

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**CARACTERIZACIÓN COMPARATIVA DE LIPASAS EN ATÚN ALETA AZUL DEL
PACÍFICO (*Thunnus orientalis*), TOTOABA (*Totoaba macdonaldi*) Y LOBINA
RAYADA (*Morone chrysops X M. saxatilis*)**

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

Oc. Servando Rueda López

Ensenada, Baja California, México, Mayo del 2013

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN COMPARATIVA DE LIPASAS EN ATÚN ALETA
AZUL DEL PACÍFICO (*Thunnus orientalis*), TOTOABA (*Totoaba
macdonaldi*) Y LOBINA RAYADA (*Morone chrysops* X *M. saxatilis*)**

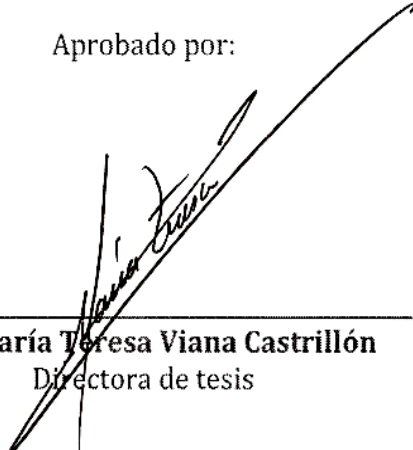
TESIS
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA


PRESENTA

SERVANDO RUEDA LÓPEZ

Aprobado por:



Dra. María Teresa Viana Castrillón
Directora de tesis



Dr. Eduardo Durazo Beltrán
Sinodal

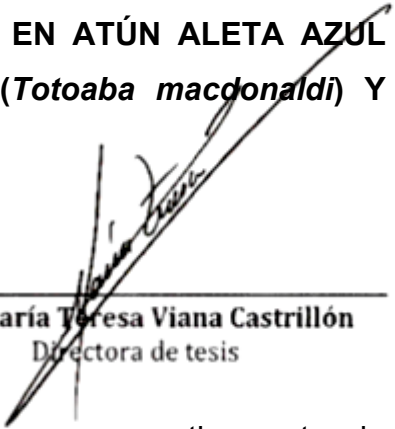


Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Sinodal

RESUMEN de tesis que presenta **SERVANDO RUEDA LÓPEZ** como requisito para obtener el grado de Maestro en Ciencias en **ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**. Ensenada, Baja California, México. Mayo 2013

CARACTERIZACIÓN COMPARATIVA DE LIPASAS EN ATÚN ALETA AZUL DEL PACÍFICO (*Thunnus orientalis*), TOTOABA (*Totoaba macdonaldi*) Y LOBINA RAYADA (*Morone chrysops* X *M. saxatilis*)

Resumen aprobado por:



Dra. María Teresa Viana Castrillón
Directora de tesis

El presente estudio tuvo como finalidad evaluar comparativamente la caracterización bioquímica de lipasas de peces carnívoros con diferentes requerimientos en el contenido de lípidos en su dieta. A partir de extractos crudos de páncreas de atún aleta azul del Pacífico (AAA), totoaba (TM) y lobina rayada (LR), se estimó el intervalo de actividad bajo distintas condiciones utilizando el 4-nitrofenil caproato como sustrato. Las temperaturas de actividad máxima se dieron a 45° C para TM, 40° C para AAA y 35° C para LR mientras que la actividad más alta se dio a pH de 8.0 para las tres especies. También se estudió el efecto de las sales biliares sobre la actividad enzimática y se determinó que la presencia de taurocolato de sodio en la solución de reacción aumenta la actividad enzimática en AAA y TM pero no así para LR. Así mismo, en LR, la sal de cloruro de sodio incrementa su actividad enzimática y no así en las otras especies. La presencia de calcio no mostró, en ningún caso, incremento de actividad enzimática, característica distinta a lo reportado en investigaciones con lipasas de mamíferos como el cerdo y la rata. Por último se purificó parcialmente (1687.3 %) la lipasa pancreática del AAA y se determinó un peso molecular aproximado de 24 kDa y un punto isoeléctrico de 8.15.

THESIS ABSTRACT presented by **SERVANDO RUEDA LÓPEZ** as a requisite to obtain the graduate degree: Master in Science on **MOLECULAR ECOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**. Ensenada, Baja California, México. Mayo 2013

COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF LIPASES IN BLUEFIN TUNA OF THE PACIFIC (*Thunnus orientalis*), TOTOABA (*Totoaba macdonaldi*) and STRIPED BASS (*Morone chrysops X M. saxatilis*)

The objective of this study was to evaluate the biochemical characterization of lipases from carnivorous fish that have different requirement of lipid levels in their diets. The present research was conducted from pancreas crude extracts of bluefin tuna from the Pacific (AAA), totoaba (TM) and striped bass (LR), the enzyme essays were carried using 4-nitrophenyl caproate as the substrate, and the results of optimum temperature were 45° C for TM, 40° C for AAA y 35° C for LR. Lipases from the three species showed their optimum pH at 8.0. Effect of bile salts were also evaluated and shown that taurocholic acid sodium salt had a direct positive effect on lipase essays of AAA and TM, increasing their enzymatic activity. However sodium chloride only in LR have shown to increase the enzyme activity in lipase assays. The presence of calcium chloride on lipase enzyme essays did not show increment of enzyme activity in any of the three species evaluated as it have been reported for pigs and rats. AAA pancreatic lipase was partially purified (1687.3 %) and an apparent molecular mass of approx. 24 kDa by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and an isoelectric point of 8.15 in polyacrylamide gel electrophoresis were determined.

Dedicatoria

Este trabajo esta dedicado a ti madre que siempre has estado ahí para mí y me has enseñado que nunca es tarde para mejorar

A mis hermanos Karen y Francisco siempre apoyándome en todo con su amor y cariño

A mi alma gemela Romina mi amor incondicional

Agradecimientos

Gracias a Dios por ser mi principal guía

Gracias a CONACyT por otorgarme una beca para llevar a cabo mis estudios de maestría

A la Dra. María Teresa Viana por creer en mí todos estos años antes y durante la maestría

A mis sinodales Dr. Eduardo Durazo Beltrán y al Dr. Juan Pablo Lazo Corvera por todos sus aportes para mejorar este trabajo

Al Doctor Juan Gabriel Correa Reyes por toda su ayuda moral y profesional

Especial agradecimiento a todos mis amigos que han estado ahí para apoyarme a lo largo del camino: Diego, Napo, Belinda, Paco, Marco, Silvestre, Mundo, Rebe muy especialmente gracias por su amistad

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Nutrición y Fisiología: Ariana Roman, Daniel Badillo, Edith Carpio, Emanuel Martinez, Emyr Peña, Fernando Barreto, Fernando Guerra, Griselda Parés, Jaime Garcia, Jorge Hernandez.

CONTENIDO

	PÁGINA
1. Introducción	1
2. Antecedentes	8
3. Hipótesis	13
4. Objetivo	14
4.1 Objetivo general	14
4.2 Objetivos particulares	14
5. Materiales y métodos	14
5.1 Toma de muestras y obtención de extractos crudos	14
5.2 Análisis bioquímicos	14
5.3 Purificación parcial de lipasa pancreática de atún aleta azul del Pacífico	17
5.4 Electroforesis	18
6. Resultados	20
6.1 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de lipasas	20
6.2 Efecto del pH sobre la actividad enzimática de lipasas	21
6.3 Efecto general de las distintas sales utilizadas sobre la actividad enzimática	21
6.4 Efecto de las sales biliares: colato de sodio, deoxicolato de sodio, taurocolato de sodio y bilis natural de AAA	22
6.5 Efecto del cloruro de sodio sobre la actividad enzimática de lipasas	24

6.6 Efecto del cloruro de calcio sobre la actividad enzimática de lipasas	25
6.7 Rendimiento Enzimático	26
6.8 SDS – PAGE	27
6.9 IEF - PAGE	28
7. Discusión	29
8. Conclusiones	39
9. Recomendaciones	40
10. Bibliografía	41

LISTA DE CUADROS

CUADRO	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
I	Purificación parcial de lipasa de atún aleta azul del Pacífico a partir de extractos homogenados del páncreas (ECA), con cromatografía de intercambio aniónico en resina DEAE celulosa y cromatografía de exclusión molecular acoplada a HPLC con columna Zorbax Bio Series GF-250 (Agilent®).	26

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Efecto de la temperatura (0 a 60° C) sobre la actividad enzimática de lipasas de atún aleta azul del Pacífico, totoaba y lobina rayada. La actividad enzimática esta expresada en porcentaje de actividad relativa al máximo por especie.	20
2	Efecto del pH (5 a 10) sobre la actividad enzimática de lipasas de atún aleta azul del Pacífico, totoaba y lobina rayada. La actividad enzimática esta expresada en porcentaje de actividad relativa al máximo por especie.	21
3	Efecto de sales biliares (colato de sodio y deoxicolato de sodio), taurocolato de sodio y bilis natural de AAA sobre la actividad enzimática de lipasas de atún aleta azul del Pacífico, totoaba y lobina rayada. La actividad enzimática esta expresada en porcentaje de actividad relativa al máximo por especie.	23
4	Efecto del cloruro de sodio (0.1 a 2 M) sobre la actividad enzimática de lipasas de atún aleta azul del Pacífico, totoaba y lobina rayada. La actividad enzimática esta expresada en porcentaje de actividad relativa al máximo por especie.	24
5	Efecto del cloruro de calcio (75 mM) sobre la actividad enzimática de lipasas de atún aleta azul del Pacífico, totoaba y lobina rayada. La actividad enzimática esta expresada en porcentaje de actividad relativa al máximo por especie.	25
6	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico en PhastSystem® (SDS – PAGE)	27
7	Electroforesis en gel de poliacrilamida con enfoque isoeléctrico en PhastSystem® IEF – PAGE	28

1. Introducción

La lipasa pancreática o triacilglicerol ester hidrolasa (EC 3.1.1.3) es una enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces ester de triglicéridos (esterasa). Actividad que se realiza en una interfase lípido – agua dejando libres ácidos grasos y glicerol (Schmid y Verger, 1998). Las lipasas se diferencian de las esterases por que muestran especificidad por sustratos insolubles en agua (típicamente triglicéridos de cadenas largas), mientras que las esterases tienen preferencia por sustratos solubles en agua, hidrolizando esterés simples como acetato de etilo y triglicéridos con ácidos grasos de cadenas menores a 6 carbonos (Bornscheuer, 2002). Otra diferencia entre lipasas y esterases radica en su intervalo óptimo de actividad a distintos pH. Las lipasas muestran su máxima actividad a pHs alrededor de 8, mientras que las esterases tienen su patrón de máxima actividad a pH 6 (Foijan et al., 2000).

En el estudio de la estructura de las lipasas en general, se ha observado que éstas poseen un dominio hidrófobo o “tapadera” que cubre el sitio activo, es decir, que un conjunto de estructuras secundarias en un determinado lugar presentan la función de protección del sitio activo”. Éste dominio, o tapadera, se abre en presencia de una concentración dada de sustrato hidrófobo (triglicéridos o algún solvente orgánico hidrófobo) dejando así el sitio activo descubierto (activación interfacial; Brady et al., 1990; Winkler et al., 1990; Schmid y Verger, 1998). A su vez, se requiere de sales biliares para dispersar los lípidos (emulsificación) haciéndolos más accesibles al sitio activo de la enzima (Lombardo, 2001).

Las lipasas han sido encontradas en la mayoría de los organismos: en plantas (Mukherjee y Hills, 1994; Morohoshi et al., 2011), microorganismos (Gilbert, 1993; Jaeger et al., 1994; Benjamin y Pandey, 2000) y virus (Canaan et al., 2004), además

de los del reino animal, incluyendo peces (Carrière et al., 1997; Bacha et al., 2005; Smichi et al., 2012).

En mamíferos, además de la lipasa dependiente de sales biliares existe un complejo lipasa-colipasa descrito por Tilbeurgh et al. (1993). La colipasa es un péptido que funciona como “cofactor proteico” necesario para la actividad enzimática de este tipo de lipasas, las cuales a su vez no dependen de las sales biliares para su actividad (Rugani et al., 1995). Este complejo lipasa-colipasa no ha sido encontrado en ningún pez teleósteo, molusco o crustáceo (Smichi et al., 2012). Sin embargo, está presente en peces cartilaginosos como la raya *Dasyatis pastinaca* (Bacha et al., 2011).

Las lipasas dependientes de sales biliares de los peces teleósteos son sintetizadas en el páncreas el cual puede estar localizado como un órgano bien constituido o puede estar difuso (tejido pancreático exócrino). En este último, se presenta como nódulos esparcidos a través del tejido adiposo, mesenterio e hígado, alrededor del ducto y vesícula biliares, ciegos pilóricos e intestinos (Yasutake y Wales, 1983; Smith, 1989; Einarsson y Davies, 1997).

Las sales biliares son producidas y/o recicladas en el hígado a través de una circulación enterohepática y están compuestas por una mezcla de productos obtenidos a partir del rompimiento de inmunoglobulinas, lípidos como colesterol y esteroides (Lentner, 1981; Smith, 1989).

Existen sales biliares específicas, las cuales varían entre las diferentes especies de peces, las más comunes contienen taurocolato de sodio ($C_{26}H_{44}NNaO_7S$), tauroquenodeoxicolato de sodio ($C_{26}H_{44}NNaO_6S$), o ácido cólico ($C_{24}H_{40}O_5$) (Smith, 1989; Baldisserotto et al., 1990). El taurocolato de sodio es una sal biliar que se origina en el hígado a partir del colesterol a través de un proceso

que se lleva a cabo por la acción de 17 enzimas. Proceso que puede dividirse en 4 etapas: a) hidroxilación del colesterol, b) modificación a la estructura anillada, c) oxidación y acortamiento de la cadena lateral, d) conjugación con un aminoácido (en este caso taurina aunque en otras especies es glicina) (Russell, 2003). El papel emulsificante de las sales biliares en el tracto digestivo es fundamental para solubilizar los lípidos contenidos en los alimentos para que puedan ser hidrolizados por las enzimas responsables (lipasas) y absorbidos a través de los enterocitos.

Se calcula que entre el 60 a 95% de las sales biliares son reabsorbidas en el intestino de los peces y transportadas vía portal hacia el hígado (circulación enterohepática) donde son recicladas (Smith, 1989; Teshima et al., 1999).

Las sales en general interfieren en la solubilidad de las proteínas, de tal manera que las sales se van uniendo al agua disminuyendo la interacción del agua con la proteína favoreciendo así su solubilidad. Estas sales neutralizan las cargas iónicas sobre la superficie de las proteínas, reduciendo el ordenamiento de las moléculas de agua alrededor de la proteína e incrementando la entropía del sistema. Sin embargo, si la concentración de las sales es alta, en muchos casos la proteína se precipita, ya que un exceso de iones no enlazados a la proteína competirán con otras proteínas por el solvente (Creighton, 2002). Esta reducción de la solvatación más la neutralización de las fuerzas de repulsión permite que la proteína se agregue y precipite, fenómeno que de acuerdo a Arakawa y Timasheff (1984) se conoce como “salting in y salting out”.

La bilirrubina (bilis roja) y biliverdina (bilis verde) también conocidas como pigmentos biliares constituyen los productos del catabolismo de los grupos hemo, y son responsables en dar la coloración verde-azul a la bilis. Éstas, además de ayudar a emulsificar junto con las sales biliares, también sirven como antioxidantes

(Mørkøre et al., 2008), así, las sales y pigmentos biliares en su totalidad salen del hígado para ser almacenados en la vesícula biliar (Lagler et al., 1977).

Debido al carácter hidrófobo de los lípidos un aspecto fundamental para su digestión es la emulsificación por lo cual las sales biliares, anteriormente descritas, son de suma importancia en el proceso de lipólisis (Martin, 1987). Los lípidos son componentes del tejido animal y vegetal, que en términos de nutrición constituyen una fuente importante de energía. Forman además, parte de las membranas celulares y tejido nervioso así como también pueden ser precursores de hormonas, entre otros compuestos orgánicos (Arts et al., 2009).

Los triglicéridos constituyen la mayor fuente de lípidos y consisten en tres moléculas de ácidos grasos esterificados por los tres grupos hidroxilo del glicerol. Una molécula de triglicérido puede estar compuesta por el mismo ácido graso, por dos ácidos grasos diferentes o por tres ácidos grasos diferentes. La digestión enzimática de estas biomoléculas es por lipasas, que en los peces se localizan por lo general, en la región del intestino proximal y ciegos pilóricos si están presentes. En algunos, la digestión puede extenderse hacia partes dístales del intestino con un decremento progresivo de actividad (Rust, 2002). Por otro lado, existen excepciones donde la actividad de lipasas es mayor en la parte distal del intestino, como en el turbot *Scophthalmus Maximus* y el lenguado *Pleuronectes plateas* (Koven et al., 1994a; Olsen y Ringo, 1997).

La caracterización bioquímica de una enzima nos permite conocer a fondo sus atributos en el funcionamiento de acuerdo a las condiciones del medio de ensayo, para encontrar sus óptimo de acuerdo a la temperatura, pH, fuerza iónica, activadores, entre otros; que sirvan para distinguirlas entre varias de ellas (Ram et

al., 1986). Estos atributos por lo general se dan en porcentajes máximos de actividad utilizando sustratos similares y/o concentraciones enzimáticas específicas.

Para conocer las propiedades bioquímicas de las lipasas se pueden utilizar sustratos naturales y/o artificiales. En general se prefieren los artificiales los cuales, por lo general, utilizan métodos espectrofotométricos incrementando su sensibilidad para poder relacionarlos numéricamente. Estos sustratos, por lo general, contienen un compuesto fotosensible que al reaccionar la enzima, el producto genera un compuesto cromogénico. Para medir las lipasas se han creado sustratos del tipo de p -nitrofenil. Una diferencia entre estos sustratos artificiales con respecto a los naturales es que los primeros son hidrosolubles no dependiendo directamente de la necesidad de emulsificarlos para obtener su reacción. Los sustratos naturales para las lipasas serían entonces combinaciones de aceites, cuya reacción se mide por titulación con NaOH estimando los ácidos grasos liberados, o bien, a través de métodos colorimétrico cuyo principio se basa en la tinción con acetato cúprico de los ácidos grasos liberados (Pinsirodon y Parkin, 2001).

Estos estudios enzimáticos por lo general se realizan a partir de extractos crudos de los tejidos en donde se secretan las enzimas.

Sin embargo, para conocer sus propiedades más específicas como tipo de proteína, peso molecular y punto isoeléctrico se realiza con las enzimas purificadas. Este proceso requiere de extraer a una enzima en particular del tejido en donde se encuentra hasta su forma más pura, la cuál dependiendo del grado de purificación se habla de una enzima cruda hasta altamente purificada cuando se encuentra a más del 95% (Burgess y Deutscher, 2009). Los procesos de purificación por lo general envuelven desde una precipitación diferencial utilizando el grado de solubilidad de la enzima usando sales de sulfato de amonio o un polímero con sal

como la polietilenimina con cloruro de sodio y el polietilen glicol, otros métodos de precipitación de proteínas incluyen la precipitación con acetona y etanol, la precipitación isoeléctrica y por último la precipitación térmica , hasta el uso de técnicas cromatográficas utilizando cromatografía de intercambio iónico (la más popular en la purificación de proteínas), exclusión molecular con filtración en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de inmutofinidad, columnas de cromatografía líquida convencional o HPLC, métodos electroforéticos en geles de poliacrilamida, (Burgess y Deutscher, 2009).

El presente estudio se enfocó en caracterizar la actividad enzimática de las lipasas de tres peces carnívoros con un alto aprovechamiento digestivo de los lípidos. Como lo es el AAA que consume el 17.9 % de ellos en su dieta (Biswas, et al., 2009), considerado como un predador carnívoro marino, comparado con otro la TM, que en contraste al anterior, presenta un requerimiento del 8 % (Rueda-López et al., 2011). También comprende el estudio de un pez carnívoro de agua dulce como lo es la LR, que es un pez híbrido que proviene de una hembra de agua dulce y un macho de agua de mar. La cruce de ambos ha sido adaptada a medios marinos, y presenta un requerimiento de lípidos entre 9.6 y 11.5 % de su dieta (Rawles, et al., 2006). Tanto la TM como la LR han observado una amplia capacidad de adaptación a distintas concentraciones de sal clasificadas como especies eurihalinas.

El objetivo del presente estudio fue la caracterización bioquímica de lipasas pancreáticas provenientes de tres especies con distintos requerimientos de lípidos en su dieta y características fisiológicas distintas. Así como la purificación parcial de la lipasa del AAA para obtener su peso molecular y punto isoeléctrico.

2. Antecedentes

La lipasa pancreática en peces ha sido caracterizada y purificada a partir de homogenados del páncreas, ciegos pilóricos e intestino anterior y se han estudiado extensivamente las propiedades fisicoquímicas de varias especies incluyendo sus mecanismos de reacción (Borlongan, 1990; Gjellesvik et al., 1992; Iijima et al., 1998; Kurtovic et al., 2010; Nolasco et al., 2011; Smichi et al., 2012). La lipasa mejor caracterizada es la del bacalao del Atlántico *Gadus morhua* con una actividad máxima a pH 7.5 y de 30 a 40° C. El proceso de purificación de esta enzima dio como resultado un peso molecular de aproximadamente 60 kDa. Actividad que depende de la presencia de sales biliares encontrando esta enzima como la única encargada de realizar la lipólisis de triglicéridos, ésteres de colesterol. En el caso de sustratos artificiales es encargada de la hidrólisis de enlaces éster a partir del sustrato 4-nitrofenil caproato con una actividad enzimática específica de 132 ± 3.7 U/mg, mientras que con 4-nitrofenil miristato de 31.0 ± 1.4 U/mg, y con 4-nitrofenil acetato de 1.7 ± 0.1 U/mg. Esta lipasa del bacalao resultó ser muy similar a la lipasa dependiente de sales biliares del humano con sólo una pequeña diferencia en su especificidad por los ácidos grasos en su posición con respecto al glicerol (1, 3) en la hidrólisis de trioleína (Gjellesvik, 1992). La secuencia de cDNA de la lipasa dependiente de sales biliares en mamíferos demostró el 58% de similitud con la lipasa de páncreas del bacalao del atlántico (Gjellesvik et al., 1994). Estudio que ha servido como base para otras investigaciones de la misma índole. Un ejemplo de ello son Olsen y Ringø (1997) quienes encontraron en extractos crudos de ciegos pilóricos de salmón del atlántico (*Salmo salar*) alta actividad específica en presencia de sales biliares hidrolizando ésteres 4-nitrofenil sugiriendo así que la principal lipasa

de salmón es dependiente de sales biliares. De la misma forma Iijima y colaboradores (1998) quienes lograron caracterizar la lipasa de pargo (*Pagrus major*) en extractos crudos de páncreas obtuvieron un intervalo óptimo de actividad entre pH 7.0 y 9.0, y a través de su purificación reportan un peso molecular de 64 kDa. Purificación lograda mediante precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio aniónico. También observaron que en este caso particular la actividad de la lipasa pancreática del pargo disminuía en ausencia de los extractos biliares. En estos estudios se utilizaron sustratos nativos mediante titulación a base de emulsiones de aceite de oliva y trioleína así como también se utilizaron métodos espectrofotométricos (Pinsirodon and Parkin, 2001).

Existen otros estudios en donde se investigó el papel de la colipasa en peces y se reporta que ciertas sales biliares pueden llegar a inhibir la actividad de lipasa. Tocher y Sargent (1984) utilizando extractos crudos de ciegos pilóricos de trucha arcoíris (*Onchoryncus mykiss*) postulan la presencia de dos enzimas, una triacilglicerol ester hidrolasa y otra hidrolasa de ésteres de ceras y esteroides. En ambas observan que la actividad lipolítica se estimula en presencia de sales biliares principalmente taurocolato y tauroquenodeoxicolato mientras que la actividad es inhibida por deoxicolato y taurodeoxicolato. Así mismo, demostraron que la colipasa de porcino no es capaz de prevenir la inhibición de la actividad lipolítica por la falta de sales biliares. Por último señalan que en términos de moles de sustrato digerido, la triacilglicerol ester hidrolasa, hidroliza por lo menos 50 veces más rápido que la hidrolasa de ésteres de ceras y esteroides en ensayos *in vitro*.

Estudios con extractos desengrasados de ciegos pilóricos del salmón Chinook *Oncorhynchus tshawytscha* (Kurtovic et al., 2010) revelan la existencia de una lipasa dependiente de sales biliares con una masa molecular de 79.6 kDa y un

punto isoeléctrico de 5.7. Esta lipasa mostró una temperatura óptima de actividad enzimática de 35° C a un pH de 8.0, hidrolizando esteres de 4-nitrofenil caproato. En dicha investigación también se caracterizó y purificó a través del extracto de ciegos pilóricos desengrasados de merluza *Macroronus novaezelandiae* una lipasa dependiente de sales biliares con masa molecular de 44.6 kDa y pI 5.8, con una temperatura óptima de actividad enzimática de 35° C a un pH óptimo de 8.5 utilizando el mismo sustrato. Ambas lipasas necesitaron de iones de calcio para su actividad óptima sugiriendo que los iones de calcio previenen la inhibición del sitio activo precipitando los ácidos grasos libres. La mayoría de las técnicas para medir lipasa reportan la necesidad de contener el CaCl₂ como activador, aunque existen trabajos que han demostrado que esto no sea necesario.

Así mismo utilizan como sal biliar al colato de sodio que actúa como surfactante, facilitando la unión del sustrato al sitio activo de la lipasa.

Nolasco et al. (2011) trabajando con homogenados de ciegos pilóricos e intestino anterior de la dorada *Sparus aurata* encontraron que la temperatura óptima fue de 50° C a pH 8.5 con una salinidad de 50 mM de NaCl; además de demostrar dependencia al taurocolato de sodio para su actividad enzimática. En este estudio, los iones de calcio y/o magnesio no mostraron ningún efecto sobre la actividad de lipasas. Por otro lado, ellos reportan cuatro isoformas principales, de 34, 50, 68 y 84, con lo cual sugieren que la lipasa de *Sparus aurata* pueda estar constituida en una asociación estructural cuaternaria (34 + 34) y/o (34 + 50).

Existen también estudios sobre la especificidad posicional de la lipasa dependiente de sales biliares en salmón con estudios *in vivo*. Estudios que sugieren la hidrólisis completa de triglicéridos a ácidos grasos y glicerol (Sigurgisladottir et al., 1992) siendo la lipasa inespecífica a la posición del ácido graso. Mientras que la

lipasa purificada del hepatopáncreas de sardina presenta especificidad 1, 3 (con tributirina y trioleína como sustratos; Mukundan et al., 1985), en el turbot (Koven et al., 1994a,b) se presentó una con especificidad 1, 3 produciendo ácidos grasos y 2-monoglicérido en el extracto crudo de intestino proximal, y otra localizada en el intestino medio y distal que es inespecífica.

La mayoría de la actividad de lipasas en peces se presenta en tejido pancreático, mientras que se reporta una actividad lipolítica baja o nula en el estómago de varios peces. Olsen y Ringø (1997) establecen que no existe contribución significativa de lipasas estomacales en la digestión de lípidos en la trucha ártica (*Salvelinus alpinus*) y bacalao del atlántico (*Gadus morhua*), por lo que la actividad lipolítica gástrica en peces todavía no es clara. Así mismo, Natalia, et al. (2004) se encargaron de caracterizar la actividad de enzimas digestivas en un pez carnívoro ornamental (*Scleropages formosus*), encontrando que en los ensayos con lipasas la mayor actividad se encontró en intestino y páncreas, mientras que en el estómago la actividad fue significativamente menor (un 25% del total). Se ha encontrado que la mucosa intestinal contiene lipasas como lo muestran numerosos estudios donde se han encontrado actividades altas en diferentes segmentos intestinales de varios peces. Aún así, se sabe que estas lipasas son de origen pancreático resultado de secreción de las enzimas pancreáticas hacia la mucosa intestinal (Fänge y Grove, 1979; Smith, 1989a). Sin embargo, en el bagre africano (*Clarius gariepinus*) y la carpa (*Ctenopharyngodon idella*) se encontró actividad de lipasas en intestinos después de 24 y 48 horas de inanición, respectivamente (Ghosh, 1976; Das y Tripathi, 1991) casos en donde Olsen y Ringø (1997) afirman que no se puede excluir que la actividad lipolítica encontrada en otras partes del tracto digestivo de los peces pueda ser de origen bacteriano.

En diversos trabajos de investigación de lipasas en peces se hace notoria la importancia de conocer los componentes de las sales biliares para un mejor entendimiento de los procesos que las generan ya que el tipo de sales biliares que participan determina la eficiencia de las lipasas. Estudiando la alimentación de juveniles de lenguado *Paralichthys olivaceus*, Kim et al. (2007) reportan que el taurocolato de sodio constituye hasta un 95% del total de las sales biliares y el 5% restante es tauroquenodeoxicolato de sodio, siendo la taurina el único aminoácido conjugado con sales biliares en este pez. Vessey et al. (1990) estudiando el bacalao (*Ophiodon elongatus*) describieron a la enzima taurina N-acil transferasa como evidencia de que la taurina es el único aminoácido conjugado en las sales biliares del pez.

En el presente estudio se llevó a cabo la caracterización de tres lipasas utilizando distintas sales biliares comerciales Sigma®, bilis fresca, NaCl, así como CaCl₂ como activador/estabilizador de las lipasas. Las sales biliares de Sigma® utilizadas están compuestas de la siguiente manera: el 50 % corresponde a colato de sodio, que es una sal biliar primaria, la cual no tiene conjugado a ningún aminoácido, ya sea taurina o glicina como comúnmente se conjugan, y el otro 50 % es deoxicolato de sodio que es una sal biliar secundaria que por efecto de bacterias ha sido degradada oxidándose.

Así mismo, la lipasa del AAA se purificó a través de intercambio iónico y mediante electroforesis se estableció el peso molecular y punto isoeléctrico.

3. Hipótesis

La actividad enzimática de lipasas pancreáticas de tres diferentes especies carnívoras de peces con requerimientos lipídicos distintos tendrán características bioquímicas diferentes.

4. Objetivo general

Caracterizar comparativamente las lipasas pancreáticas de tres especies de peces carnívoros con diferentes requerimientos nutrimentales atún aleta azul *Thunnus orientalis* (AAA), totoaba *Totoaba macdonaldi* (TM) y lobina rayada *Morone chrysops* X *M. saxatilis* (LR).

4.1. Objetivos particulares

1. Caracterizar la actividad enzimática de lipasas a pH y temperaturas de AAA, TM y LR.
2. Evaluar el efecto de la concentración y algunas combinaciones de taurocolato de sodio, cloruro de sodio, sales biliares comerciales y bilis natural, en la actividad enzimática de las lipasas de AAA, TM y LR.
3. Purificar parcialmente la lipasa pancreática de AAA, analizar su peso molecular y punto isoeléctrico.

5. Materiales y métodos

5.1. Toma de muestras y obtención de extractos crudos:

Muestreo de páncreas de AAA, LR y TM:

Se obtuvieron páncreas frescos de atún aleta azul del Pacífico (AAA) (*Thunnus orientalis*) donados por la empresa comercial Baja Aqua Farms S.A. de C.V. y páncreas frescos de lobina rayada (LR) (variedad híbrida, *Morone chrysops* X *Morone saxatilis*) donados por Pacífico Aquaculture S. de R.L. de C.V., ambos de Ensenada, B.C.

Mientras que los páncreas de totoaba (TM) (*Totoaba macdonaldi*) se obtuvieron de organismos donados de un experimento realizado en el CICESE. Todos los páncreas fueron extraídos en fresco y transportados al laboratorio en donde se almacenaron a -80° C hasta su utilización.

Extractos crudos de páncreas:

A partir de grupos de más de 12 páncreas de cada especie se homogenizaron en hielo con una licuadora Brown agregando una solución salina (10 % de NaCl) en una relación 1:2 (peso húmedo:volumen). Los homogenados se centrifugaron a 10 000 RPM durante 10 minutos a 4° C. El sobrenadante se congeló a -80° C hasta los ensayos enzimáticos.

5.2. Análisis bioquímicos:

Concentración de proteína:

Se determinó la concentración de proteína de acuerdo al método de Bradford (1976), utilizando albúmina sérica de bovino (BSA) como estándar y reportado como mg de proteína equivalente a BSA.

Ensayos enzimáticos:

Actividad de lipasa en extractos crudos de páncreas fue determinada por la hidrólisis de 4-nitrofenil caproato (4-NPC) de acuerdo al método modificado de Gjellesvik et al. (1992). La reacción se inició adicionando extracto crudo de páncreas a una solución amortiguadora 0.2 M de Tris-HCl (pH 7.4) que contenía 6 mM de NaTC, 100 mM de NaCl, y 100 mM 4-NPC (para una concentración final de 0.35 mM durante la reacción enzimática). Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Bechman con un peltier para controlar la temperatura durante el ensayo. El incremento en absorbencia se leyó a 400 nm cada minuto durante periodos de 12 minutos. La actividad enzimática se expresó como porcentaje de actividad relativa a la máxima encontrada.

NOTA: Para reportar la actividad a distintas temperaturas y pHs, la actividad se reportó como actividad relativa al máximo por especie. Lo mismo se realizó para determinar el efecto de las sales biliares, bilis, NaCl y CaCl₂. Sólo que a diferencia del anterior y para facilitar la interpretación, los resultados se reportaron en distintas gráficas respetando su máximo de actividad por especie, con el fin de poder interpretar.

Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de lipasas:

Los ensayos para evaluar el efecto de la temperatura y pH sobre la actividad enzimática se realizaron utilizando extractos crudos de páncreas de las tres especies. El efecto de la temperatura se evaluó a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60° C todos bajo condiciones iguales a lo descrito anteriormente.

Efecto del pH sobre la actividad enzimática de lipasas:

El efecto del pH se evaluó a 25° C y se utilizaron las siguientes soluciones amortiguadoras: 0.2 M Citrato-Fosfato, pH 5.0, 6.0; 0.2 M Tris-HCl pH 7.0-9.0; 0.2 M Glicina-NaOH pH 10.0.

Efecto de sales biliares sobre la actividad enzimática de lipasas:

Para evaluar la dependencia de las lipasas de las tres especies por las sales biliares se procedió a cuantificar la actividad enzimática utilizando diferentes sales biliares. Las concentraciones utilizadas de cada sal fueron elegidas de acuerdo a pruebas previas a la experimentación para acordar el intervalo de actividad apropiado. Se evaluaron cada una de las siguientes en una solución amortiguadora 0.2 M Tris-HCl pH 8.0 a 37° C; (1) 6 mM de Sales biliares (Sigma®) (50% colato de sodio + 50% deoxicolato de sodio, s/NaCl, s/NaTC); (2) 6mM de NaTC (Sigma®) (s/NaCl, s/Sales biliares); (3) 35 µL de bilis natural de AAA equivalente a 6.6% en el volumen de reacción (s/NaCl, s/NaTC, s/sales biliares); (4) 15 µL de bilis natural de AAA equivalente a 2.8% en el volumen de reacción (s/NaCl, s/NaTC, s/sales biliares); (5) 5 µL bilis natural de AAA equivalente a 0.9% en el volumen de reacción (s/NaCl, s/NaTC, s/sales biliares); (6) 1 µL bilis natural de AAA equivalente a 0.1% en el volumen de reacción (s/NaCl, s/NaTC, s/sales biliares). Las concentraciones utilizadas de bilis natural se hicieron de acuerdo a lo reportado por Matus et al. (2007).

Efecto del cloruro de sodio sobre la actividad enzimática de lipasas:

Para evaluar el efecto de la concentración del NaCl sobre la actividad enzimática de las lipasas pancreáticas de las tres especies se prepararon cuatro soluciones con diferente concentración; 1) 100 mM de NaCl (s/NaTC); 2) 500 mM de NaCl (s/NaTC); (3) 1.0 M de NaCl (s/NaTC); (4) 2.0 M de NaCl (s/NaTC), se utilizó cloruro de sodio grado reactivo, cada concentración en una solución amortiguadora 0.2 M Tris-HCl pH 8.0 a 37° C.

Efecto del cloruro de calcio sobre la actividad enzimática de lipasas:

Con el objeto de evaluar si el cloruro de calcio tiene un efecto activador de la actividad enzimática de lipasas pancreáticas de las tres especies, se realizó un ensayo contrastando la reacción con y sin CaCl₂. Se prepararon dos soluciones: 1) (Control) con 6 mM de NaTC + 100 mM NaCl; 2) 75 mM de CaCl₂ 6 mM NaTC + 100 mM de NaCl. Ambas preparadas en una solución amortiguadora 0.2 M Tris-HCl pH 8.0 a 37° C.

5.3. Purificación parcial de lipasa pancreática de Atún aleta azul del Pacífico:

Para intentar purificar la lipasa pancreática del AAA, primeramente se utilizó un extracto crudo de páncreas de AAA el cual fue dializado con membranas semipermeables Spectrapor con un poro de 6 000 a 8 000 Da, mantenidas a 4° C, utilizando una solución amortiguadora 0.05 M de Tris-HCl pH 7.0 durante 24 horas con recambios continuos de amortiguador.

Posteriormente la lipasa fue purificada mediante cromatografía líquida de intercambio iónico. Para esto, la muestra fue aplicada a una columna de 40 cm de

largo por 4 cm de diámetro que contenía resina de intercambio aniónico Dietilaminoetil celulosa (DEAE Celulosa de Sigma®) previamente tratada con soluciones de 0.1 M de NaOH, 0.1 M de HCl, 0.5 M de NaCl para su activación y equilibrada con amortiguador 0.2 M Tris-HCl pH 7.0. La resina se lavó con la misma solución amortiguadora hasta que ningún rastro de proteína fue detectada espectrofotométricamente a 280 nm.

El material retenido por la columna fue eluido con una solución 0.2 M Tris-HCl pH 7.0 que contenía 2 M de NaCl, formando así un gradiente lineal (0-2 M). Las fracciones de 15 mL fueron colectadas durante la aplicación de la muestra a una tasa de elución de 3 mL min⁻¹ en un colector automático (Pharmacia LKB Fracc 100).

Las fracciones que contenían valores altos de proteína a 280 nm fueron agrupadas para su posterior ensayo de actividad de lipasas con 4-NPC como sustrato, a pH 8.0 y 37° C, según la metodología descrita anteriormente.

Las fracciones con mayor actividad se separaron para su posterior análisis en HPLC con una columna de exclusión molecular Zorbax, con gradiente isocrático con un flujo de 1ml/min, leído a 280 nm.

Liofilización:

Las fracciones con mayor actividad de lipasa fueron dializadas y posteriormente liofilizadas a -80° C al vacío durante 48 horas en un equipo Virtis Freezemobile 12EL.

5.4 Electroforesis:

SDS – PAGE

Para estimar el peso molecular de las proteínas identificadas como lipasa se realizó una electroforesis en gel con gradiente 10-15 (4.5%T, 3%C) de poliacrilamida teñida con azul de Coomassie. Para estimar el peso molecular de la enzima se utilizaron 20 mg de la fracción soluble con mayor actividad enzimática encontrada. Se reconstituyó en una solución que contenía SDS, 2-mercaptoetanol, Brilliant blue G, 50 mM Tris-HCl pH 6.8 y se agregó a las posillas del gel. Se utilizó un marcador de peso molecular Novagen (10-225 kDa) para estimar el peso molecular de la proteína identificada como lipasa.

IEF - PAGE

Para estimar el punto isoeléctrico de la enzima se llevó a cabo una electroforesis por enfoque isoeléctrico en gel de poliacrilamida mediante Phast System (Pharmacia LKB Biotechnology) en geles homogéneos de poliacrilamida (5%T , 3%C) con anfolitos acarreadores para generar gradientes de pH lineales, usando un Kit IEF-MI de proteínas estándares. El gradiente utilizado fue de 3-9, las tinciones fueron con azul de Coomassie.

6. Resultados

6.1 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de lipasas:

Se encontraron diferentes máximos de actividad con respecto a la temperatura para cada especie evaluada (Figura 1), siendo la mayor en TM (45° C) y la menor para LR (35° C) mientras que para AAA la temperatura máxima se registró a los 40° C.

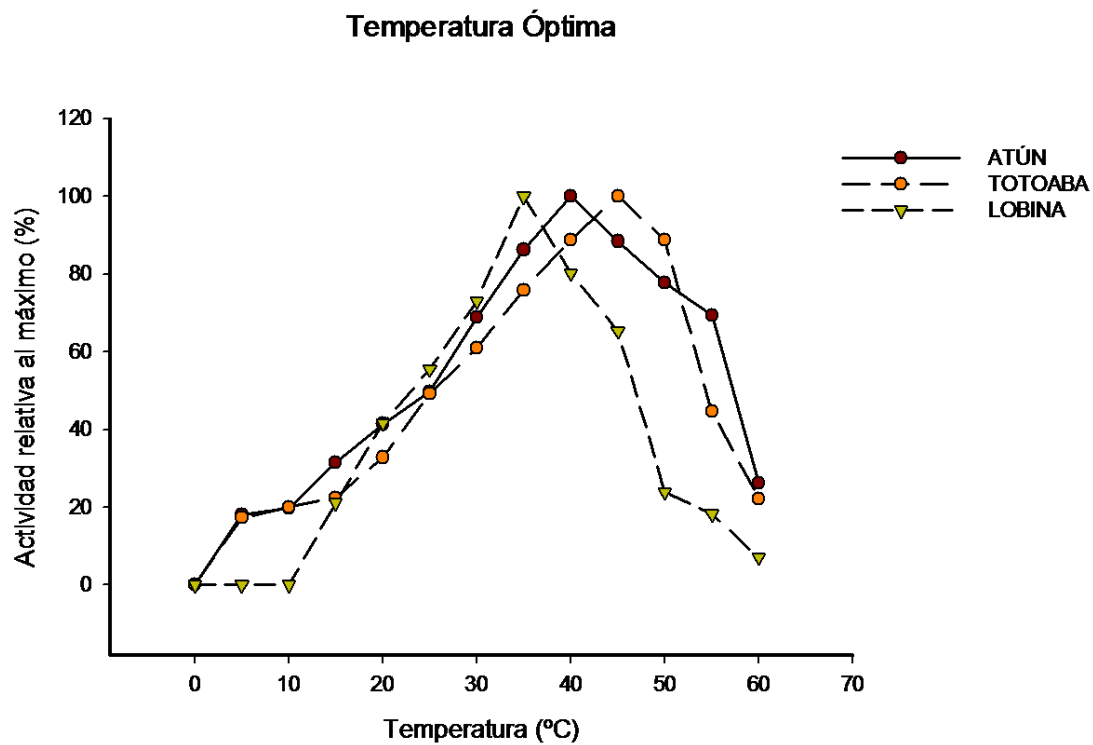


Figura 1: Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de lipasas triacilglicerol ester hidrolasa E.C. 3.1.1.3 en extractos crudos de tejido pancreático de AAA, LR y TM empleando 4-nitrofenil caproato como sustrato. Actividad reportada como relativa al máximo para cada especie.

6.2 Efecto del pH sobre la actividad enzimática de lipasas:

Los resultados mostraron que la actividad máxima para las tres especies fue a pH 8.0 (Figura 2).

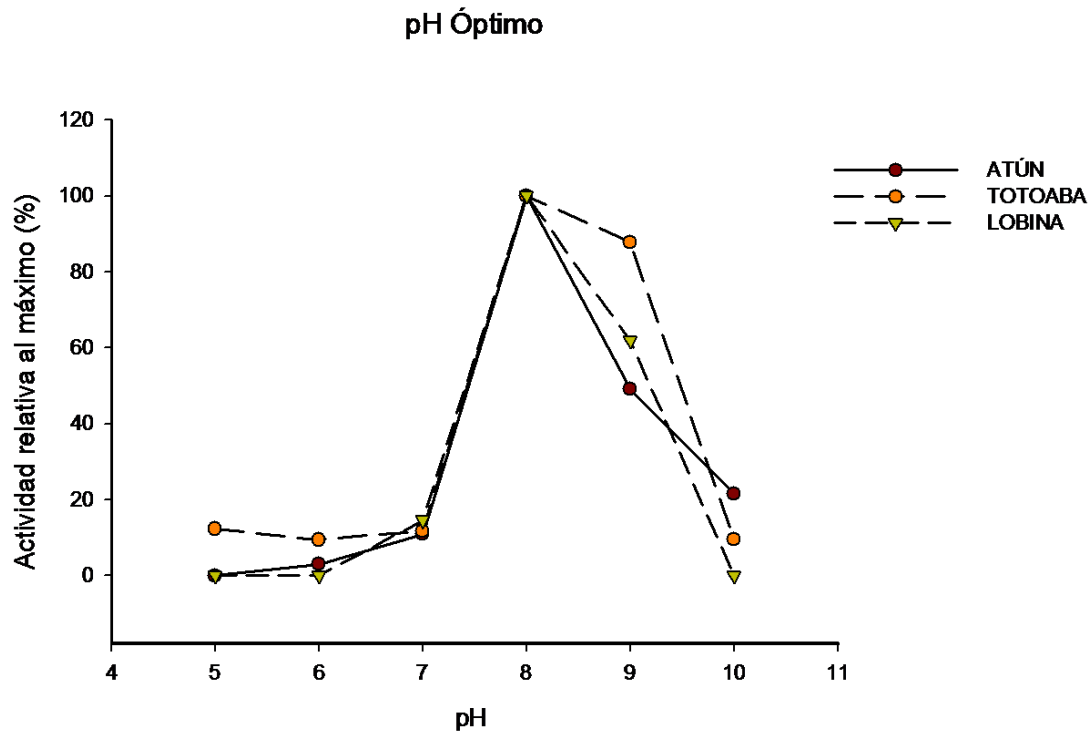


Figura 2: Efecto del pH sobre la actividad enzimática de lipasas (Triacilglicerol ester hidrolasa E.C. 3.1.1.3) en extractos crudos de tejido pancreático de AAA, LR y TM empleando 4-nitrofenil caproato como sustrato. Actividad reportada como relativa al máximo para cada especie.

6.3 Efecto general de las distintas sales utilizadas sobre la actividad enzimática¹:

El máximo de actividad enzimática para AAA y TM se observó con 6 mM de taurocolato de sodio (Figura 3). Mientras que para LR el máximo de actividad se observó con 2 M de cloruro de sodio (Figura, 4).

¹ Nota: como se indica en materiales y métodos, las actividades enzimáticas están reportadas al máximo de actividad para cada especie considerando el total de ensayos para cada especie (sales biliares, bilis, NaCl y CaCl₂), y no para cada figura reportada. Esto se realizó con el fin de comparar los máximos de actividad por enzima entre las distintas condiciones.

6.4 Efecto de las Sales biliares: colato de sodio, deoxicolato de sodio, taurocolato de sodio y bilis natural de AAA

Se encontró el máximo de actividad enzimática (100%) para AAA y TM, ambas con 6 mM de taurocolato de sodio (Figura 3). Además se observó que conforme la concentración de bilis natural disminuye (6.6 % a 0.1 % del volumen de reacción), la actividad enzimática de lipasas de TM aumenta de 0 % a 67.7 % (Figura 3). Mientras que en la LR ocurre lo contrario, de tal manera que al aumentar la concentración de bilis natural de 0.1 % a 2.8 % del volumen total de reacción, la actividad enzimática de lipasas se incrementa de 23.2 a 54.8 %. Sin embargo a mayores concentraciones (de 2.8 a 6.6 %) la actividad disminuye (24.1 %). Para AAA se observa que a una concentración de bilis natural igual a 0.9 % resulta en su máximo de actividad correspondiendo al 56.3 % de actividad relativa al máximo para esta especie. Mientras que con una concentración mayor o menor, la actividad decrece (Figura 3).

Con sales biliares de Sigma® (50 % colato de sodio + 50% deoxicolato de sodio) no se observó un efecto aditivo a la actividad en contraste a lo registrado con el taurocolato de sodio (Figura 3).

Efecto de sales biliares y bilis natural

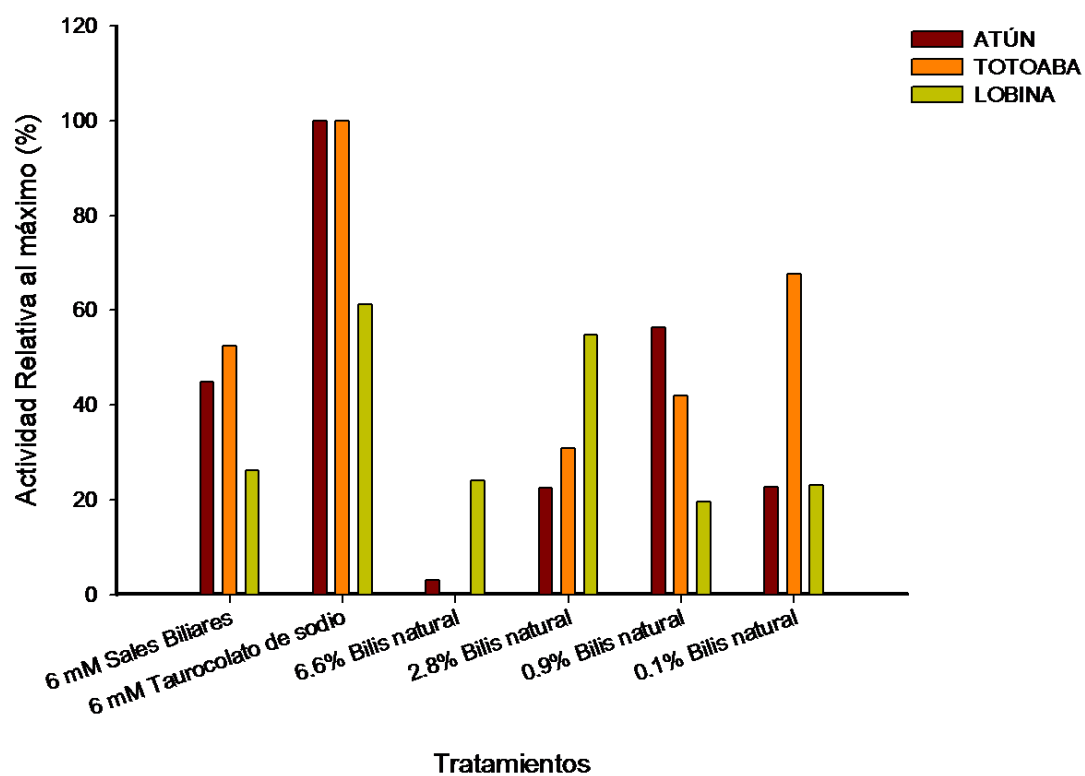


Figura 3: Efecto de sales biliares, taurocolato de sodio y bilis natural de AAA sobre la actividad enzimática de lipasas (Triacilglicerol ester hidrolasa E.C. 3.1.1.3) en extractos crudos de tejido pancreático de AAA, LR y TM empleando 4-nitrofenil caproato como sustrato. Actividad reportada como relativa al máximo para cada especie.

6.5 Efecto de cloruro de sodio sobre la actividad enzimática de lipasas

Se observó el máximo de actividad enzimática (100 %) para LR bajo la presencia de 2 M de NaCl en la solución de reacción (Figura 4), así como se observa el incremento de la actividad enzimática de las lipasas de LR conforme aumenta la concentración de NaCl. Mientras que para AAA y TM el aumento de la concentración de NaCl en los ensayos no generó aumento en la actividad enzimática de lipasas pancreáticas.

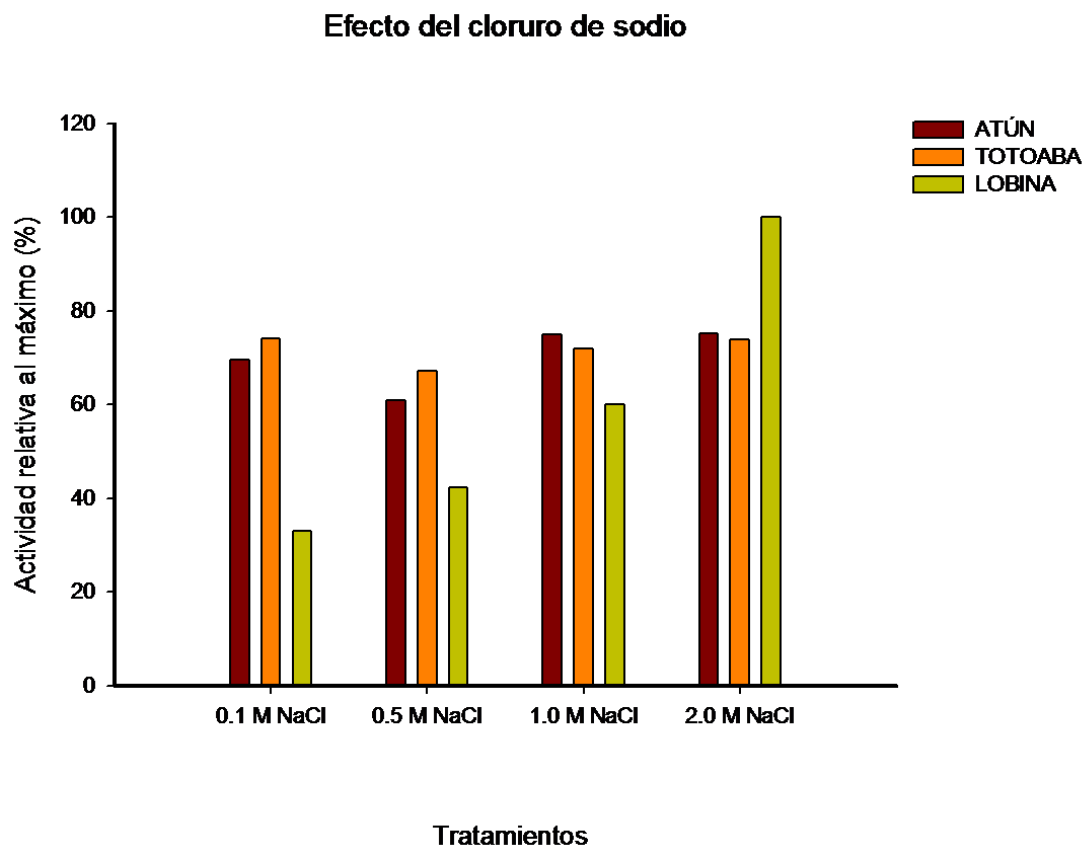


Figura 4: Efecto del cloruro de sodio sobre la actividad enzimática de lipasas (Triacilglicerol ester hidrolasa E.C. 3.1.1.3) en extractos crudos de tejido pancreático de AAA, LR y TM empleando 4-nitrofenil caproato como sustrato. Actividad reportada como relativa al máximo para cada especie.

6.6 Efecto del cloruro de calcio sobre la actividad enzimática de lipasas:

No se observaron efectos positivos sobre la actividad enzimática de las lipasas al adicionar 75 mM de CaCl_2 , por lo contrario, bajo la presencia del CaCl_2 , se observó una disminución de la actividad enzimática relativa. La disminución de la actividad relativa al máximo con respecto al control fue de aproximadamente un 60% en LR, 55% en AAA y 42% EN TM (Figura 5).

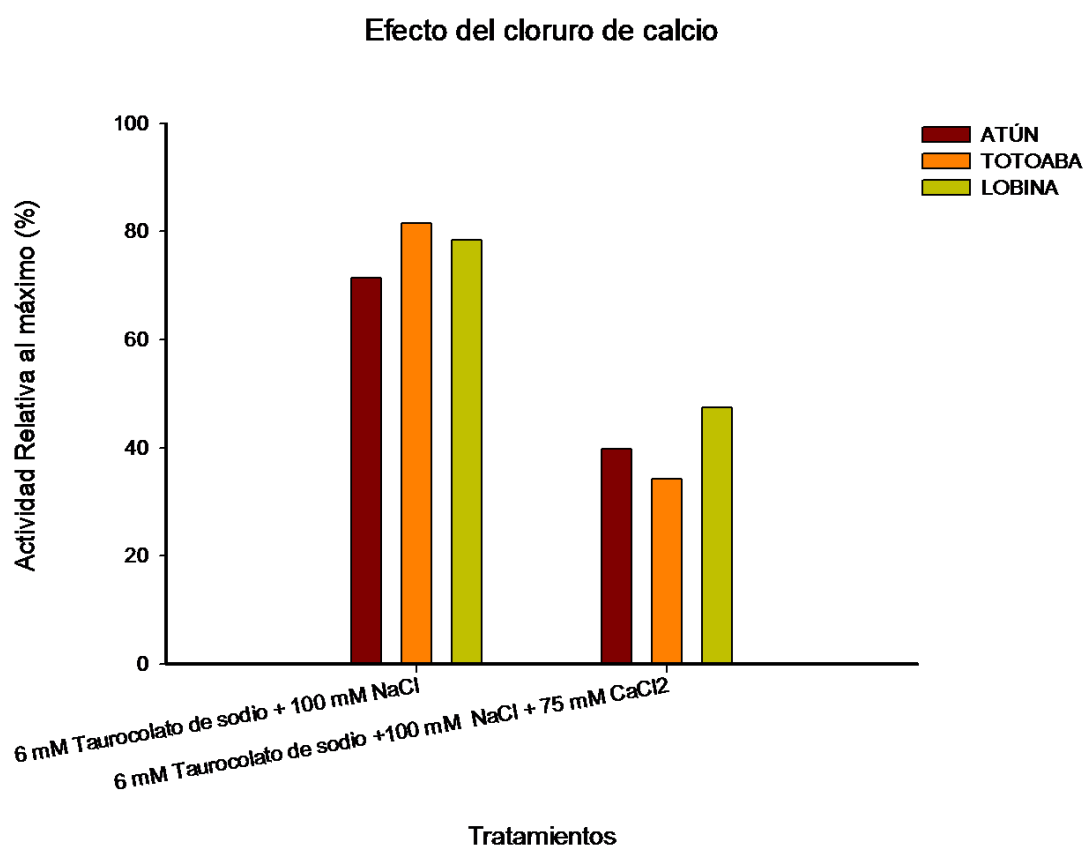


Figura 5: Efecto del cloruro de calcio sobre la actividad enzimática de lipasas (triacilglicerol ester hidrolasa E.C. 3.1.1.3) en extractos crudos de tejido pancreático de AAA, LR y TM empleando 4-nitrofenil caproato como sustrato. Actividad reportada como relativa al máximo para cada especie.

6.7 Rendimiento enzimático

Se llevó a cabo la purificación de la lipasa pancreática a partir de extractos crudos de AAA. Para verificar que en cada paso de la purificación se obtenía un extracto enzimático más puro, se realizaron ensayos enzimáticos correspondientes a cada fracción en donde se obtuvo la actividad específica en U/mg de proteína. Por ejemplo a partir del el extracto crudo de páncreas se cuantificó una actividad de 4.83 U/mg de proteína y esta aumentó a 8149.6 U/mg de proteína en la última fracción purificada obtenida por HPLC, lo que indica una purificación del 1687.3 % (Cuadro 1).

Cuadro I: Purificación de lipasa pancreática de AAA a través de cromatografía de intercambio aniónico (DEAE), y cromatografía líquida de alta precisión (HPLC).

	Volumen (ml)	Act. (U/ml/min)	Proteína (mg/ml)	Act. Total (U)	Proteína total (mg)	Act. Esp. (U/mg)	Purificación (%)
ECA	30.0	13.2	2.73	36.04	81.90	4.83	1.0
DEAE	15.0	523.4	1.77	926.4	26.55	295.7	61.22
HPLC	2.0	937.2	0.23	1874.4	0.46	8149.6	1687.3

ECA: extracto crudo de tejido pancreático

DEAE: dietilaminoetil celulosa (resina de intercambio aniónico)

HPLC: cromatografía líquida de alta precisión

6.8 SDS – PAGE

Por medio de la electroforesis se estimó que el peso molecular de la enzima purificada parcialmente por medio de intercambio aniónico es de aproximadamente 24 kDa (Figura 6,b). El extracto crudo de páncreas presenta una proteína que se encuentra cercana a los 24 kDa (Figura 6,a) la cual aparece posteriormente en el segundo gel después de los procesos de purificación. Se observa en la figura 6,b que la fracción no está completamente pura, se encontraron proteínas de menores pesos moleculares (15, 10 kDa).

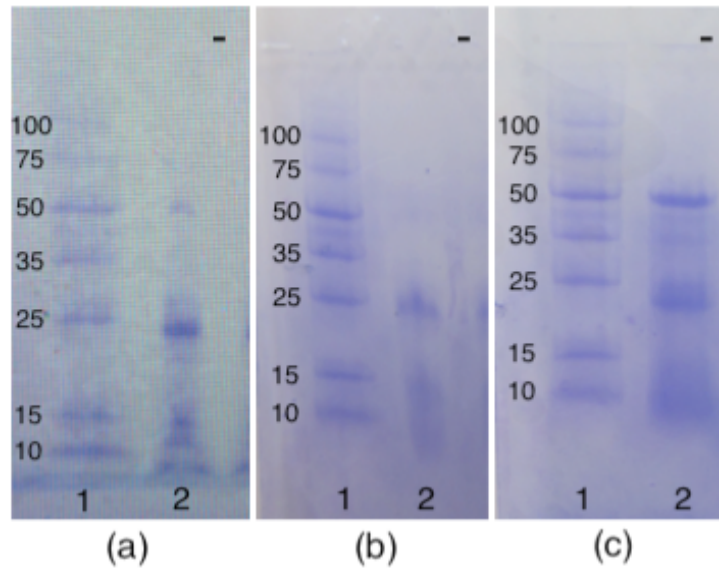


Figura 6: Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS utilizando azul de coomassie para la tinción de las proteínas, en todas las imágenes al lado izquierdo se presentan una escalera de marcadores moleculares Novagen de 10 a 100 kDa. (a) Extracto crudo de páncreas de AAA. (b) Fracción purificada con resina de intercambio aniónico (DEAE celulosa). (c) Lipasa pancreática de cerdo.

6.9 IEF-PAGE

El punto isoeléctrico de la enzima parcialmente purificada fue de aproximadamente 8.15.

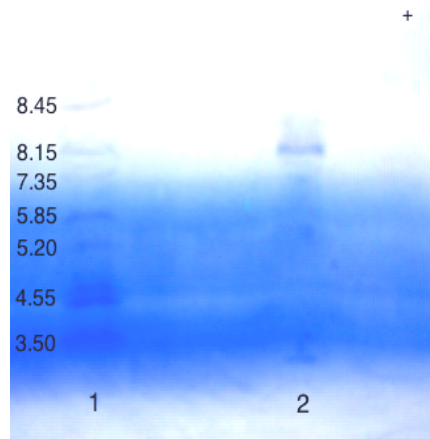


Figura 7: Electroforesis de enfoque isoeléctrico en gel de poliacrilamida utilizando azul de coomassie para la tinción de las proteínas, en el carril 1 se presentan una escalera de marcadores moleculares un Kit IEF-MI de proteínas estándares, en el carril 2 se observa la lipasa de AAA con un punto isoeléctrico cercano a 8.15

7. Discusión

Se evaluó la actividad enzimática de lipasas pancreáticas de AAA, LR y TM (tres especies con requerimientos lipídicos aparentemente distintos) bajo diferentes condiciones de: temperatura, pH, distintas sales (colato y deoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, bilis natural, cloruro de sodio y cloruro de calcio) para caracterizar bioquímicamente las distintas lipasas de forma comparativa. Así mismo la lipasa pancreática de AAA se purificó parcialmente para determinar su peso molecular y punto isoeléctrico.

Con base en los resultados de caracterización obtenidos por el efecto de NaCl y sales biliares en este estudio, se determinó que las lipasas del AAA y TM presentaron mayor similitud con relación a lo observado para la lipasa de la LR. Mientras que con relación a la temperatura y pH las tres lipasas se comportaron relativamente de forma similar.

Cabe aclarar que en cuanto a la caracterización enzimática se refiere, los óptimos de actividad hacen referencia al punto de máxima actividad y no deben relacionarse de manera alguna a la fisiología propia del pez.

Efecto de la temperatura

Se encontraron diferencias entre las temperaturas óptimas de actividad, en donde la lipasa de TM la obtuvo a los 45° C, el AAA a 40° C y la LR a 35° C. Estas diferencias se encuentran dentro del intervalo descrito para la gran mayoría de las enzimas reportadas para las distintas especies (Segel, 1975). De acuerdo a Murray et al. (1990) las enzimas de cualquier organismo presentan un óptimo de actividad a temperaturas mayores a las que se presentan dentro de su propio organismo. Esto

se basa en que las enzimas para reaccionar requieren que la energía de activación rebase la barrera de rompimiento de las fuerzas débiles (puentes de hidrógeno y enlaces hidrófobos) de tal forma que la tasa de reacción inicial se incrementa a medida que aumenta la temperatura debido a un incremento en la energía cinética de las moléculas reactivas.

Debido a este incremento de temperatura las posibilidades de desnaturalización de la proteína también aumentan y se observan con la pérdida de actividad catalítica. Por ello, mientras más tiempo permanezca la enzima al margen de su óptimo catalítico, se hace más probable su desnaturalización, razón por la cual el óptimo catalítico de las enzimas no está cerca del óptimo fisiológico de las especies.

Las proteínas en general, y particularmente las enzimas se han ido adaptando evolutivamente a las distintas condiciones del medio ambiente, ampliando o limitando sus características, hasta cierto punto. En un sistema biológico, la energía de activación elevada corresponde a una reacción más lenta, por lo tanto se denomina como altamente eficiente a una enzima que tenga una energía de activación baja (Hochachka y Somero, 1984), de tal manera que sistemas adaptados a bajas temperaturas tienden a reducir dicha barrera como una estrategia para ser más eficientes. Diferencias, que en casos extremos las enzimas *per se*, pueden presentar cambios ligeros en aminoácidos que los lleven a cambios en sus estructuras moleculares conformacionales y no en su sitio activo (Hochachka y Somero, 1984).

Matus de la parra *et al.* (2007) encontraron que la lipasa del AAA presentó su óptimo de actividad a los 45° C, a diferencia de 40 en este trabajo. Esta aparente discrepancia puede deberse únicamente a que ellos no midieron la actividad en

intervalos de 10 grados mientras que aquí se midió cada cinco. Kurtovic y colaboradores (2010) caracterizaron dos lipasas provenientes de ciegos pilóricos de dos salmónidos, el chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) y hoki (*Macrurnus novaezelandiae*), en donde ambos mostraron tener una temperatura óptima de 35° C. Borlongan (1990) estudió las lipasas en el sabalote o pez de leche (*Chanos chanos*) utilizando emulsiones de aceite de olivo, y encontró una actividad máxima para la lipasa intestinal a los 45° C y un máximo de actividad de lipasa pancreática a 50° C. La lipasa del Pargo dorado *Sparus aurata* que es un pez de aguas templadas mostró una temperatura óptima de 50° C manteniéndose con un 80% de la actividad máxima entre 40 y 55° C (Nolasco et al., 2010).

Es así que puede decirse que las lipasas de los tres peces estudiados en este trabajo (AAA, LR y TM) mostraron óptimos cercanos, lo cual no es atribuible a que sean enzimas distintas, sino que su estructura responda diferencialmente a la temperatura.

Efecto del pH

Si bien el pH óptimo para las tres especies fue pH 8.0, en TM se observó que la actividad de lipasas se mantiene por arriba del 80% de actividad relativa del máximo a pH 9.0, mientras que en AAA y LR disminuyen drásticamente. En diversas especies como en el sabalote o pez de leche (*Chanos chanos*), salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) y hoki (*Macrurnus novaezelandiae*), así como la lobina *Sparus aurata* tienen un pH óptimo entre 8 y 8.5 (Nolasco et al., 2010; Borlongan, 1990; Kurtovic, 2010). Mientras que en el pargo *Pagrus major* se determinó un rango de actividad óptima de lipasas pancreáticas entre 7.0 y 9.0 de pH utilizando 4-nitro fenil miristato (Iijima et al., 1998) similar a lo encontrado para

TM. El pH al igual que la temperatura y/o fuerza iónica influye para la actividad óptima a una respuesta de la conformación molecular para el óptimo funcionamiento dentro del sitio activo de la enzima. Además de conferir el punto adecuado en donde la enzima pueda unirse al sustrato (Murray et al., 1990). Este doble papel en el pH para la actividad de las enzimas hace que sea mucho más sensible a los cambios de éste. Por esta razón se puede explicar el que el óptimo de actividad de pH para las tres enzimas sea el mismo, por tratarse del mismo tipo de sustrato que hidrolizan.

Efecto de sales biliares

Los máximos de actividad relativa por especie se obtuvieron con 6mM de taurocolato de sodio para AAA y TM mientras que para LR fue con 2M de NaCl. Lo que da lugar a pensar que la conformación molecular de ambos grupos de enzimas AAA y TM por un lado y LR por el otro, sean distintas en su punto de activación.

En peces marinos la dependencia de las lipasas por taurocolato de sodio (NaTC) se ha reportado en bacalao del Atlántico el cual requiere de 2 a 10 mM de NaTC para la hidrólisis de 4-nitrofenil caproato (Gjellesvik *et al.*, 1989), mientras que la lipasa de *Pagrus major* requiere 20 mM (Iijima, et al., 1998) y en *Sparus aurata* una concentración de 0.1 mM en tanto que una mayor concentración reduce su actividad (Nolasco et al., 2011).

En los ensayos en presencia de bilis natural de AAA, el comportamiento de la actividad de las lipasas de las distintas especies no mostró una tendencia homogénea.

Como ya fue mencionado, la mezcla de sales biliares comerciales de Sigma® no potenciaron la actividad enzimática de ninguna de las lipasas de los peces de este estudio. Los dos principales componentes de esta mezcla de sales son: 50 % de colato de sodio (sal biliar primaria) formada en el hígado y otros 50 de deoxicolato de sodio (sal biliar secundaria). Este hecho pudiera significar que éstas sales no presentan la capacidad aditiva de influir en la conformación, a las ya presentes en el ensayo de reacción. O bien, a que presenten una dependencia a la taurina y que estas sales comerciales no la tienen. Las sales en sí le confieren a las enzimas o proteínas en general, una mayor solubilidad para poder actuar e hidrolizar el sustrato de una manera independiente y eficiente evitando la interacción entre moléculas de proteína (Creighton, 2002). Mientras que las sales biliares además de servir como sales para solubilizar las proteínas, ayudan a la emulsificación de la grasa para hacerla más accesible a las lipasas para su posterior absorción por el intestino (Lombardo, 2001). Gjellesvik *et al.* (1989) reportan la dependencia absoluta de sales biliares principalmente taurocolato de sodio para la hidrólisis enzimática de lípidos insolubles en el bacalao del atlántico (*Gadus morhua*), así como para otras especies como el pargo (*Pagrus major*) en donde se demostró que la actividad se incrementa a medida que se adiciona colato o taurocolato de sodio utilizando p-nitrofenil miristato y trioleína como sustratos para lipasas.

Si bien en el presente trabajo la actividad del sustrato utilizado no requería de un proceso de emulsificación al utilizar el 4-nitro fenil caproato (sustrato sintético hidrosoluble), se estima que el taurocolato de sodio no solo actúa sobre el sustrato en el proceso digestivo, sino que también puede conferir a la enzima un arreglo o acomodo espacial que le permita acceder al sitio catalítico de mejor manera, así como ocurre con los activadores (Fersht, 1984). Efecto que se pudo observar para

AAA y TM, mientras que para la LR la fuerza iónica producida por el NaCl fue suficiente.

Efecto del cloruro de sodio sobre la actividad de lipasas

La sal de cloruro de sodio tuvo un efecto positivo sobre la actividad enzimática de lipasas pancreáticas de LR, esto se observó que al ir incrementado la concentración de NaCl (100 mM a 2 M) la actividad aumentó, donde el máximo de actividad se dio con la concentración más alta.

En *Sparus aurata* se ha observado que su óptimo de actividad de lipasas se da con 0.5 M de NaCl y decrece conforme aumenta la concentración de esta sal (Nolasco, et al., 2010). Las distintas respuestas de los peces hacia el cloruro de sodio no han sido justificadas por otros autores y solo se ha reportado si existe o no actividad en presencia de esta sal (Ijima *et al.*, 1997; Iijima *et al.*, 1998; Matus *et al.*, 2007; Chatzifotis *et al.*, 2008).

En LR su actividad máxima se presentó conforme aumenta la concentración de cloruro de sodio, es decir, su actividad es sumamente sensible a los cambios en la concentración de NaCl, presentando un efecto positivo sobre la actividad de lipasas pancreáticas, lo cual no ocurre en AAA y TM que son peces de origen marino. Esto podría ser explicado como una adaptación evolutiva al medio de agua dulce o de mar, ya que al estar expuesta a cambios de salinidad, como lo es en el medio marino, la actividad deberá ser constante y mantener un equilibrio sin que ésta sea afectada de acuerdo a la cantidad de agua que se ingiere para contrarrestar la osmoregulación (Evans, 1998).

Desde el punto de vista enzimático, no es de extrañarse que la actividad incremente cuando se le incremente la solubilidad a la enzima y de alguna manera que influya en sus cargas iónicas del exterior de la proteína. Con relación a la actividad y dependencia de sales para la actividad de la lipasa, en un estudio sobre el efecto del NaCl en el desempeño de la lobina asiática de agua dulce (*Lates calcarifer*) se demostró que cantidades del 1, 2 y 4% de NaCl adicionados en la dieta incrementó significativamente la eficiencia de conversión alimenticia y tasa específica de crecimiento (Harpaz, et al., 2005). En esos peces se midió la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina, lactasa, leucina aminopeptidasa y glutamil transpeptidasa en los enterocitos y se observó que la actividad se incrementa a medida que se aumenta la concentración de cloruro de sodio en la dieta. Lo anterior resulta interesante con respecto a la LR ya que se trata de un pez que mayormente se encuentra en agua dulce, y que sea sensible enzimáticamente a la concentración del NaCl, efecto que pudiera explicar el porque en la lipasa de la LR sea sensible al NaCl. La fuerza iónica, por lo general, incrementa la actividad de un gran número de enzimas debido al efecto que tiene sobre el incremento de la solubilidad como se mencionó anteriormente (Creighton, 2002) y a la disponibilidad de su sitio activo, propiedad que probablemente no se observe en enzimas expuestas al medio ambiente salino como las digestivas en peces de agua de mar.

Efecto del cloruro de calcio

En el presente estudio las lipasas no mostraron un efecto positivo con la adición de cloruro de calcio en los ensayos, contrario a los estudios en lipasas de mamíferos en donde la técnica estándar para la medición de la lipasa pancreática por lo general recomienda su utilización (Worthington, 1993) sugiriendo la presencia

de esta sal para activar a la enzima con la finalidad de obtener mayor actividad. Iijima *et al.* (1998) reportan un efecto similar en donde la lipasa del *Pagrus major* es independiente de Ca^{+2} . El ión calcio está implicado en muchos procesos reguladores de las células de los mamíferos, en donde cambios ligeros en su concentración están asociados a la contracción muscular, control de la actividad enzimática, hormonal, exocitosis de proteínas y neurotransmisores, entre otros (Martin, 1987).

Por otro lado, diversos autores han descrito que la adición de cloruro de calcio a ensayos con lipasas se asocia con la precipitación de los ácidos grasos que van siendo liberados por la hidrólisis del triglicérido, permitiendo así que la enzima no se sature y pueda seguir hidrolizando triglicéridos (Hu *et al.*, 2010; Anthonsen *et al.*, 1995; Winkler y Gubernator, 1994).

PURIFICACIÓN DE LA LIPASA DE ATÚN ALETA AZUL DEL PACÍFICO

La lipasa pancreática de AAA parcialmente purificada (1687.3% de purificación parcial). En este trabajo se obtuvo dicha purificación utilizando un intercambiador aniónico a un pH de 7, sistema que mostró ser eficiente ya que después de varias pruebas utilizando otras resinas y a otros pHs, éste nos dio buenos resultados en 2 días.

A través de técnicas de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS mostró un peso molecular es de aproximadamente 24 kDa, aparentemente inferior a lo reportado para la generalidad de las lipasas pancreáticas que es alrededor de 60 kDa como es el caso del bacalao y pargo (Gjellesvik *et al.*, 1992; Iijima *et al.*, 1998, respectivamente). Sin embargo, Nolasco y colaboradores (2010) caracterizan la

actividad de lipasas del pargo dorado *Sparus aurata* y observan la presencia de cuatro isoformas de la lipasa con masa molecular aparente de 34, 50, 68 y 84 kDa, sugiriendo que podría tratarse de una lipasa compuesta por dos péptidos 34 + 34 para formar la de 68 kDa o posiblemente 34 + 50 para formar la de 84 kDa. Kurtovic et al. (2010) determinaron mediante SDS-PAGE el peso molecular de dos lipasa de salmónidos, el salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) encontrando dos bandas en los geles, una de 79.6 y otra de 54.9 kDa por lo que infieren que puede tratarse de isoenzimas sin descartar que pudiera tratarse de un rompimiento proteolítico parcial durante el proceso de purificación, mientras que en el salmónido hoki (*Macrurus novaezelandiae*) encontraron una lipasa con peso molecular de 44.6 kDa, pudiéndose tratar de la lipasa mas pequeña encontrada en un pez hasta esa fecha. En el presente trabajo la lipasa encontrada es de 24 kDa, lo que haría que ésta fuera aún más pequeña que las antes descritas en peces. Lipasas menores han sido reportadas con anterioridad pero en invertebrados, en donde Park et al. (2007) determinaron por medio de SDS-PAGE el peso molecular de una lipasa purificada del calamar *Tadotes pacificus* de 27 kDa.

La lipasa aquí encontrada de 24 kDa no podría descartarse la opción de que se tratará de una lipasa con dos péptidos de similar tamaño lo que daría como resultado una molécula con 48 kDa.

IEF-PAGE

El punto isoeléctrico encontrado para esta lipasa resultó estar cercano a 8.15, el cual difiere de otras lipasas de peces como la lipasa de hoki (*Macrurus novaezelandiae*) con un punto isoeléctrico de 5.8 y para el salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) un punto isoeléctrico de 5.7 (Kurtovic, et al., 2010).

El punto isoeléctrico de una enzima es el pH en el cual su carga neta es igual a cero, sin embargo en este caso la lipasa de AAA coincide con el máximo de actividad relativa observado a pH 8.0.

Sin embargo, analizando cuidadosamente la purificación por medio de cromatografía de intercambio aniónico (matriz de dietil aminoetil celulosa cargada con cationes) revela que la proteína de nuestro interés o sea la lipasa de AAA debe de poseer un punto isoeléctrico menor a pH 7.0 ya que las condiciones de elusión así lo sugieren, de lo contrario ésta no sería retenida por la resina al tener ambas (la resina y la proteína) la misma carga positiva. Esto nos lleva a pensar que la banda observada en el gel a un pI de 8.15 se trate de algún artefacto de la electroforesis. Vale la pena comentar que se hicieron cerca de 10 geles más bajo distintas condiciones sin tener un resultado satisfactorio que nos pueda dar una mayor información. De acuerdo a Hames 2002, existen una gran serie de artefactos que pueden interferir en el corrimiento del punto isoeléctrico como: los anfolitos utilizados, dióxido de carbono atmosférico, el buffer donde esta contenida la proteína, el punto de aplicación del peine puede precipitar las proteínas agregándolas impidiendo su adecuado corrimiento, entre otros. Por lo tanto este resultado hay que tomarlo con mucha reserva y se recomiendan hacer mas pruebas.

Conclusiones

- Las lipasas de TM, AAA Y LR presentaron distintos óptimos de actividad con respecto a la temperatura 45, 40 y 35° C respectivamente. Y las tres mostraron un pH óptimo de 8.
- El taurocolato de sodio es un activador importante para las lipasas del AAA y TM.
- La lipasa de la LR es sensible a la presencia del NaCl, en donde su actividad es directamente proporcional a la concentración de dicha sal.
- Las sales biliares comerciales (colato y deoxicolato de sodio) sin conjugación con la taurina disminuyeron la actividad de las tres lipasas.
- La bilis natural del AAA no mostró un efecto o un patrón de respuesta consistente como para caracterizar la actividad de las lipasas de las tres especies.
- La presencia del cloruro de calcio mostró un efecto negativo sobre la actividad de las tres lipasas en extractos crudos.
- La lipasa parcialmente purificada del AAA mostró un peso molecular de 24 kDa y un punto isoeléctrico de 8.15.

Recomendaciones:

Se sugiere purificar las tres enzimas y estudiar su conformación molecular para conocer a fondo sus propiedades catalíticas.

Corroborar el peso molecular de la lipasa de AAA y comprobar que sea ese su peso molecular y que no se trate de un dímero.

Corrobora el punto isoeléctrico de la enzima evitando los artefactos anteriormente descritos.

Bibliografia

- Anthonsen, H. W., Baptista, A., Drablos, F., Martel, P., Petersen, S. B., Sebastiao, M., Vaz, L. 1995. Lipases and esterases: a review of their sequences, structure and evolution. In: Biotechnology annual review. Gewely M. R. (ed) Elsevier, Amsterdam, pp 315–371.
- Arakawa, T., Timasheff, S. N. 1984. Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding. *Biochemistry*. 23 (25), 5912-5923.
- Arts, M. T., Brett, M. T., Kainz, M. J. 2009. Lipids in aquatic ecosystems. Springer, New York. 377pp.
- Bacha, A. B., Gargouri, Y., Ali, Y. B., Miled, N., Reinbolt, J., Mejdoub, H. 2005. Purification and biochemical characterization of ostrich pancreatic lipase. *Enzyme and Microbial Technology* 37:309-317.
- Bacha, A. B., Karray, A., Daoud, L., Bouchaala, E., Ali, M. B., Gargouri, Y., Ali, Y. B. 2011. Biochemical properties of pancreatic colipase from the common stingray *Dasyatis pastinaca*. *Lipids in Health and Disease*, 10: 69.
- Baldissero Tmo, B., Mimura, O. M., and Salomao, L. C. 1990. Gallbladder bile and plasma ionic content of some freshwater teleosts. *Bol. Fisiol. Anim. Univ. Sao Paulo* 14: 7-11.
- Benjamin, S., Pandey, A. 2000. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Brazilian archives of Biology and Technology* VOL.43, No.5, 453-460.
- Biswas, B. K., Ji, S. C., Biswas, A. K., Seoka, M., Kim, Y. S., Kawasaki, K. I., Takii, K. 2009. Dietary protein and lipid requirements for the Pacific bluefin tuna

- Thunnus orientalis* juvenile. Aquaculture 288:114-119.
- Borlongan, I. G. 1990. Studies on the digestive lipases of milkfish, *Chanos chanos*. Aquaculture 89, 315-325.
- Bornscheuer, U. T. 2002. Microbial carboxyl esterasesL classification, properties and application in biocatalysis. FEMS Microbiology Reviews 26: 73-81.
- Burgess, R. R., Deutscher, M. P. 2009. Purification procedures, in: Guide to protein purification Jungbauer, A., and Hahn R. (eds). Elsevier, 347-370.
- Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tilley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Huger-Jensen, B., Norskov, L., Thim, L., Menge, U. 1990. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. Nature 343: 767-770.
- Canaan, Z. Zadori, F. Ghomashchi, J. Bollinger, M. Sadilek, M.E. Moreau, P. Tijssen, M.H. Gelb. 2004. Interfacial enzymology of parvovirus phospholipases A2, J. Biol. Chem 279: 14502–14508.
- Carrière, F., Bezzine, S., Verger, R. 1997. Molecular evolution of the pancreatic lipase and two related enzymes towards different substrate selectivities, J. Mol. Catal. B: Enzym 3: 55–64.
- Chatzifotis, S., Polemitou, I., Divanach, P., Antonopoulou, E. 2008. Effect of dietary taurine supplementation on growth performance and bile salt activated lipase activity of common dentex, *Dentex dentex*, fed a fish meal/soy protein concentrate-based diet. Aquaculture 275, 201–208.
- Creighton, T. E. 2002. Stabilization of protein structures by solvents, In: Protein Structure. IRL Press. p349-373.

- Das, K. M., Tripathi, S. D. 1991. Studies on the digestive enzymes of grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Aquaculture*, 92: 21-32.
- Einarsson, S., Davies, P. 1997. A multiductal system conveys digestive enzymes from the pancreas into the intestine in the Atlantic Salmon. *J. Fish Biol.* 50, 1120.
- Evans, D. H. 1998. Osmotic and ionic regulations, In: *The physiology of fishes*. 2nd Edition. CRC press. New York. p159.
- Fänge, R., Grove, D. 1979. Digestion. In: *Fish Physiology*. Vol. VIII. (Hoar, W. S., Randall, D. J., J. R. Brett, J. R.). New York. Academic Press. pp. 161-260.
- Fersht, A. 1985. Chemical catalysis. In: *Enzyme structure and mechanism*. W. H. Freeman and company. p47-94.
- Fojan, P., Jonson, P. H., Petersen, M. T. N., Petersen, S. B. 2000. What distinguishes and esterase from lipase: A novel structural approach. *Biochimie* 82, 1033-1041.
- Gilbert, E.J. 1993. Pseudomonas lipases: biochemical properties and molecular cloning, *Enzyme Microb. Technol.* 15: 634–645.
- Ghosh, A. 1976. Digestive enzymes and their correlation with the food habits in the catfish *Clarius batrachus*. *J. Inland. Fish. Soc. India*, 8: 137-139.
- Gjellesvik, D. R., Lombardo, D., Walther, B. T. 1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1124, 123-134.
- Gjellesvik, D. R., Lorens, J. B., Male, R. 1994. Pancreatic carboxylester lipase from Atlantic salmon *Salmo salar* cDNA sequence and computer-assisted modelling of tertiary structure. *Eur. J. Biochem.* 226, 603-612.

- Gjellesvik, D. R., Raae, A. J., Walther, B. T. 1989. Partial purification and characterisation of a triglyceride lipase from cod *Gadus morhua*. *Aquaculture* 79, 177-184.
- Hames, B. D., 2002. Conventional isoelectric focusing in gel slabs, in capillaries, and immobilized pH gradients in: Gel Electrophoresis of Proteins. Third Edition. Oxford university press. 352 pp.
- Harpaz, S., Hakim, Y., Slosman, T., Eroldogan, O. T. 2005. Effects of adding salt to the diet of Asian sea bass *Lateolabrax niloticus* reared in fresh or salt water recirculating tanks, on growth and brush border enzyme activity. *Aquaculture* 248, 315-324.
- Hochachka, P. W., Somero, G. N. 1984. Biochemical adaptation. Princeton University Press. Princeton, New Jersey. 522 pp.
- Hu, M., Li, Y., Decker, E. A., McClements, D. J. 2010. Role of calcium and calcium-binding agents on the lipase digestibility of emulsified lipids using an *in Vitro* digestion model. *Food Hydrocolloids* 24:719-725.
- Iijima, N., Chosa, S., Uematsu, K., Goto, T., Hoshita, T., Kayama, M. 1997. Purification and characterization of phospholipase A2 from the pyloric caeca of red sea bream *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.* 16:487–498.
- Iijima, N., Tanaka, S., Ota, Y. 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.* 18, 59-69.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., B.W. Dijkstra, B.W., Colson, C., Heuvel, M. V., Misset, O. 1994. Bacterial lipases, *FEMS Microbiology Reviews* 15: 29–63.

- Kim, S. K., Matsunari, H., Takeuchi, T., Yokovama, M., Murata, Y., Ishihara, K. 2007. Effect of different dietary taurine levels on the conjugated bile acid composition and growth performance of juvenile and fingerling Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 273:595-601.
- Koven, W. M., Henderson, R. J., Sargent, J. R. 1994a. Lipid digestion in turbot *Scophthalmus maximus*. 1: Lipid class and fatty acid composition of digesta from different segments of the digestive tract. *Fish Physiol. Biochem.*, 13, 69-79.
- Koven, W. M., Henderson, R. J., Sargent, J. R. 1994b. Lipid digestion in turbot *Scophthalmus maximus*. 2. Lipolysis in vitro of ¹⁴C-labelled triacylglycerol, cholesterol ester and phosphatidylcholine by digesta from different segments of the digestive tract. *Fish Physiol. Biochem.*, 13, 275-283.
- Kurtovic, I., Marshall, S. N., Zhao, X., Simpson, B. K. 2010. Purification and properties of digestive lipases from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawitscha*) and New Zealand hoki (*Macruronus novazelandiae*). *Fish Physiol Biochem*, 36:1041-1060.
- Lagler, K. F., Bardach, J. E., Miller, R. R., Passino, D. R. M. 1977. *Ichthyology*. John Wiley & Sons, New York. 550 pp.
- Lentner, C. 1981. "Geigy Scientific Tables, Vol. 1." Ciba-Geigy, Basel. 600 pp.
- Lombardo, D. 2001. Bile salt-dependent lipase: its pathophysiological implications. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1533:1-28.
- Martin, B. R. 1987. Metabolic integration, In: *Metabolic Regulations*. Blackwell Scientific Publications. p170.

- Matus de la Parra, A., Rosas, A., Lazo, J. P., Viana, M. T. 2007 Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. *Fish Physiol. Biochem.* 33:223–231.
- Morohoshi, T., Oikawa, M., Sato, S., Kikuchi, N., Kato, N., Ikeda, T. 2011. Isolation and characterization of novel lipases from a metagenomic library of the microbial community in the pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes hybrida*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* VOL. 112 No. 4, 315-320.
- Mukherjee, K.D., Hills, M.J. 1994. Lipases from plants, in: *Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application* S.B. Petersen (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge. pp. 49–75.
- Mukundan, M. K., Gopakumar, K., Nair, M. R. 1985. Purification of a lipase from the hepatopancreas of oil sardine (*Sardinella longiceps* Linnaeus) and its characteristics and properties. *J. Sci. Food Agric.*, 36, 191-203.
- Murray, R. K., Mayes, P. A., Granner, D. K., Rodwell, V. W. 1990. Enzyme kinetics. In: *Harpers Biochemistry* (Rodwell, V. W. Eds), p68-81.
- Mørkøre, T., Ytrestøyl, T., Ruyter, B., 2008. Leverkvalitet hos oppdrettstorsk. In: *Nofima Rapport 33/2008*, Utgitt oktober 2008. Tromsø, Norge. 37 pp.
- Natalia, Y., Hashim, R., Ali, A., Chong, A. 2004. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquaculture*. 233:305-320.
- National Research Council (2011) *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. National Academies Press, Washington, DC.

- Nolasco, H., Moyano-López, F., Vega-Villasante, F. 2011. Partial characterization of pyloric-duodenal lipase of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol Biochem*, 37:43-52.
- Olsen, R. E., Ringoe, E. 1997. Lipid digestibility in: fish: A review. *Recent Res. Devel. in Lipids Res.* 1: 199-265.
- Park, J., Cho, S. Y., Choi, S. J. 2007. Purification and characterization of hepatic lipase from *Todares pacificus*. *BMP Reports* 32:254-258.
- Pinsirodon, P., K. L. Parkin. 2001. Lipase essays In: *Current protocols in food analytical chemistry* (Wrolstad. R. E.). John Wiley & Sons, Inc.C3.1.1-C3.1.13.
- Ram, P. C., Srivastava, K. N., Lodha, M. L., Mehta, S. L. 1986. Purification and characterization of proteolytic enzymes from normal and opaque-2 *Zea mays* L. Developing endosperms. *J. Biosci.*, VOL. 10, No. 2, 257-266.
- Rawless, S. D., Richie, M., Gaylord, T. G., Webb, J., Freeman, D. W., Davis, M. 2006. Evaluation of poultry by-product meal in commercial diets for hybrid striped bass (*Moronoe chrysops* ♀ × *M. saxatilis* ♂) in recirculating tank production. *Aquaculture*, 259, 377-389.
- Rueda-López, S., Lazo, J. P., Correa-Reyes, G., Viana, M. T. 2011. Effect of dietary protein and energy levels on growth, survival and body composition of juvenile *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture* 319;385-390.
- Rugani, N., Carrière, F., Thim, L., Borgstrom, B., Sarda, L. 1995. Lipid binding and activating properties of porcine pancreatic colipase split at the Ile79-Thr80 bond. *Biochim Biophys Acta* 15;1247(2):185-94.
- Russell, D. W. 2003. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis.

- Annu. Rev. Biochem. 72, 137-174.
- Rust, M. B. 2002. Nutritional Physiology In: *Fish Nutrition*, third edition. (Halver, J. E., Ed.). San Diego. Academic Press. 407 pp.
- Segel, i. H. 1975. Enzyme Activation. In: *Enzyme Kinetics, Behavior and Analysis of rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. p227.
- Schmid, R. D., Verger, R. 1998. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37: 1608-1633.
- Sigurgisladottir, S., Lall, S. P., Parrish, C. C., Ackman, R. G. 1992. Cholestane as a digestibility marker in the absorption of polyunsaturated fatty acid ethyl esters in Atlantic salmon. *Lipids*, 27, 418-424.
- Smichi, N., Fendri, A., Zarai, Z., Bouchaala, E., Cherif, S., Gargouri, Y., Miled, N. 2012. Lipolytic activity levels and colipase presence in digestive glands of some marine animals. *Fish Physiol Biochem* 38: 1449-1458.
- Smith, L. S. 1989. Nutritional Physiology In: *Fish Nutrition*, second edition. (Halver, J. E., Ed.). San Diego. Academic Press 406-411.
- Teshima, S. I., Ishikawa, M., Koshio, S., Yunoki, M., Kanazawa, A., Hayashida, S. 1999. Metabolism of ursodeoxycholic acid in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) *Aquaculture* 179, 365.
- Tilbeurgh, H. V., Marie-Pierre, E., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R., Cambillau, C. 1993. Interfacial activation of the lipase–procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature* 362: 814-820.
- Tocher, D. R., Sargent, J. R. 1984. Studies on triacylglycerol, wax ester and sterol ester hydrolases in intestinal caeca of rainbow trout (*Salmo gairdneri*, L.)

fed diets rich in triacylglycerols and wax esters. *Comp.Biochem.Physiol.*, 77B, 561-571.

Verger, R. 1984. Pancreatic lipase. In *Lipases*. Edited by Borgstrom, B. And Brockman, H. L. Elsevier, Amsterdam.. pp. 83-15.

Vessey, D. A., Benfamo, A. M., Zerweck E., Vestweber. C. 1990. Purification and characterization of the enzymes of bile acid conjugation from fish liver. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B:647–652.

Winkler, F.K., D’Arcy, A., Hunziker, W., 1990. Structure of human pancreatic lipase. *Nature* 343: 771–774.

Winkler, F. K., Gubernator, K. 1994. Structure and mechanism of human pancreatic lipase. In: *Lipases their structure, biochemistry and application* (Wooley P, Petersen S.B., Eds).Cambridge University Press, Cambridge, pp. 139–157.

Worthington, V. 1993. Lipases, In: *Enzymes related biochemicals*. Library of congress cataloging. New Jersey, p243-246.

Yasutake, W. T., Wales, J. H. 1983. *Microscopic anatomy of salmonids: an atlas*. U.S. Fish and Wildlife Service Resource Publication 150, US Department of interior, Washington, DC.