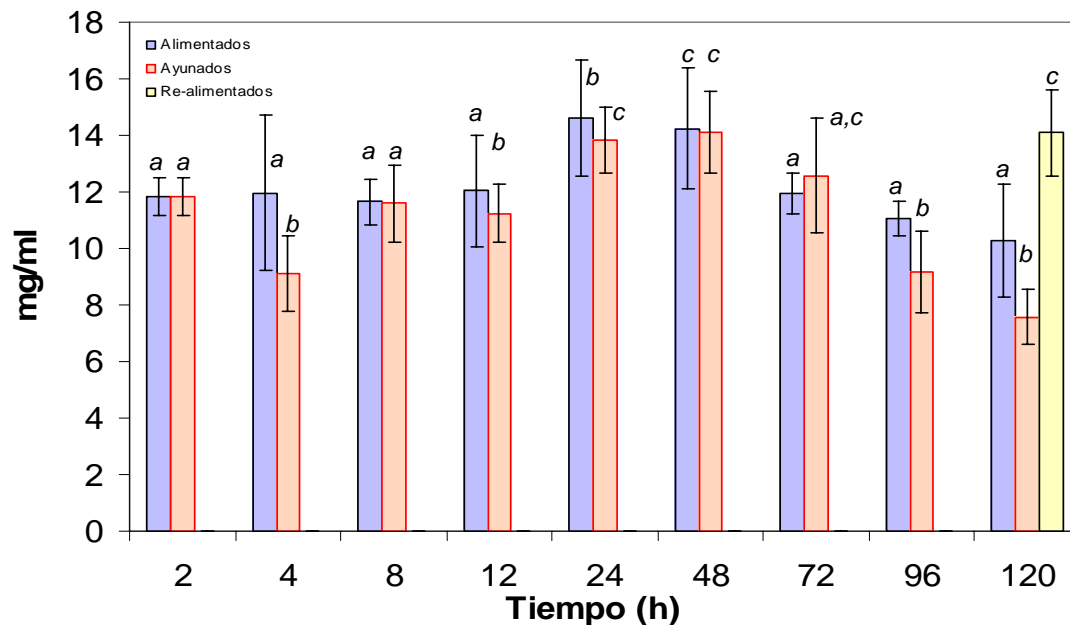


Figura. 7 Proteína soluble en homogenados de glándula digestiva de *P. vannamei* a diferentes tiempos de muestreo. Los valores representan las medias \pm DS. Letras itálicas diferentes muestran diferencias estadísticas por efecto del ayuno ($p < 0.05$). Todos los ensayos fueron por triplicado ($n=9$).

6.3 Efecto del ayuno y realimentación sobre la actividad de lipasa.

Los datos estadísticos de actividad de lipasas de la glándula digestiva empleando β -naftilcaprilato como sustrato mostraron diferencias significativas por efecto del ayuno en intermuda (C) ($p < 0.05$). En este estudio, la actividad de lipasa incrementó conforme aumentó el tiempo de ayuno de los organismos, siendo significativamente mayor desde las 48 h con un máximo a las 120 h. Cuando los organismos fueron realimentados la actividad de lipasa regreso al valor del grupo control, (Fig. 8).

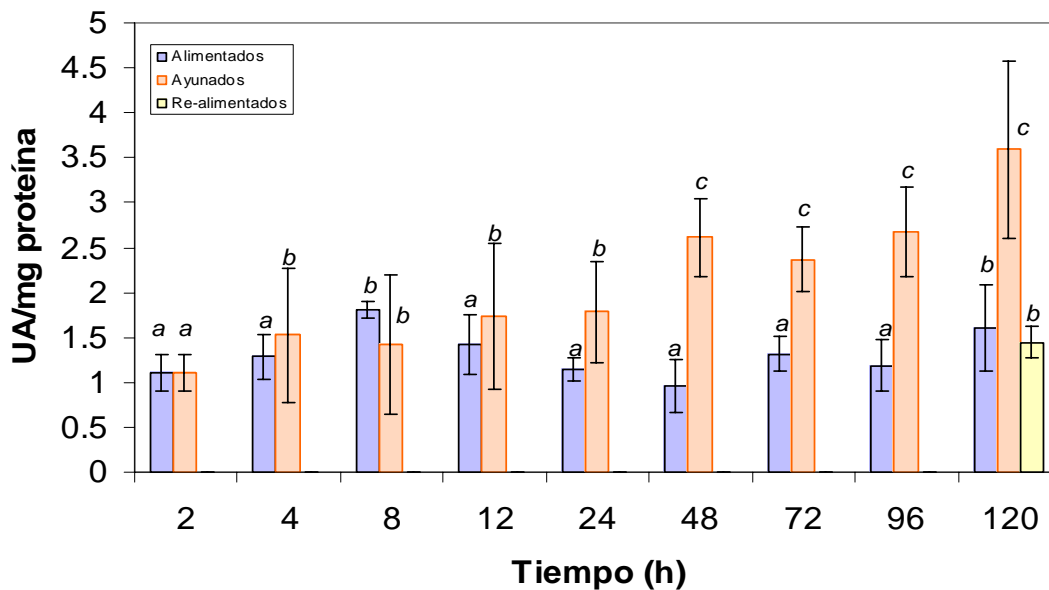


Figura. 8 Efecto del ayuno en la actividad de lipasa en la glándula digestiva de *P. vannamei*. Empleando β -naftilcaprilato como sustrato. Los valores representan las medias \pm DS. Letras itálicas diferentes muestran diferencias estadísticas por efecto del ayuno ($p < 0.05$). Todos los ensayos fueron por triplicado ($n=9$).

6.4 Lipasa verdadera en glándula digestiva del camarón.

Para poder definir la presencia de una lipasa verdadera, el empleo de un triglicérido como sustrato es necesario, por ello, con la finalidad de elucidar la actividad de esta enzima en la glándula digestiva de camarón, se evaluó la actividad de lipasas empleando tributirina como sustrato (Fig. 9). Los resultados generados muestran que los organismos ayunados presentan mayor actividad enzimática, mostrando diferencias significativas a partir de las 4 h de ayuno, siendo las 120 h donde se presentó la mayor actividad ($p < 0.05$).

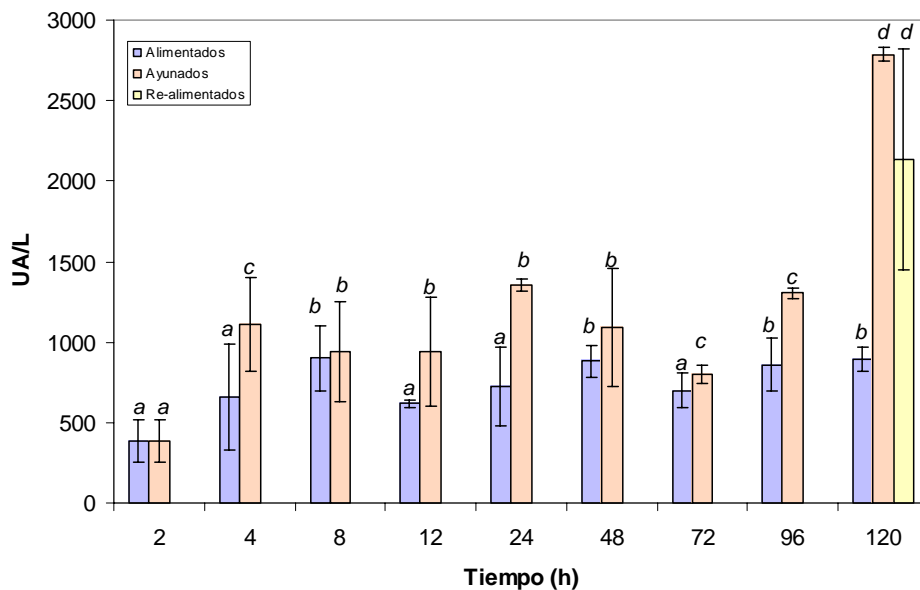


Figure. 9 Efecto del ayuno en la actividad de lipasa en la glándula digestiva de *P. vannamei*. Empleando tributirina como sustrato. Los valores representan las medias \pm DS. Letras itálicas diferentes muestran diferencias estadísticas por efecto del ayuno ($p < 0.05$). Todos los ensayos fueron por triplicado ($n=9$).

6.5 Efecto del ayuno en la composición de proteína

Todas las muestras fueron analizadas individualmente mediante electroforesis de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). Se observaron algunas diferencias entre organismos ayunados y alimentados (Fig. 10a, b), el patrón de proteína de los organismos ayunado de las 4 a las 24 h presenta diferencia con respecto a los organismos alimentados, basado en la intensidad de las bandas.

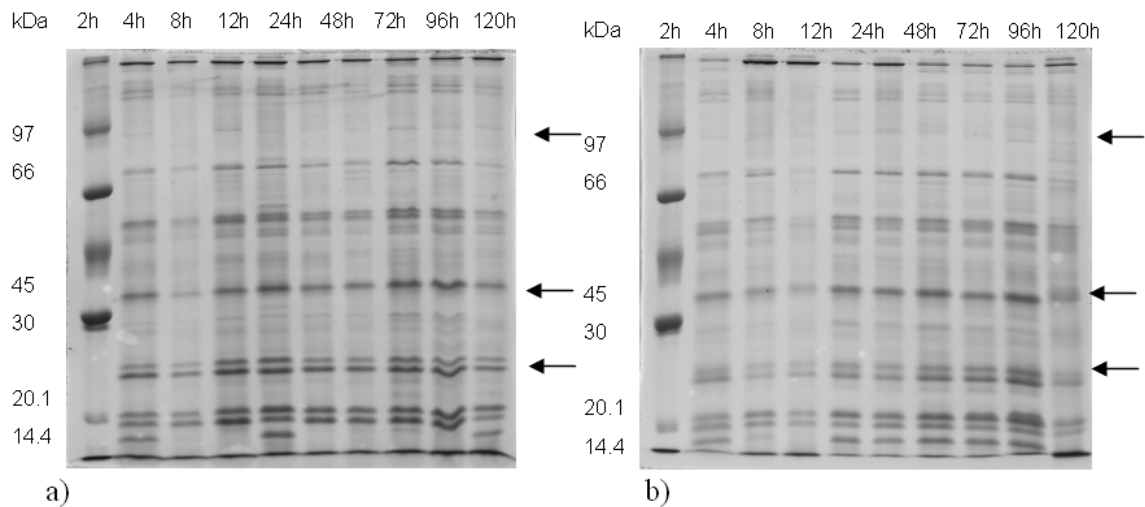


Figura. 10. Efecto del ayuno en la composición de proteína por medio de SDS-PAGE, 12%. a) organismos control, b) organismo ayunados.

6.6 Zimogramas de lipasas

Muestras individuales de organismos alimentados y ayunados fueron analizadas por electroforesis. Algunas diferencias fueron observadas entre organismos, pero un patrón común en el número de posibles lipasas fue encontrado (Fig. 11a, b), empleando α -naftil acetato como sustrato. Las preparaciones enzimáticas fueron desarrolladas individualmente para encontrar posibles diferencias entre organismos a lo largo del periodo de ayuno, con respecto a los organismos alimentados, se corrieron 10 mUA de cada extracto. Se observaron cambios en el número de bandas en los diferentes tiempos de ayuno.

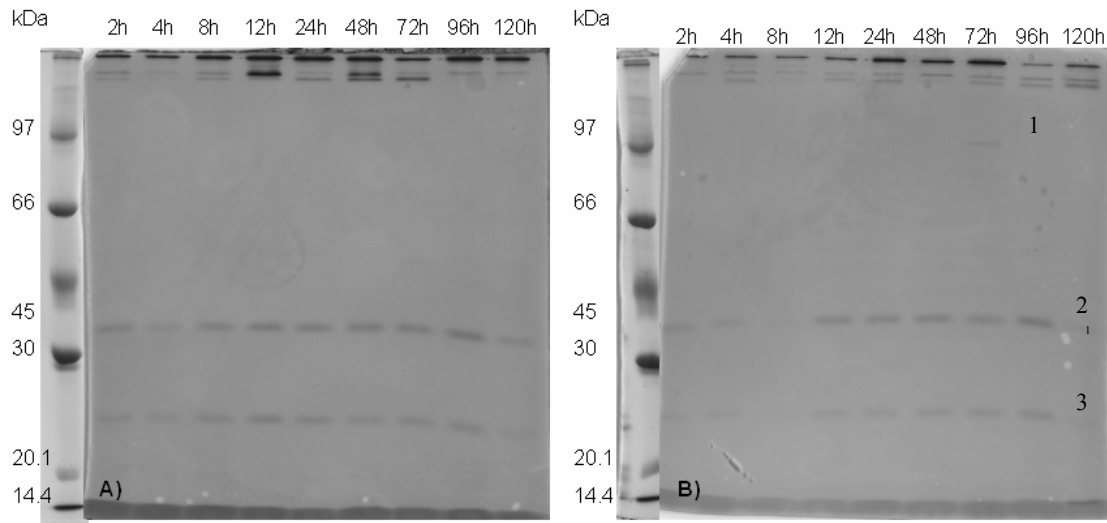


Figura 11. Zimograma (SDS-PAGE, 12%) de extractos de la glándula digestiva de *P. vannamei*, 10mU de actividad fueron corridas por muestra. a) organismos control, b) organismo ayunados.

Cuando se llevaron a cabo los zimogramas empleando naftilacetato como sustrato, se observaron 6 bandas, donde el peso molecular relativo de las bandas 1, 2 y 3 de la figura 11, es aproximadamente de 150, 36.5 y 24.1 kDa respectivamente, éstas fueron calculadas con base a la movilidad de las proteínas (Rf), sin embargo dado que este sustrato puede ser hidrolizado por esterasas, se llevó a cabo una electroforesis empleando un extracto enzimático de un *pool* de organismos (alimentados), este gel se dividió en tres partes, una parte fue teñida para proteína, otra empleando naftil-acetato como sustrato y la tercera parte del gel, empleando MUF-oleato como sustrato (Fig. 12).

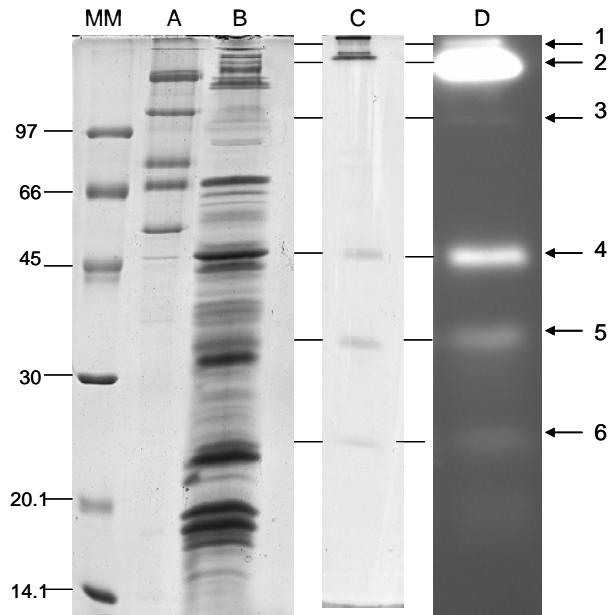


Figura. 12. Zimograma (SDS-PAGE, 12%) de extractos de la glándula digestiva de *P. vannamei*. A) Marcador de alto peso molecular, B) Perfil de proteína del extracto crudo, Gel de actividad C) Esterasa-lipasa empleando naftil-acetato y D) Lipasa verdadera empleando MUF-oleato como sustrato.

Se identificaron 6 bandas de actividad de lipasas verdadera empleando MUF-oleato, 5 de éstas bandas fueron observadas cuando se empleó naftil-acetato como sustrato, las bandas 1 y 2, presentan un peso molecular superior a 220 kDa, mientras que las bandas numeradas del 3 al 6, presentan una masa molecular relativa de 151.51, 50.57, 36.5, 24.1 kDa, respectivamente.

VII. DISCUSION

Durante el ayuno, la energía es derivada de almacenes metabólicos (lípidos, proteínas y/o glucógeno). Estas reservas energéticas son almacenadas cuando el alimento está disponible, y son empleadas cuando existe una limitación del alimento. Los periodos de ayuno se presentan en organismos epigeos e hipogeos; estos organismos pueden ajustar su metabolismo a la carencia de alimento, empleando los metabolitos almacenados (Hervant *et al.*, 1999). Este periodo de ayuno esta acompañado con la pérdida de masa, que puede ser reemplazada por agua, para mantener el volumen necesario del cuerpo (delimitado por el exoesqueleto en artrópodos) y la turbidez interna durante el ayuno (Stuck *et al.*, 1996).

Muchos datos se han generado acerca de la influencia del ayuno en crustáceos que conciernen a cambios en la variación de la actividad enzimática durante: la ontogenia (Lovett and Felder, 1990; Besiot *et al.*, 1990; Fang y Lee, 1992; Lemos *et al.*, 1999), maduración (Fernández *et al.*, 1997), ciclos circadianos (Hernández-Cortés *et al.*, 1999) y el ciclo de muda (Fernández-Giménez *et al.*, 2001). Esta variación en la actividad enzimática está relacionada con el empleo de reservas metabólicas durante el ayuno fisiológico, y el orden de su utilización varía con la especie. En algunas especies, los carbohidratos almacenados (principalmente glucógeno) son empleados primero, después los lípidos y finalmente las proteínas (Regnault, 1981; Stuck *et al.*, 1996). En otros organismos, el glucógeno contribuye con poca energía durante el ayuno, es entonces donde el almacén metabólico empleado son los lípidos (Schafer, 1968; Percy, 1993) o proteínas (Barclay *et al.*, 1983), o ambos simultáneamente (Hiller-Adams y Childress, 1983). Por otro lado, se ha observado que otras especies cambian de un metabolito

almacenado a otro con el progreso prolongado de ayuno. Entre los crustáceos, los lípidos neutros (triglicéridos, TAG) son preferencialmente catabolizados durante el ayuno, mientras que los lípidos polares (fosfolípidos y colesterol) son conservados ya que son componentes estructurales de las membranas celulares (Stuck *et al.*, 1996). La estrategia energética particular de cada especie aún no ha sido determinada, pero en un esfuerzo de explicar la adopción de una estrategia energética en particular, se han hecho observaciones taxonómicas, ecológicas y/o geográficas de diferentes organismos. (Percy, 1993).

En crustáceos, la glándula digestiva o hepatopáncreas es considerado como el principal órgano de almacén de lípidos, el cual es análogo del cuerpo graso en insectos y al tejido adiposo en vertebrados (Ando *et al.*, 1977). El peso del organismo y en particular la glándula digestiva se ven reducidos por efecto del ayuno, la proporción del peso de la glándula digestiva en relación al peso corporal se denomina índice hepatosomático. Cuando *P. vannamei* fue sujeto a un periodo de ayuno de 120 h, el índice hepatosomático se vio severamente afectado después de 24 h de ayuno (fig.6), lo cual puede atribuirse al uso y movilización de reservas energéticas. Es importante destacar que después de 4 h de ayuno, se observó una reducción del ~55.7% del índice hepatosomático con una posterior recuperación del ~56%. Cuando el índice hepatosomático fue evaluado por Sánchez-Paz *et al.* (2006) en la misma especie, se observó una reducción del ~35%, pero esta reducción fue observada a las 48 h de ayuno. Este mismo efecto ha sido observado en otras especies como *Penaeus japonicus* (Cuzon *et al.*, 1980) a los 28 días de ayuno y *Metapenaeus ensis* (Cuzon *et al.*, 1980, después de 4 días de ayuno. Este decremento, puede verse influenciado por una movilización de nutrientes y agua, ya que de acuerdo al

trabajo desarrollado por [Hervant et al., \(1999\)](#), el ayuno prolongado propicia un significativo incremento de agua y un decremento en masa seca durante el ayuno, esto fue observado en *Niphargus virei* y *N. rhenorhodanensis*. Aunado a esto, el decremento del índice hepatosomático en organismos ayunados puede ser consecuencia de la actividad catabólica sobre el tipo de componentes metabolizados en crustáceos, mismos que difieren entre especie, periodo de ayuno y hábitos alimenticios ([Leung et al., 1990](#)).

Se han llevado a cabo varios estudios de ayuno bajo diferentes condiciones, en diferentes organismos, lo que hace difícil comparar los patrones metabólicos de estos organismos. New (1976) propuso que la principal fuente de energía en crustáceos era la proteína, sin embargo los estudios realizados en diferentes crustáceos bajo condiciones de ayuno han demostrado que no se presenta el mismo perfil metabólico, crustáceos como *Penaeus japonicus* ([Cuzon et al., 1980](#)), *Penaeus duorarum* ([Schafer, 1968](#)) y *Crangon crangon* ([Cuzon y Ceccaldi, 1973](#)) presentan una preferencia por glucógeno, mientras que *Jasus edwardsii* ([Ritar et al., 2003](#)), *Niphargus virei* ([Hervant et al., 1999](#)) y *Niphargus rhenorhodanensis* ([Hervant et al., 1999](#)), presentan una preferencia por lípidos. En el caso de *P. vannamei*, se observó un decremento de la cantidad de proteína de la glándula digestiva a las 120 h de ayuno (fig. 7), esta disminución se puede asociar a catabolismo de proteínas por acción de enzimas proteolíticas. Este mismo patrón ha sido observado en la misma especie por [Muhlia-Almazán et al. \(2002\)](#).

El metabolismo de lípidos en los crustáceos ocurre de manera similar que el de los mamíferos ([Chang y O'Connor, 1983](#)). Los lípidos presentes en el alimento de los crustáceos son digeridos y absorbidos a través de el tracto digestivo y transportados por las células apropiadas para el almacenamiento o utilización. Los lípidos son movilizados

a la glándula digestiva y de este órgano a la hemolinfa por medio de lipoproteínas que se unen y llevan estas moléculas hidrofóbicas. Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y las lipoproteínas de baja densidad (VHDL) son las principales lipoproteínas encontradas en crustáceos (Yepiz Plascencia *et al.*, 2000; Yepiz Plascencia *et al.*, 2002).

El entendimiento de la regulación del proceso lipolítico es esencial para el entendimiento del metabolismo de los TAG. El mecanismo basal lipolítico y el mecanismo de activación de la lipólisis son un proceso complejo que aún no se ha elucidado (Holm, 1999). La complejidad de la activación lipolítica esta dada por la interacción de una enzima, cuyas propiedades aún no están bien establecidas, esta enzima se denomina lipasa (E.C. 3.1.1.3). La lipasa actúa sobre una estructura lipídica, que forma una gota de aceite, esta estructura esta reconocida como un importante estructura que participa en la homeostasis del metabolismo de lípidos de un organismo (Rajesh *et al.*, 2007).

Se han establecido diferentes métodos para evaluar lipasas (tabla III), sin embargo muchos de éstos métodos no permiten diferenciar entre lipasas verdaderas y esterases, por lo que existe confusión entre autores, sobre la presencia o ausencia de lipasas en invertebrados. Bajo este marco, se evaluó la actividad de lipasa en la glándula digestiva de *P. vannamei* empleando dos métodos, uno espectrofotométrico y otro potenciométrico (pH-stat), utilizando β -naftilcaprilato y tributirina respectivamente, como sustratos. Los organismos alimentados durante las 120 h presentaron una actividad constante de la enzima (fig. 8), sin embargo, los organismos ayunados durante este periodo presentaron un incremento en la actividad enzimática de lipasa, siendo las 120 h donde se registrara la mayor actividad (fig. 8), lo que sugiere que los lípidos son catabolizados para ser empleados como fuente de energía durante largos periodos ayuno, de acuerdo con

Chandumpai *et al.* (1991), donde observaron un decremento en la concentración de TAG. Este decremento en la concentración de lípidos totales también fue observado en *P. vannamei* (Comoglio *et al.*, 2004; Sánchez-Paz *et al.*, 2006) y *J. edwardsii* (Ritar *et al.*, 2003).

Este decremento en la concentración de lípidos totales también fue observado en *P. vannamei* por Comoglio *et al.* (2004); así mismo cuando Sánchez-Paz *et al.* (2006) evaluó los metabolitos en la glándula digestiva de *P. vannamei*, de organismos que fueron sujetos ha ayuno, se observó que los acilglicéridos disminuían, siendo a las 120 h cuando se reflejará la más baja concentración, misma donde se registra la mayor actividad de lipasas en esta misma especie (fig. 8) lo que permite deducir que existe un consumo de ácidos grasos durante el periodo de ayuno, en el cual participan las lipasas de la glándula digestiva.

Se ha demostrado que el ayuno daña las células epiteliales (particularmente las células R y las células F) del tejido de la glándula digestiva (Papathanassiou y King, 1984; Vogt *et al.*, 1985; Icely y Nott, 1992), esto limita la habilidad para producir enzimas y la capacidad digestiva es reducida cuando los organismos se ven expuestos a periodos prolongados de ayuno; por lo que la baja actividad de lipasa registrada durante las primeras 24 h de ayuno, puede ser una estrategia deliberada para conservar lípidos, ya que además de servir como fuente de energía, constituyen parte importante en las estructuras celulares, de esta manera se evita el daño que se genera en el epitelio de la glándula digestiva, siendo entonces las proteínas las que se usen como fuente de energía durante periodos cortos de ayuno.

El periodo de ayuno, es un factor importante a considerar, ya que se ha observado que dependiendo del periodo, la misma especie puede presentar diferente uso de reserva energética, tal es el caso de la langosta *Jasus edwardsii*, la cual al ser sometida a 8 días de ayuno, presenta una preferencia por proteína (Johnston *et al.*, 2004), mientras que al ser sujeta a 11 días de ayuno, su preferencia cambia a lípidos (Ritar *et al.*, 2003), hasta que se recupera del periodo de ayuno.

Los estudios acerca del metabolismo de crustáceos y los mecanismos de regulación que presentan cuando son sujetos a variaciones ambientales contribuyen al entendimiento de la fisiología de estos organismos. Después de periodos de estrés, es importante recuperarse rápidamente y completamente, tal es el caso del estrés nutricional provocado por el ayuno. Esta recuperación corresponde a la restauración de componentes de alta energía, una vez que el alimento esta disponible, tales como: proteínas, lípidos y reservas de glucógeno. Por lo que la re-síntesis y/o acumulación de reservas alimenticias en el organismo reemplazan el exceso de agua almacenado durante el ayuno. Cuando los organismos fueron realimentados, la actividad de lipasa decreció significativamente con respecto a los organismos alimentados, lo que permite sugerir, que una vez que el alimento esta disponible, la principal fuente energética es de origen proteico, de manera que los lípidos se almacenan para actividades que demanden mayor energía.

Con la finalidad de determinar si la actividad registrada por el método espectrofotométrico era de por lipasas verdaderas, se empleó un método potenciométrico (pH stat), el cual es un tipo de autotitulador que se usa para mantener el pH constante durante una reacción, en el cual se involucra la producción o toma de protones por adición de un ácido o una base de una concentración conocida (Brocklehurst, 1998). La

pauta de desarrollo de la actividad de lipasa se detalla en la figura 9. En este caso, la mayor actividad registrada fue a las 120 h de ayuno. Es probable que la actividad de estas enzimas sólo resulta cuantitativamente importante en caso de ser reforzada por la presencia de sustratos adecuados, esto podría ser una de las razones de porque algunos autores registren niveles de actividad bajos o nulos de lipasas en otros crustáceos (Sévilla y Lagarrigue, 1975).

Otro factor importante es el que durante el estadio de intermuda, la concentración de calcio en la glándula digestiva de los crustáceos representa entre 8-10% del contenido total presente en el exoesqueleto (Greenaway, 1985), esto lleva a plantear la posibilidad de que la presencia de calcio favorece la actividad catalítica, posiblemente como resultado de la reducción de las repulsiones electrostáticas entre la enzima y la interfaz lípido-agua (Armand *et al.*, 1992). Se ha establecido que la unión del calcio a sitios específicos pudiera permitir la exposición de determinados residuos claves que controlan el acceso del sustrato al sitio activo (Ahvazi *et al.*, 2002), lo que resulta en una aproximación de la enzima y el sustrato, favoreciendo el proceso catalítico. Aunado a esto, la participación de la taurina como emulsificante, ya que provee las condiciones físicas adecuadas del sustrato, para llevar a cabo la catálisis.

El zimograma del pool de organismos realizado, empleando MUF-oleato como sustrato, permitió identificar 6 lipasas verdaderas (Fig. 12), dos de ellas de peso molecular superior a 200 kDa y 4 bandas de 151.5, 50.5, 36.59 y 24.14 kDa, respectivamente. Cuando las muestras fueron evaluadas individualmente para los diferentes tiempos de ayuno, se observó un patrón de 5 bandas tanto para organismos alimentados como ayunados, de las cuales 4 de ellas corresponden a lipasas verdaderas, sin embargo, el

único tiempo de ayuno donde se observó el desarrollo de un sexta banda, con una masa relativa de 150 kDa, fue a las 72 h de ayuno (Fig. 11), la cual se ha identificado también como lipasa verdadera.

Dada la intensidad de las bandas de mayor peso molecular (>200kDa) en los zimogramas empleando naftilacetato como sustrato (Fig. 11), se puede inferir, que son estas bandas las que tienen una mayor participación en la hidrólisis de triglicéridos. Así mismo, la variabilidad que se observó en el número de bandas entre individuos, pudiera representar fenotipos de lipasas. Si bien, las lipasas verdaderas se caracterizan por ser moléculas de bajo peso molecular en el caso de vertebrados, la identificación de lipasas en otros crustáceos como *Cherax quadricarinatus*, donde se identificaron 4 bandas con actividad lipolítica siendo estas de 43, 46, 63 y 118 kDa (López-López *et al.*, 2003), *Cephaloleia presignis*, una lipasa de 31 kDa (Arreguín-Espinosa *et al.*, 2000), y en escorpión se identificó una lipasa de 50 kDa (Zouari *et al.*, 2005), esta variabilidad da pie a pensar que las lipasas de invertebrados pudieran tener características particulares, que en un momento dado pudieran servir como marcadores moleculares, para identificar especies, para ello es necesario llevar a cabo un estudio más puntual sobre esta enzima.

Por lo anterior se puede concluir que las macromoléculas tienen dos roles en los sistemas vivientes: durante periodos donde el balance energético es positivo, las moléculas participan en el rol estructural y funcional, pero adquieren un valor energético cuando se lleva la degradación de éstas cuando el balance energético es desfavorable (Gudereley *et al.*, 2003). La importancia relativa de estos roles conlleva a una jerarquización en la movilización de reservas energéticas durante el ayuno.

Para poder comprender aún más el papel de las lipasas en la glándula digestiva de estos crustáceos, es necesario llevar a cabo más estudios sobre su expresión y regulación, si bien no hay reportes sobre la expresión de genes de lipasa en crustáceos, recientemente se ha reportado que en larvas de *Drosophila*, la expresión de genes bajo efecto del ayuno, donde se reporta que el ayuno tiene un efecto importante sobre la expresión de lipasa, en este mismo trabajo se identifican 4 genes que codifican para lipasa, dos de estos genes son regulados por el ayuno y los otros dos genes son modulados por la concentración de azúcar (Zinke *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la presencia lipasas verdaderas en la glándula digestiva de *P. vannamei*, así mismo que la actividad de la enzima se ve afectada por el ayuno. Las diferencias en el patrón de bandeo entre los organismos sugiere que existen isoformas de lipasa, así mismo se puede concluir que *P. vannamei* presenta 6 bandas de actividad que corresponden a lipasas verdaderas, enzimas que participan en el catabolismo de TAGs. Por lo que, se puede concluir que los lípidos pueden ser empleados como reserva energética durante periodos prolongados de ayuno; sin embargo debe quedar claro que el uso preferencial de la reserva energética debe ser evaluada para cada especie, ya que no se puede establecer un perfil metabólico estándar. Este trabajo provee información básica sobre la digestión de lípidos en *P. vannamei*; que es la participación de lipasas responsables para esta actividad fisiológica. De esta manera, este estudio provee una plataforma para estudios posteriores en la digestión de lípidos y la regulación de lipasa.

VIII. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio sugieren que el significativo incremento en la actividad de lipasas en los organismos ayunados indica que los lípidos son una fuente importante de energía bajo condiciones de ayuno. La determinación de la actividad de lipasas en la interface lípido-agua es un indicativo de lipasas verdaderas. El patrón de bandeo observado en los organismos es un indicativo de que existen seis lipasas en la glándula digestiva de *P. vannamei*, bandas que pudieran ser isoformas de lipasas. Por lo que la participación de las lipasas presentes en la glándula digestiva de estos organismos, sugiere su participación en la lipólisis.

Aunque es necesario realizar estudios complementarios, la actividad de lipasa detectada en la glándula digestiva de camarón y la expresión cuantitativa del gen o genes de la lipasa puede ser un parámetro importante a considerar para comprender mejor la fisiología de estos organismos, mismos que son ecológica y económicamente importantes dentro de las especies de crustáceos, así mismo, la caracterización de las lipasas presentes en la glándula digestiva, podrían proveer un panorama más amplio sobre las capacidades catalíticas de estas enzimas, que pudiesen aprovecharse biotecnológicamente..

IX. REFERENCIAS

- Ahvazi B., Chul Kim H., Kee Sun-Ho, Nemes Z. and Steinert Peter M., 2002. Three-dimensional structure of the human transglutaminase 3 enzyme: binding of calcium ion changes structure for activation. *The EMBO Journal* 21:2055-2067.
- Al-Mohanna S.Y., Nott J.A., 1989. Functional cytology of the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle. *Mar Biol* 101: 535-544
- Al-Mohanna S.Y., Nott J.A., Lane J.W., 1985. Mitotic E- and secretory F-cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *J Mar Biol Ass UK* 65: 901-910.
- Ando, T., Kanazawa A. and Teshima S., 1977. Variation in the lipids of tissues during the molting cycle of prawn. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish* 43(12):1445-1449.
- Anger, K., 2001. *The Biology of Decapod Crustacean Larvae*. Swets and Zeitlinger, Lisse. 420 pp.
- Anger, K., Storch, V., Anger, V., Capuzzo, J.M. 1985. Effects of starvation on moult cycle and hepatopáncreas of Stage I lobster (*Hommarus americanus*) larvae. *Helgol. Meeresunters.* 39:107-116.
- Armand M., Borel P., Yther P., Dutot G., Melin C., Senft M, 1992. Effect of droplet size, triacylglyceride composition and calcium on the hydrolysis of complex emulsion by pancreatic lipase: An in vitro study. *J. Nutr. Biochem.* 3:333-341.
- Arpingy, J.L. and Jaeger, K.-E. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 343: 177-183.

Arreguin-Espinosa, R., Arreguín B. and González Carolina, 2000. Purification and properties of a lipase from *Cephaloleia presignis* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31: 239-244.

Barclay, M.C., Dall, W., W., Smith, D.M., 1983. Changes in lipid and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn, *Penaeus esculentus* Haswell. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 68:229-244.

Beisson, F., Tiss, A., Riviere, C. and Verger, R., 2000. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 28: 133-153.

Berner, L.D., Hammond, G.E., 1970. Phylogeny of lipase specificity. *Lipids* 6, 558-562

Besiot, M.P., Capuzzo, M.J., 1990. Changes in digestive enzyme activities during early development of the American lobster *Homarus americanus* Mikne Edwaeds, J, *Exp. Biol. Ecol.* 136, 107-122.

Bornscheuer, U.T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbial. Rev.* 26: 73-81.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Brockeroff, H., Hoyle, R.J., Hwang P.C., 1970. Digestive enzyme of the American lobster (*Homarus americanus*). *J. Fish. Res. Bd. Can.* 27, 1357-1370

Brocklehurst K., 1998. *Enzyme Assays: A Practical Approach*. Ed. R. Eisenthal and M.J. Danson.

Carrillo, O. y González, R. 1998. Control de la digestión en camarones. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R.,

(Eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. La Paz, B.C.S.; México.

Ceccaldi, H., 1989. Anatomy and Physiology of digestive tract of Crustacea Decapods reared in aquaculture. AQUACOP IFREMER. Actes de Colloque 9:243-259.

Ceccaldi, H.J. 1997. Anatomy and physiology of the digestive system. En: Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture, 1997 Vol. 6 (ed. By D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. y Akiyama, D.M.). World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. USA. pp 261-291.

Chan, S-M., Rankin, S. M. y Keeley, L. L. 1988. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids and glucose. Biological Bulletin, (175): 185-192

Chandge and Paulraj, 1998. Requirements of linoleic and lionelic acid in the diet of Indian white prawn *Penaeus indicus* (H Milne Edwards), Indian J. Mar. Sci. 27: 402-406.

Chandumpai A., Dall W., Smith D.M., 1991. Lipid-class composition of organs and tissues of the tiger prawns *Penaeus esculentus* during the moulting cycle and during starvation. Mar. Biol. 108:235-245.

Chang, E., O'Connor, J., 1983. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. In: Bliss, D.E. (Ed.), The Biology of Crustacea, vol. 5. Academic Press, New York, pp. 263-287.

Charmantier G., Charmantier M., Voss-Foucart M.F. and Jeuniaux C., 1976. Les acides aminés libres de l'hémolymphe des isopodes marins *Sphaeroma hooken* ; *Sphaeroma serratum* (Flabellifera) et *Idotea balthica* (Valvifera). Arch. Int. Physiol. Biochim. 84:989-996.

- Cherel, Y., Robin, J.P., Heitz A., Calgaray, C., Le Maho, Y., 1992. Relationship between lipid availability and protein utilization during prolonged fasting. *J. Comp. Physiol.* 162B:305-313.
- Chuang J., Lee, M., Jenn, J., 1985. Comparison of digestive enzymes activities of five species of shrimp cultured in Taiwan. *Journal Fisheries Society of Taiwan.* 12:43-53.
- Comoglio, L.I., Gaxiola, G., Roque, A., Cuzon, G., Amin, O., 2004. The effect of starvation on refeeding , digestive enzyme activity, oxygen consumption, and ammonia excretion in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Shellfish Res.* 23, 243-249.
- Coutteau P., Geurden I., Camara M.R., Bergot P. and Sorgeloos P. 1997. Review on the dietary effects of phospholipid in fish and crustacean larviculture, *Aquaculture* 155:149–164.
- Cruz-Suárez, L.E. D., Ricque, V.P. Jiménez. 1994. Utilización de la lecitina en la nutrición acuícola. *Crustáceos*
- Cuzon, G., Cahu, C., Aldrin, J.F., Messenger, J.L., 1980. Starvation effect on metabolism of *Penaeus japonicus*. *Proc. World Maric. Soc.* 11:410-423.
- Cygler, M. and Schrag, J.D. 1997. Structure as a basis for understanding the interfacial properties of lipases. *Methods Enzymol.* 284: 3-27.
- Dall, W., 1992. Feeding, digestion and assimilation in Penaeidae. In: Allan, G., and Dall, W. (eds.). *Proc. Of the Aquaculture Nutrition Workshop. Australia.* 57-63 pp.
- Dall, W. and Moriarty, D.J. 1983. Functional aspects of nutrition and digestion. En: *The Biology of Crustacea.* Mantel, L. H., ed. Academic Press New York. 215- 261.

Dall, W., Hill, P. Rothlisberg, C., Sharples, D., 1990. The biology of the penaeidae. In: Blaxter, J., Southward, A. (Eds.), *Advances in Marine Biology*. Vol. 27. Academic Press., London, 489 p.

Deering, J.M., Hewitt, R.D., 1996. Triacylglycerol digestion by the leather prawn *Penaeus monodon*. *J. World Aquacult. Soc.* 27 (3), 359-361.

Diaz P., Prim N. and Javier Pastor F.I., 1999. Direct fluorescence-based lipase activity assay. *BioTechniques*, 27(4):696-699.

Divakaran, S. y Ostrowski, A. C. 1990. Enzymes present in pancreatic extracts of the dolphinfish *Coryphaena hippurus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 21: 35-40.

Dores, I. y Frimodt, C. 1987. *An illustrated guide to shrimp of the world*. Osprey books. Huntington, NY, USA. 229 pp.

Eisen, A.Z., Jeffrey, J.J., 1969. An extractable collagenase from crustacean hepatopáncreas. *Biochemical et Biophysical Acta*. 191:571-526.

Fang, L. and Lee, B., 1992. Ontogenic change of Digestive Enzyme in te *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 103B (4): 1033-1037.

Fernández, I., Olvia, M., Carrillo, O. and van Wormhoudt, A. 1997. Digestive enzyme activities of *Penaeus notialis* during reproduction and moulting cycle. *Journal of Comparative Biochemistry and Physiology*. 118A: 1267-1271.

Fernández-Giménez, García-Carreño, F.L., Navarrete del Toro, M.A., Fenucci J.L., 2001. Digestive proteinase of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda, Penaeoidea): Partial characterization and relationship with molting. *Comp. Biochem. And Physiol.* 130:331-338.

- Ferrer, M., Cruces, M.A., Plou, F.J., Bernabé, M. and Ballesteros A. 2000. A simple procedure for the regioselective synthesis of fatty acid esters of maltose, leucrose, maltotriose and n-dodecyl maltosides. *Tetrahedron* 56: 4053-4061.
- Fojan, P., Jonson, P.H., Petersen, M.T.N. and Petersen, S.B. 2000. What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie* 82:1033-1041.
- Galgani, F.G., 1985. Regulation de l'activité des proteases digestives de *Penaeus japonicus* Bate en relation avec la temperature. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 94 :11-18.
- Galgani, F. G., 1988. Etude comparative des protease digestives de cinq espèces de crevettes peneidos. *Biochem. Systematics and ecology.* 16(5) : 497-504.
- Gamboa-Delgado, J., Molina-Poveda, C., Cahu, C., 2003. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquacult. Res.* 15, 1403-1411.
- García-Carreño FL. Haard N. 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *Journal of Food Biochemistry.* 17, 97-113.
- Gibson, R. and Barker, P.L., 1979. The decapod hepatopáncreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 17:285-346.
- Glencross and Smith, 1999. The dietary linoleic and oleic fatty acids requirements of the prawn *Penaeus monodon*. *Aquacult. Nutr.* 5:53-63.
- González, R., Fraga, V., Carrillo, O., 1994. Cambios ontogénicos en la actividad de las principales enzimas digestivas *Penaeus schmitti*. *Rev. Invest. Mar.* 15 (3):262-268.

- González-Baró, M.R., Heras, H., Pollero, R.J., 2000. Enzyme activities involved in lipids metabolism during embryonic development of *Macrobrachium borelli*. J. exp. Zool. 286, 231-237.
- González-Félix, A.L. Lawrence, D.M. Gatlin III and M. Pérez-Velázquez, 2002. Growth, survival and fatty acid composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* fed different oils in the presence and absence of phospholipids, Aquaculture 205: 325–343
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J.D., Bouthillier, F., Smith, P., Harrison, D., Rubin, B. and Cygler, M. 1993. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. J. Biol. Chem. 268: 1243-1247
- Gudereley, H., Lapointe D., Bedard, M., Dutil, J.D., 2003. Metabolic priorities during starvation: enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. Comp. Biochem. Physiol. 2A:347-356.
- Guillaume, J., Ceccaldi, J., 2001. Digestive physiology of shrimp. In: Nutrition and feeding of fish and crustaceans. (Eds. By J. Guillaume, S. Kaushik, P. Bergot & R. Métailler), pp. 239-263. Springer-Praxis, Cornwall
- Gunstone, F.D. 1999. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. J. Sci. Food Agric. 79:1535-1549.
- Gupta, R., Gupta, N. and Rathi, P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. Appl Microbiol. Biotechnol. 64:763-781.
- Gutiérrez, A., Del Río, J.C., Martínez, M.J. and Martínez, A.T. 2001. The biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing. Trends. Biotechnol. 19:340-348.

- Guzmán, C., Gaxiola, G., Rosa, C. y Torre-Blanco, A. 2001. The effect of dietary protein and total energy content on digestive enzyme activities, growth and survival of *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus 1767) postlarvae. *Aquaculture Nutrition* 7, 113–122.
- Greenaway P., 1985. Calcium balance and moulting in the Crustacea. *Bio.Rev.* 60:425-454.
- Harrison K.E. 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review, *J. Shellfish Res.* 9:1–28.
- Hernández Cortés, P., Cuadros, W., Navarrete, A., Portillo, G., Colado, G., García-Carreño, F.L., 1999. Rate of ingestión and proteolytic activity in digestive system during continuous feeding of juvenile shrimp. *J. Appl. Aquaculture* 9:35-45
- Hertrampf W.J. 1992. Feeding Aquatic Animals with Phospholipids II. Fishes. Lucas Meyer Publication No. 11, Lucas Meyer GmbH & Co., Hamburg.70pp.
- Hervant, F., Mathieu, J., Barre, H., 1999. Comparative study on the metabolic responses of subterranean and surface-dwelling amphipod crustacean to long term starvation and subsequent refeeding. *J. Exp. Biol.* 202:3587-3695.
- Hiller-Adams, P. and Childress, J.J., 1983. Effect of prolonged starvation on O₂ consumption, NH₄⁺ excretion and chemical composition of bathypelagic mysid *Gnathonphausia ingens*. *Mar Biol.* 77:119-127.
- Holm, C.M., 1999. On the control of lipolysis in adipocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 892:155-168.
- Icely, J.D., Nott, J.A., 1992. Digestion and absorption: digestive system and associated organs. In: Harrison, F.W. (Ed.), *Microscopic Anatomy of the Invertebrates*, vol. 10. In:

Harrison, F.W., Humes, A.G. (Eds.), Decapod Crustacea, Wiley-Liss, New York, pp. 147-201.

Ingo, Zinke, C.S.S.T., Katzenberger J.D., Bauer, M. and Pankratz M.J., 2002. Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. EMBO Journal. 21(22):6161-6173.

Jaeger, K.-E. and Eggert, T. 2004. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. Curr. Opin. Biotechnol. 15:305-313.

Jaeger, K.-E. and Eggert, T. 2002. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:390-397.

Jaeger, K.-E., Dijkstra, B.W. and Hertz, M.T. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three dimensional structures, and biotechnological application of lipases. Annu. Rev. Microbiol. 53: 315-351.

Johnston D.J., Ritar A.J., Thomas C.W. 2004. Digestive enzymes profiles real digestive capacity and potential energy sources in fed and starved spiny lobster (*Jasus edwardsii*) phylosoma larvae. Comparative Biochemistry and Physiology. 138:137-144.

Jones, D.A., A.B. Yule y D.L. Holland. 1997. Larval nutrition pp. 353-389. En: Dámbramo; L.R., Conklin, D.E. y D.M. Akiyama (eds.) Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture Vol. 6. World Aquaculture Society, 587 pp.

Kangayam M.P., Nakazawa H., Furukawa S., Asaoka A., Ishibashi J., Hiromitsu T. and Yamakawa M. 2003. A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. Journal of Virology. 77:10725-10729.

- Khalameyzer, V., Fischer, I., Bornscheuer, U.T. and altenbuchner, J. 1999. Screening, nucleotide sequence, and biochemical characterization of an esterase from *Pseudomonas fluorescens* with high activity towards lactones. Appl. Environ. Microbiol. 65:477-482.
- Kouker, G. and Jaeger, K.-E. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. Appl. Env. Microbiol. 53:211-213.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Lemos, D., P. Hernández Cortés, M.A. Navarrete del Toro, F.L. García Carreño, & V.N. Phan. 1999. Ontogenic variations in digestive proteinase activity of larval and postlarval pink shrimp *Penaeus paulensis*. Marine Biology 135: 653-662.
- Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D., van Wormhoudt, A., 1997. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and alpha-amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 208:107-125.
- Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D. Y Van Wormhoudt, A. 1996. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and alpha-amylase to casein level and protein 44 source in *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 208:107-125.
- Lee, P.G., Smith, L.L. y Lawrence, A.L. 1984. Digestive proteases of *Penaeus vannamei* Boone: relationship between enzyme activity, size and diet. Aquaculture 42, 225-239.
- Lee P.G., Lawrence, A. L. 1985. Effects of diet and size on growth, feed digestibility and digestive enzyme activities of the marine shrimp *Penaeus setiferus* (Linnaeus). Journal of the World Mariculture Society 16:257-287.

Lemos, J., Ezquerra, D. M. y García-Carreño, F.L. 2000. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. *Aquaculture* 186: 89-105.

Lemos, D., Hernández-Cortes, M.O., Navarrete, A., García-Carreño, F.L. Phan V.N., 1999. Ontogenetic variation in digestive proteinase activity of larvae and postlarvae of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). *Mar. Biol.* 135, 653-662.

Leung, K.M., Chen, H.L., Chu, K.H., 1990. Effects of starvation on biochemical composition and digestive enzymes activities in the hepatopáncreas of the shrimp *Metanopenaeus ensis*. In: Hirano, R., Hanyu, I. (Eds.), *The Second Asian Fisheries Froum*. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 991.

Le Boulay, C., Hormhoudt A.V., and Sellos, D., 1996. Cloning and xpression of cathepsin I-like proteinase in the hepatopáncreas of the shrimp *P. vannamei* during the intermolt cycle. *J. Comp. Physiol.* 166:310-318.

Lehninger A. 1979. *Bioquímica*. 2da edición, Ed. Revolucionaria, La Habana.

Li, Y. and Hardin, I.R. 1997. Enzymatic scouring of cotton: effects on structure and properties. *Textile Chemist. Colorist.* 29:71-76.

Loizzi R.F., Peterson D.R., 1971. Lipolytic sites in crayfish hepatopancreas and correlation with the fine structure. *Comp. Biochem. Physiol.* 39B: 227-236.

López-López., Nolasco, H., Vega-Villasante, F., 2003. Characterization of digestive gland esterase-lipase activity of juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 135 B: 337-347.

- Lovett D. L. and Felder D.L. 1990. Ontogenic Change in Digestive Enzyme activity of Larval and Postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Biol. Bull. 178: 144-159.
- Martínez-Córdova, L.R., Villarreal-Colmenares, H. y Cortés-Jacinto, E. 2001. Biología del Camarón. En: Martínez-Córdova, L.R., Camaronicultura., AGT S.A. México, pp.2-3.
- Mining Stefan, Schmidt-Dannert Claudia, Schmid Rolf D., 1998. Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high level production and some properties. Journal of Biotechnology 66:147-156.
- Moss, S.M., Divakaran, S., Kim, B.K., 2001 Stimulating effects of the pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Bonne). Aquacult. Res. 32, 125-131.
- Muhlia-Almazán, A., García-Carreño, F.L., 2002. Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp (*Penaeus vannamei*). Comp. Biochem. Physiol. 133B, 383–394
- Muralidhar, R.V., Chirumamilla, R.R., Marchant, R., Ramachandran, V.N., Ward, O.P. and Nigam, P. 2002. Understanding lipase stereoselectivity. World J. Microbial Biotechnol. 18:81-97.
- New, M.B., 1976. A review of dietary studies with shrimp and prawns. Aquaculture 9:101-144.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J. and Sussman, J. 1992. The α/β hydrolase fold. Protein Eng. 5: 197-211.

- Omondi, G., and Stark, J., 1995. Some digestive carbohydrases from the midgut of *Penaeus indicus* and *Penaeus vannamei* Decapoda:Penaeidae. *Aquaculture*. 134:121-135.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigman, P., Krieger, N. and Soccol, V.T. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29:119-131.
- Papathanassiou, E., King, P.E., 1984. Effects of starvation on the fine structure of the hepatopáncreas in the common prawn *Palaemon serratus* (Pennant). *Comp. Biochem. Physiol., A* 77:243-249.
- Pencreac'h, G., Graille, J., Pina, M. and Verger, R. 2002. An ultraviolet spectrophotometric assay for measuring lipase activity using long-chain triacylglycerol from *Aleurites fordii*. *Anal. Biochem.* 303:17-23.
- Percy, J.A. 1993. Energy consumption and metabolism during starvation in the Arctic hyperiid amphipod *Themisto libellula* Mandt. *Polar Biol.* 13:549-555.
- Rajesh T. P., Soulages J. L., Hariharasundaram B., Arrese E.L., 2005. Activation of the lipid droplet controls the rate of lipolysis of triglycerides in the insect fat body. *The Journal of Biological Chemistry* 280(24):22624-22631.
- Reetz, M. 2002. Lipases as practical biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6:145-150.
- Regnault M., 1981. Respiration and ammonia excretion of the shrimp *Crangon crangon*: metabolic response to prolonged starvation. *J. Comp. Physiol.* 141:549-555.
- Resch-Sedlmeier, Gand Sedlmeier, D. 1999. Release of digestive from the crustacean hepatopáncreas: effect of vertebrate gastrointestinal hormones. *Comparative Biochemical and Physiology*, 123B:187-192.

Ritar A.J., Dunstan G.A., Crear B.J. and Brown M.R. 2003. Biochemical composition during growth and starvation of early larval stages of cultured spiny lobster (*Jasus edwardsii*) phyllosoma, *Comp. Biochem. Physiol.* 136: 353–370

Romo-Figueroa, M.G., Vargas-Requena, C., Sotelo-Mundo, R.R., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I., Sördehäll, K., Yepiz-Plascencia, G. 2004. Molecular cloning of a β -glucan pattern-recognition lipoprotein from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: correlations between the deduced amino acid sequence and the native protein structure, *Development Comparative Immunology* 28:713-726.

Rosas, C., Bolognaro-Crevenna, A., Sánchez, A., Gaxiola, G., Soto, L., Escobar, E., 1995. Role of digestive gland in the energetic metabolism of *Penaeus setiferus*. *Biol. Bull.* 189:168-174.

Roussel, A., Canaan S., Egloff M.-P., Rivière M., Dupuis L., Verger R. and Cambillau C. 1999. Crystal Structure of Human Gastric Lipase and Model of Lysosomal Acid Lipase, Two Lipolytic Enzymes of Medical Interest. *J. Biological Chem.* 274:16995-17002.

Samad, M.Y.A., Razak, C.N.A., Salleh, A.B., Zin Wan Yunus, W.M., Ampon, K. and Basri, M. 1989. A plate assay for primary lipase activity. *J. Microbiol. Methods* 9: 51-54.

Sánchez-Paz, A., García-Carreño F., Muhlia-Almazán A., Peregrino-Uriarte A. B., Hernández-López J., Yepiz-Plascencia G. 2006. Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: Status and future directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 241-249.

Sánchez-Paz, A., García-Carreño F., Muhlia-Almazán A., Hernández-Saavedra N. Y., Yepiz-Plascencia G., 2003. Differential expression of trypsin mRNA in the white shrimp

(*Penaeus vannamei*) midgut gland under starvation conditions. Journal of Experimental and Ecology 292. 1 – 17 pp.

Sarda, L. and Desnuelle, P. 1958. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. Biochim. Biophys. Acta 30: 513-521.

Schafer, H.J., 1968. Storage material utilized by starved pink shrimp, *Penaeus duorarum* Burkenroad. PAO Fish Rep. 57(2):393-403.

Schmid-Dannert, C. 1999. Recombinant microbial lipases for biotechnological application. Bioorg. Med. Chem. 7:2123-2130.

Schmid, R. and Verger, R. 1998. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. Angew. Chem. Int. ed. 37:1608-1633.

Schrag, J.D., Cygler, M. 1997. Lipases and α/β hydrolase fold. Methods Enzymol. 284: 85-107.

Sévilla and Lagarrigue, 1975. Physiologie des Invertébrés Etude comparée des zymogrammes du tube digestif chez Isopodes (Crustacés, Péricarides). C.R. Acad. Sci. Paris, t. 281:715-718.

Sheen, S.S., Chen S.J. and Huang Y.S., 1994. Effect of dietary lipid levels on the growth response of tiger prawn, *Penaeus monodon*. J. Fish. Soc. Taiwan. 21(2): 205-213.

Shiau, S.Y., 1998. Nutrient requirement of penaeid shrimp. Aquaculture. 164:77-93.

Stuck K.C., Stuck L.M., Overstreet R.M., Y. W. S. 1996. Relationship between BP (*Baculovirus penaeid*) and energy reserves in larval and postlarval Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. Disease of Aquatic Organism. 24: 191-198.

Titball, R.W. 1998. Bacterial phospholipases. Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol 27:127S-137S.

- Tsai, I.H., Chuang, K.L., Chuang, J.L., 1986. Chymotrypsins in digestive tracts of crustaceans decapods (shrimps). *Comp. Biochem. Physiol.* 85, 235-240.
- Unzueta-Bustamante, M. L., 2002. Avances en el diagnóstico, manejo y prevención de enfermedades. En: Martínez-Córdova, L.R., Camaronicultura Avances y Tendencias, AGT Editor, S.A., México. Cap 6, pp.137-138.
- van Wormhoudt, A., Le Moullac, G., Klein, B. y Sellos, D. 1996. Caracterización de las tripsinas y amilasas de *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Adaptación a la composición del régimen alimenticio. En: Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del III Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. UANL. Monterrey, NL, México. 673 pp.
- van Wormhoudt, A., D. Sellos, A. Donval, S. Plaire Goux y G. Le Moullac. 1995. Chymotrypsin gene expression during the intermolt cycle in the shrimp *Penaeus vannamei*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 51: 159-163.
- Verger, R. 1980. Enzyme kinetics of lipolysis. *Methods Enzymol.* 64:340-392
- Verger, R. 1997. Interfacial activation of lipases: Facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* 15:32-38.
- Versaw, W. K., S.L. Cuppett, D. D. Winter and L.E. Williams. 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J. Food Sci.* 54: 1557-1558.
- Vogt, G., Storch, V., Quintio, E. T., Pascual, F.P., 1985. Midgut gland as a monitor organ for the nutritional value of diets in *Penaeus monodon* (Decapoda). *Aquaculture* 48:1-12.
- Wahler, D. and Reymond, J.L. 2001. Novel methods for biocatalyst screening. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5:152-158.

- Walde P. and Luisi P.L. 1989. A continuous assay for lipases in reverse micelles based on fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 28: 3353-3360.
- Xu X., Wenjuan J., Castell J.D. and O'Dor R. 1994 Essential fatty acid requirement of the Chinese prawn, *Penaeus chinensis*, *Aquaculture* 127: 29-40.
- Yepiz-Plascencia, G., Jiménez-Vega, F., Romo-Figueroa, M.G., Sotelo-Mundo, R.R., Vargas-Albores, F., 2002. Molecular characterization of the bifunctional VHDL-CP from the haemolymph of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol.* 132B: 585-592.
- Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I., 2000. Penaeid shrimp hemolymph lipoproteins. *Aquaculture* 191:177-189.
- Zinke Ingo, Schutz Christina S., Katzenberger Jorg D., Bauer Matthias and Pankratz Michael J., 2002. Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *The EMBO Journal*. 21: 6162-6173.
- Zouari N., Miled N., Cherif S., Mejdoub H., Gargouri Y. 2005. Purification and characterization of a novel lipase from the digestive glands of a primitive animal: The scorpion. *Biochimica et Biophysica Acta* 1726: 67-74.