

## Digestibilidad *in vitro* de Lípidos Alimentarios para el Camarón

Héctor Nolasco\*<sup>1</sup>, Alberto del Monte Martínez<sup>2</sup>, Patricia Hinojosa<sup>1</sup>, Roberto Civera-Cerecedo<sup>1</sup>, Fernando Vega-Villasante<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.,  
Mar Bermejo # 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, 23090, B.C.S.,  
[hnolasco04@cibnor.mx](mailto:hnolasco04@cibnor.mx)

<sup>2</sup>Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

<sup>3</sup>Centro Universitario de La Costa, Universidad de Guadalajara, Puerto Vallarta, Jalisco, México.

---

### Resumen

Los principales polímeros presentes en los alimentos para camarón son proteínas, carbohidratos y lípidos, los cuales representan también el mayor porcentaje en peso de la formulación. La digestión de estos polímeros, que ocurre en el tracto digestivo del camarón, permite la obtención de los monómeros alimentarios tales como los aminoácidos, azúcares y ácidos grasos para su absorción y aprovechamiento. Los métodos de digestibilidad *in vitro* han sido de mayor utilidad como herramientas complementarias para la predicción de la digestibilidad, así como la obtención de la correlación con la digestibilidad *in vivo*, de los alimentos y de los nutrientes utilizados para su formulación. La tendencia de modificación en los métodos de digestibilidad de proteína *in vitro* es sustituir la enzima o el sistema multienzimático de origen de mamíferos o de microorganismos, por enzimas del propio organismo en estudio. La digestibilidad de lípidos en alimentos para organismos acuáticos, y en particular para el camarón, ha recibido poca atención y hasta donde sabemos, no se cuenta actualmente con un método oficial para hacer este tipo de determinaciones, lo cual sería de utilidad para seleccionar las fuentes lipídicas a utilizar en los alimentos balanceados. Se desarrolló un método para medir la digestibilidad *in vitro* de lípidos, considerando las propiedades de las lipasas del camarón (*Litopenaeus vannamei*) y las condiciones de ensayo. El método tiene al menos 4 aplicaciones básicas: 1. Conocer la actividad lipasa utilizando substratos naturales, como triglicéridos y fosfolípidos. 2. Conocer la velocidad de digestión de diferentes insumos lipídicos por la especie, en función de su origen, composición, longitud de ácidos grasos asociados, calidad de los lípidos, etc. 3. Conocer la digestibilidad relativa respecto a un lípido de referencia, y 4. Hacer correlaciones de digestibilidad *in vivo* e *in vitro*. Esta información complementaria puede ser útil para la selección de insumos lipídicos para la formulación de alimentos para acuicultura.

## Introducción

Los principales polímeros presentes en los alimentos para camarón son proteínas, carbohidratos y lípidos, los cuales representan también el mayor porcentaje en peso de la formulación (Akiyama *et al.*, 1991). La digestión que ocurre en el tracto digestivo del camarón permite la obtención de los monómeros alimentarios tales como los aminoácidos, azúcares y ácidos grasos (Nolasco *et al.*, 2000). Estos monómeros, además de los que ya vienen libres en la dieta, representan la principal fracción que potencialmente será asimilada y metabolizada a partir del alimento formulado y del alimento natural disponible (Akiyama *et al.*; 1991, Shiau, 1997).

Se han desarrollado métodos de digestibilidad *in vitro* de proteína para tratar de sustituir a los métodos de digestibilidad *in vivo* (Marleta, *et al.*, 1992, Forrellat, 1998), sin embargo, estos hasta ahora han sido de mayor utilidad como herramientas complementarias para la predicción de la digestibilidad, así como la obtención de la correlación con la digestibilidad *in vivo*, de los alimentos y de los nutrientes utilizados para su formulación.

La tendencia de modificación en los métodos de digestibilidad de proteína *in vitro* es sustituir la enzima (Despamde, 1987) o el sistema multienzimático (Hsu, *et al.*, 1977) de origen de mamíferos o de microorganismos, por enzimas del propio organismo en estudio (Forrellat, 1998), de tal manera que los resultados de digestibilidad de la proteína de un ingrediente o de un alimento sean obtenidos con sus propias enzimas.

En virtud de que la principal especie cultivada en México y en América es el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Cuzon *et al.*, 2004), la preparación enzimática a utilizarse para la determinación de la digestibilidad *in vitro* se propone sea obtenida de esta especie de camarón. Si el método quiere aplicarse para otra especie, es indispensable o recomendable cambiar al correspondiente sistema enzimático; así mismo, se recomienda conocer la fisiología digestiva del organismo.

La digestibilidad de lípidos en alimentos para organismos acuáticos, y en particular para el camarón, ha recibido poca atención y hasta donde sabemos, no se cuenta actualmente con un método oficial para hacer este tipo de determinaciones, lo cual sería de utilidad para seleccionar las fuentes lipídicas a utilizar en los alimentos balanceados. El presente estudio describe el método desarrollado por el Grupo de Nutrición del CIBNOR para medir la digestibilidad *in vitro* de lípidos, para lo cual se realizó previamente la caracterización de las enzimas del organismo, a fin de poder establecer las condiciones necesarias en el protocolo de digestibilidad *in vitro*.

## Las Lipasas

Dentro de la amplia gama de enzimas hidrolíticas, se encuentran aquellas que catalizan la hidrólisis del enlace éster: las esterasas. Estas enzimas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y entre ellas se diferencian en las que hidrolizan ésteres carboxílicos o carboxiesterasas como las lipasas, las que hidrolizan ésteres tiólicos o tioesterasas como la acetilCoA hidrolasa, y las que hidrolizan monoésteres del ácido fosfórico (Colowick y Kaplan, 1955; Lehninger, A. 1979; Chávez *et al.* 1990).

Héctor Nolasco, Alberto del Monte Martínez, Patricia Hinojosa, Roberto Civera-Cerecedo, Fernando Vega-Villasante. 2006. Digestibilidad *in vitro* de Lípidos Alimentarios para el Camarón. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15 - 17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.

Las lipasas o glicerol éster hidrolasas (E.C. 3.1.1.3) han sido diferenciadas de las esterasas, principalmente sobre la base de su relativa especificidad preferencial. Los sustratos naturales para las lipasas son aceites y grasas, como los triacilglicéridos de ácidos grasos de cadena larga, mientras que las esterasas actúan sobre ésteres simples de ácidos de bajo peso molecular (Colowick y Kaplan, 1955). Las lipasas están ampliamente distribuidas en las plantas y los animales, son también producidas de forma endógena y exógena por muchos microorganismos naturales o que han sido manipulados genéticamente (Balcao *et al.*, 1996; Bornscheuer *et al.*, 1994).

Además de hidrolizar ésteres de triacilglicéridos, ellas pueden catalizar la reacción inversa, o sea, la síntesis de ésteres. Por otro lado, dependiendo del punto de partida en términos de sustrato, pueden catalizar la acidolisis, alcoholisis y transesterificación (Balcao *et al.*, 1996).

Las lipasas son enzimas únicas que requieren de activación interfacial para desplegar a totalidad su actividad catalítica. Se entiende por interfase, a la superficie imaginaria que separa dos fases físicamente distintas, las cuales, en el ámbito molecular consisten de un juego de dos capas adyacentes de moléculas de diferente carácter hidrofóbico/hidrofílico. Este fenómeno fue observado por varios autores antes de la mitad del siglo pasado (Holwerda *et al.*, 1936; Schonheyder y Volquartz, 1945), pero fue definido por Sarda y Desnuelle en 1958.

Este fenómeno se ha comprobado por elucidación de la estructura tridimensional de algunas lipasas y esterasas por cristalografía de rayos X (Grochulski *et al.*, 1993; Schrag *et al.*, 1991; Noble *et al.*, 1993; Winkler *et al.*, 1990). Un gran número de lipasas y esterasas resueltas hasta ahora tienen un plegamiento  $\alpha/\beta$ -hidrolasa, consistente en una parte central de ocho miembros de hoja  $\beta$  con varias  $\alpha$ -hélices empaquetadas a ambos lados de la hoja. Es común para todas las lipasas la presencia de una  $\alpha$ -hélice (denominada “tapadera”) cubriendo el centro activo, y que se desplaza (se abre) durante la activación interfacial, permitiendo el acceso al hasta ese momento inaccesible sitio activo (Brzozowski *et al.*, 1991).

La estructura nativa de las lipasas está constituida por un sistema dinámico de interconversión entre dos estructuras proteicas bien diferentes: la estructura cerrada, que es predominante en ambientes homogéneos, y la estructura abierta, que es estabilizada por la presencia de interfases hidrofóbicas (Mingarro *et al.*, 1995). La actividad esterásica de las lipasas en sistemas homogéneos parece ser debida a cierto grado de interconversión entre la estructura cerrada y abierta (Guisán *et al.*, 1996).

La masa molecular de las lipasas varía de acuerdo con la fuente entre 27,000 y 60,000 Da (Sztajer *et al.*, 1991; Tietz y Shuey, 1993; Wu *et al.*, 1996; Rúa *et al.*, 1993; Tomizuka *et al.*, 1966) y el punto isoeléctrico va de 3.8 a 7.0 para las diferentes enzimas e isoenzimas aisladas de diversas fuentes (Lotti y Alberghina, 1996; Wu *et al.*, 1996; Longhi *et al.*, 1992; Lotti *et al.*, 1993).

El sitio activo de las lipasas posee una tríada catalítica compuesta por los aminoácidos Ser-His-Asp/Glu, embebida en un ambiente de aminoácidos hidrofóbicos primarios y cubierto por una  $\alpha$ -

hélice anfifílica (Lotti y Alberghina, 1996; Malcata, 1996; Ransac *et al.*, 1996). Esta característica es común a todas las lipasas.

Además de este centro activo, algunos autores han encontrado para la lipasa pancreática humana y porcina un grupo de residuos aminoacídicos localizados en la región C-terminal y que actúa, presumiblemente, como un sitio catalítico mínimo para la hidrólisis de sustratos solubles como los ésteres del p-nitrofenol (pNPA) (Kordel y Schmid, 1991; De Caro *et al.*, 1986).

De las características estructurales de las lipasas, se puede deducir que la zona hidrofóbica cercana al centro activo puede interactuar con cualquier sustancia de su misma naturaleza, que esté presente en el medio de reacción y por consiguiente, también con las zonas hidrofóbicas de otras moléculas de enzima, promoviendo la formación de agregados. Estos agregados presentarán baja o ninguna actividad catalítica, al ser las mismas moléculas de enzima las que bloquean sus centros activos. Este fenómeno ha sido demostrado experimentalmente (Flaschel y Renken, 1991; Guisán *et al.*, 1996) encontrando que al aumentar la concentración de enzima, la actividad enzimática disminuye rápidamente por la formación de estos agregados.

Por analogía con el mecanismo asociado con la catálisis por otras serín hidrolasas, se ha sugerido que la acción hidrolítica de las lipasas sigue un mecanismo de acción de dos pasos, usualmente referido como “ping-pong bi-bi” (Balcao y Malcata, 1996; Malcata, 1996; Ransac *et al.*, 1996).

Las lipasas han sido definidas como específicas para la catálisis de acilglicérol de ácidos grasos de cadena larga, que son sus sustratos naturales (Jensen y Hamosh, 1996, Jensen *et al.*, 1994). Los ésteres de glicerol de cadena corta son hidrolizados más rápido que los de cadena larga, aunque son sustratos menos específicos (Tietz y Shuey, 1993). Por otra parte, el número de ácidos grasos esterificados al glicerol también influye en la especificidad de estas enzimas. Esto se ha comprobado con la lipasa de páncreas porcino donde la  $K_M$  para la tributirina es menor que con di y monobutirina (Colowick y Kaplan, 1955).

Se han estudiado lipasas utilizando ésteres de p-nitrofenol con diferentes longitudes de cadena (Cernia *et al.*, 1991). Estos autores encontraron que la lipasa de *Candida cylindracea* (*C. rugosa*) era más afín por ésteres de p-nitrofenol de 8 a 12 átomos de carbono.

La especificidad de las lipasas por los ésteres carboxílicos insolubles en agua se ve afectada por la selectividad de estas enzimas. En la actualidad se definen cinco tipos de selectividad (Jensen y Hamosh, 1996) de acuerdo a:

- A la clase de lípidos: triacilglicérol, diacilglicérol o monoacilglicérol (Lykidis *et al.*, 1994).
- Posición o región del ácido graso en la molécula del éster (Rogelaka *et al.*, 1993).
- Selección de grupos de ácidos grasos similares en un triacilglicérido, también llamada tiposelectividad (Jensen *et al.*, 1994).
- Selección de una posición estereoespecífica del glicerol sobre otra (Morley y Kuksis, 1974).
- La combinación de las cuatro anteriores (Staggers *et al.*, 1981).

Un gran número de extractos de diferentes organismos han sido investigados (Colowick y Kaplan, 1955) para la detección de actividad lipásica. Berner y Hammond en 1970 estudiaron 26 especies de organismos marinos de varios Phyla, encontrando actividad lipásica verdadera en la mitad de las especies examinadas, mientras que la actividad esterasa fue demostrada para todas.

Erdmann y colaboradores (1991) investigaron actividades enzimáticas de 68 extractos proteicos de diferentes fuentes utilizando sustratos como trioleína, tributirina, p-NPP (para-nitrofenil fosfato) y p-NPB (para-nitrofenil butirato). Estos autores encontraron actividad lipásica en diez extractos que coincidieron con la presencia de actividad para los sustratos no específicos p-NPP y p-NPB.

Las investigaciones iniciadas en el aislamiento y aplicación de las esterasas presentes en organismos marinos (Del Monte *et al.*, 1997<sup>a,b</sup>) utilizando los protocolos informados en la literatura un año más tarde (Fernández-Lafuente *et al.*, 1998) han permitido el esclarecimiento de aspectos en el aislamiento y la caracterización de los extractos enzimáticos solubles y los biocatalizadores inmovilizados con buenas perspectivas para su utilización en reacciones de bioconversión.

En nuestro caso particular, se ha seleccionado como modelo de estudio a un organismo marino de alto interés comercial, por lo que es importante el conocer las propiedades de las enzimas digestivas de estos peneidos dada la fundamental participación de estas en la digestión del alimento, que es uno de los insumos más costosos para los acuacultores. En el caso de los peneidos, la simple demostración de la presencia de lipasas es un logro importante dada la controversia generada al respecto. El conocer las características y propiedades de las lipasas de los peneidos de interés acuacultural es importante *per se*; sin embargo, abre la posibilidad de utilizar esta información en la optimización de la formulación de alimentos (calidad de lípidos incluidos) suministrados durante su cultivo. El origen marino de los mismos, abre la posibilidad de encontrar nuevas moléculas con propiedades catalíticas potencialmente aplicables en la industria.

Considerando la ubicuidad de los lípidos dietarios y su metabolismo en los organismos marinos (incluyendo crustáceos), planteamos que el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* tiene actividad enzimática lipásica. Dichas enzimas (lipasas) tienen el potencial de utilizarse como reactivo biológico para la determinación de digestibilidad *in vitro* de lípidos alimentarios para el propio camarón.

### **Lipasas en crustáceos**

Las lipasas han sido encontradas en muchas especies (Berner y Hammond, 1970) pero pocos estudios se han reportado en crustáceos decápodos. El primer reporte de la presencia de una lipasa verdadera (glicerol ester hidrolasa E.C. 3.1.1.3) en decápodos fue en adultos de *Homarus americanus* (Brockeroff *et al.*, 1970) confirmando la digestión de trioleína en el jugo gástrico. Hoyle (1973) reportó actividad lipasa en el jugo estomacal de *H. americanus* usando el mismo sustrato. Lee y Lawrence (1985) encontraron actividad lipasa en el sistema digestivo de *Litopenaeus setiferus* usando tributirina como sustrato. Biesot y Capuzzo (1990a, b) usaron

Héctor Nolasco, Alberto del Monte Martínez, Patricia Hinojosa, Roberto Civera-Cerecedo, Fernando Vega-Villasante. 2006. Digestibilidad *in vitro* de Lípidos Alimentarios para el Camarón. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. Avances en Nutrición Acuícola VIII .VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15 - 17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.

trioleína para determinar la actividad lipasa en larvas de *H. americanus* y observaron la liberación de ácido oleico. González y colaboradores (1994) encontraron alta actividad lipasa en el estadio protozoa de *Litopenaeus schmitti*. González-Baró *et al.* (2000) estudiaron la actividad lipasa en diferentes estadios del desarrollo embrionario de *Macrobrachium borellii* y encontraron una alta actividad en la fracción microsomal. Moss *et al.* (2001) encontraron actividad lipasa en la glándula digestiva de *Litopenaeus vannamei* usando Beta-naftil nanonato como sustrato.

Bowen y Sterling (1978) en un estudio electroforético, encontraron dos esterasas en quince poblaciones de *Artemia* spp., pero no reportaron las masas moleculares de las enzimas. Sevilla y Lagarrigue (1975) no encontraron actividad lipasa en el tracto digestivo de varios isópodos terrestres y acuáticos, solo actividad esterasa. Sambhu y Jayaprakas (1997a, b) encontraron que la testosterona en los alimentos producía un incremento en la actividad lipasa de la glándula digestiva y estómago de *Penaeus indicus*. En contraste, altas concentraciones de la hormona gonadotropina coriónica redujeron la actividad lipasa.

La actividad lipasa/esterasa ha sido localizada en el borde de cepillo de las células R, en las vacuolas de las células B, en las vacuolas supranucleares de las células F, en el lumen del túbulo de la glándula digestiva y en el tejido interconectivo intertubular de varias especies (Gibson y Barker, 1979; Vogt, 2002). Deering y Hewitt (1996) estudiaron la glándula digestiva de *Penaeus monodon* e indicaron la especificidad de la acción lipolítica en la posición 1 del sustrato trioleína. Loizzi y Peterson (1971) localizaron en *Procambarus clarkii* los sitios de actividad lipolítica, incluyendo el lumen de los túmulos, las vacuolas de las células B y los bordes estriados de las células F. Berner y Hammond (1970) reportaron actividad lipasa en la glándula digestiva de *Cambarus viriles*, usando Tween 60 como sustrato. Figuereido *et al.* (2001) reportaron actividad lipolítica en el jugo gástrico de adultos de *Cherax quadricarinatus*, usando trioleína como sustrato. López-López *et al.* (2003) realizaron una caracterización parcial de la actividad esterasa-lipasa de juveniles de *Cherax quadricarinatus* y respuesta a diferentes dietas (López-López, *et al.*, 2005).

La actividad lipasa ha sido reportada en *Homarus americanus* y en especímenes de los géneros de importancia acuacultural como *Litopenaeus*, *Penaeus*, *Palaemon*, *Macrobrachium* y *Cherax*.

La lipasa de *L. vannamei*, ha indicado que disminuye su actividad con el incremento de la longitud de los ácidos grasos, al utilizar sustratos sintéticos de la serie para-nitro fenil y betanaftil. La presencia de Tauracolato de sodio y calcio incrementa su actividad contra sustratos de cadena larga. La lipasa es activa en presencia de NaCl, con un pH óptimo cercano a 8 y con pérdida de estabilidad a temperaturas superiores a 35 °C (Nolasco *et al.*, 2004). Análisis electroforéticos indican que al menos hay una banda con actividad lipasa (Del Monte *et al.*, 2003).

### **Fuente de enzimas para los estudios de digestibilidad *in vitro*.**

Las enzimas digestivas utilizadas para técnicas de digestibilidad *in vitro* para camarón, son obtenidas a partir de organismos juveniles o preadultos de (10-17 gr), en estadio C de intermuda (Vega-Villasante *et al.*, 1999, 2000; Fernández *et al.*, 1999) y sacrificados por congelación, a una

misma hora establecida en función del ritmo circadiano de enzimas digestivas (Nolasco y Vega-Villasante, 2000, López-López *et al.*, 2003), que corresponda a un pico de actividad enzimática.

### **Diseño del Método de Digestibilidad *in vitro***

#### **Preparación de la mezcla enzimática de camarón**

Los camarones son pesados de manera individual utilizando una balanza analítica OHAUS, para calcular su peso promedio. La glándula digestiva o hepatopáncreas (HP) fue extirpada y pesada para calcular el Índice Hepatosomático. El conjunto de HP se pesa y se liofiliza. Para la preparación de la solución enzimática, el liofilizado se homogeniza (en licuadora o mortero) y se rehidrata con agua destilada. Después de la rehidratación y re-homogenización en el Potter, el extracto se clarifica por centrifugación (23,000 x g, 10 min.), la fracción lipídica fue removida, el sobrenadante recuperado y almacenado a -20°C hasta su uso. Esta fracción es considerada como el extracto crudo (EC). El micrométodo de Bradford (1976) se utiliza para determinar la cantidad de proteína, utilizando albúmina bovina con estándar.

#### **Determinación de la actividad enzimática**

La actividad enzimática en el EC se determinó a fin de conocer las unidades de enzima presentes por unidad de volumen y por mg de proteína.

La actividad de proteasa es determinada de acuerdo con Divakaran y Ostrowski (1990) usando azocaseína (1% en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5) como sustrato. La actividad de proteasa se expresa como el número de unidades de proteasa por mg de proteína (una unidad de proteasa se definió como la cantidad de la enzima requerida para incrementar por minuto 0.01 unidades de D.O a 440 nm).

La actividad de lipasa es determinada de acuerdo con Versaw *et al.*, (1989) usando  $\beta$ -Naftil caprilato (100 mM en DMSO) como sustrato. La actividad lipasa se expresa como el número de unidades de lipasa por mg de proteína (una unidad de lipasa se definió como la cantidad de la enzima requerida para incrementar por minuto 0.01 unidades de D.O a 540 nm).

La actividad de amilasa es determinada de acuerdo con Vega-Villasante *et al.*, (1993) usando almidón soluble (1% en Tris-HCl, 50 mM, pH 7.5) como sustrato. La actividad amilasa se expresa como el número de unidades de amilasa por mg de proteína (una unidad de amilasa se definió como la cantidad de la enzima requerida para incrementar por minuto 0.01 unidades de D.O a 550 nm).

#### **Caracterización de las enzimas**

A fin de determinar las propiedades de las enzimas del EC, se realizaron ensayos para determinar la temperatura óptima y estabilidad térmica, pH óptimo, efecto de salinidad, efecto de iones divalentes, efecto de inhibidores y activadores.

## Relación enzima-substrato y tiempo de reacción

A fin de establecer la relación adecuada de enzima y substrato se realizaron pruebas para establecer el número de unidades de enzima requeridos para la cantidad de substrato utilizado de tal manera de garantizar un exceso de substrato durante las determinaciones de digestibilidad. Así mismo, se hicieron ensayos para establecer el tiempo de digestión para cada prueba, tratando de llegar a un tiempo de ensayo que fuera práctico.

### Digestibilidad *in vitro* de proteína (Hsu et al. 1977, modificado).

El método de Hsu (pH shift, caída de pH) fue modificado substituyendo el sistema multienzimático (tripsina porcina 1.6 mg/mL, quimotripsina 3. mg/mL y peptidasa 0.502 mg/mL), por 210 U de proteasa de camarón. Así mismo, la digestibilidad es determinada mediante el uso de la velocidad de cambio de pH (-delta de pH/min), en lugar de considerar únicamente el cambio de pH obtenido después de los 10 minutos de incubación (unidades de pH en 10 minutos).

#### Procedimiento:

- Moler los ingredientes o alimentos y tamizarlos a 250  $\mu$ m
- Colocar 6.25 mg de proteína /mL (volumen de reacción, 50 mL)
- Ajustar el pH a 8.0
- Agregar 3 mL de EC (210 U proteasa de camarón)
- Incubar a 25 °C, en agitación
- Registrar el cambio de pH cada 30 s
- Construir la curva de cambio de pH por unidad de tiempo
- Calcular la ecuación de la curva y encontrar el valor de la pendiente (cambio de pH/min)
- Se puede utilizar a la caseína como proteína de referencia (u otra harina o alimento de referencia)
- Expresar la digestibilidad de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$D = \left( \frac{\text{Cambio de pH/min por la hidrólisis de la muestra problema}}{\text{Cambio de pH/min la hidrólisis de la referencia}} \right) \times 100$$

Este método tiene la ventaja de ser rápido y se basa en la velocidad de cambio de pH, en lugar de cambio total de pH. Las desventajas del método son que la digestibilidad de proteína se calcula a partir del cambio de pH, producto de la liberación de protones que pueden ser de diferente origen. El método solo considera la velocidad inicial de hidrólisis y no la capacidad de digestión de la proteína total de la muestra. El cambio de pH pudiera tener un ligero efecto en la actividad de las enzimas.

El método de Hsu fue también modificado por el grupo de la Universidad de La Habana (Forrellat, 1998) quienes lo han aplicado, con una buena correlación respecto a la digestibilidad *in vivo*. La metodología propuesta aquí incluye modificaciones a los protocolos antes señalados.

### **Digestibilidad *in vitro* de proteína (Ezquerro *et al.* 1998, modificado).**

La modificación del método de Ezquerro (pH stat) incluye el uso de 210 U de proteasa de camarón. Así mismo, la digestibilidad es determinada mediante el uso de la velocidad de consumo de NaOH 0.1 M. Se utiliza a la caseína como proteína de referencia (o una harina o alimento de referencia).

Procedimiento:

- Moler los ingredientes o alimentos y tamizarlos a 250  $\mu\text{m}$
- Colocar 6.25 mg de proteína /mL (volumen de reacción, 50 mL)
- Ajustar el pH a 8.0
- Agregar 210 U de proteasa de camarón
- Incubar 5000 segundos, a 25 °C, en agitación
- Registrar el consumo de NaOH
- Construir la curva de consumo de NaOH por unidad de tiempo
- Calcular la ecuación de la curva y encontrar el valor de la pendiente (consumo de NaOH/seg) y calcular el consumo de NaOH/min.
- Utilizar a la caseína como proteína de referencia (o la harina o alimento de referencia)
- Expresar la digestibilidad de acuerdo a la siguiente fórmula:

$D = (\text{Consumo de NaOH/minuto por la hidrólisis de la muestra problema} \div \text{Consumo de NaOH /min la hidrólisis de la referencia}) \times 100$

Este método tiene la ventaja de ser rápido y se basa en la velocidad de consumo de NaOH para mantener el pH a 8.0. Las desventajas del método la digestibilidad de proteína se calcula a partir del consumo de NaOH, producto de la liberación de protones que pueden ser de diferente origen. El método solo considera la velocidad inicial de hidrólisis y no la capacidad de digestión del total de la proteína de la muestra.

El método de Ezquerro ha sido utilizado en el CIBNOR y la Universidad de Sonora quienes lo han aplicado, con una buena correlación respecto a la digestibilidad *in vivo*. La metodología propuesta aquí incluye modificaciones al protocolo antes señalado.

### **Digestibilidad *in vitro* de almidón (Nolasco, 2005)**

El método (pH constante, amortiguado) consiste en la digestión de almidón (o glucógeno), por la acción de las amilasas del camarón. El método está diseñado para medir la digestibilidad de almidones presente en ingredientes vegetales o el glucógeno de ingredientes animales o de los alimentos que los contengan. El principal componente polisacárido en los alimentos comerciales para camarón es el almidón, debido a la incorporación de harinas de trigo, sorgo, maíz etc. Así mismo, harinas de pescado, calamar, etc, contienen polímeros de glucógeno en su composición. Sin embargo, la inclusión de harinas de crustáceos en los alimentos, además de aportar glucógeno, aportan polisacáridos quitinosos de su exoesqueleto.

La actividad amilasa en camarón es considerablemente alta, respecto a la capacidad de hidrólisis de otros polisacáridos como la quitina o la celulosa. Lamentablemente pocos trabajos comparativos se han desarrollado para determinar la capacidad de hidrólisis de polisacáridos y disacáridos respecto a la actividad amilasa.

Se propone como referencia el uso de almidón soluble de maíz, por su alta digestibilidad por las amilasas de camarón, cuando el sustrato es solubilizado por tratamiento térmico. Por lo tanto, el método puede utilizarse para medir la digestibilidad de almidón (y glucógeno) en ingredientes y alimentos que contengan este tipo de polímeros. Sin embargo, si el camarón posee la capacidad de hidrolizar otros polisacáridos, además del almidón y el glucógeno, la digestibilidad que se obtendrá, al aplicar este método, será la suma de las digestibilidades de todos los polisacáridos y disacáridos (presentes en la muestra) hidrolizables por las enzimas del camarón. Si se requiere conocer la digestibilidad *in vitro* de cada componente polisacárido, se requiere la separación de éstos de los ingredientes y los alimentos para determinar la digestibilidad por separado.

Una alternativa para evitar la separación de los polisacáridos para medir su digestibilidad por separado, es utilizar la(s) enzimas(s) semi-puras o puras del camarón como sistema enzimático.

Para el estudio comparativo de ingredientes o alimentos, sometidos a tratamientos térmicos similares durante su preparación, se puede dar un tratamiento en la autoclave (15 libras/pulg<sup>2</sup>, 15 min) a las suspensiones antes de agregar la mezcla de enzimas (EC) para la prueba de digestibilidad.

#### Procedimiento:

- Moler los ingredientes o alimentos y tamizarlos a 250  $\mu\text{m}$
- Colocar 1.2 g del ingrediente o alimento (2.4% p/v)
- 50 mL de buffer de Tris-HCl (50 mM, pH 7.5)
- 1 hr de hidratación a 4 °C
- Ajustar el pH a 8.0
- Agregar 1.0 mL de EC (2000 U de amilasa)
- Incubar a 25 °C, con agitación rotatoria (Tumbling)
- Tomar muestras de 1 mL de la mezcla de reacción al tiempo cero (t<sub>0</sub>) y cada 15 minutos durante 2 horas.
- Determinar azúcares reductores en la muestras por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS)

Nota: si se utilizan muestras tratadas en autoclave, la velocidad de hidrólisis será mayor. Por lo que se puede disminuir a 250 U de amilasa en la mezcla de reacción, así como la toma de muestras cada 5 minutos durante 30 minutos.

#### *Determinación de azúcares reductores (método de DNS).*

- 200  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio (2 N)
- 1.5 mL del reactivo de DNS

- 1mL de la muestra del vaso de digestión
- 15 min de tratamiento en baño María en ebullición
- 7.3 mL de agua destilada
- 10 min de sedimentación
- Abs 550 nm

#### Cálculo de la digestibilidad

- Construir la curva de liberación de azúcares reductores por unidad de tiempo
- Calcular la ecuación de la curva y encontrar el valor de la pendiente (azúcares reductores/min).
- Utilizar al almidón soluble de maíz como referencia (o la harina o alimento de referencia seleccionado).
- Expresar la digestibilidad de acuerdo a la siguiente fórmula:

$D = (\text{Liberación de azúcares reductores/minuto la hidrólisis de la muestra problema} \div \text{liberación de azúcares reductores/min la hidrólisis de la referencia}) \times 100$

En el caso de utilizar diferentes cantidades de enzima (U de amilasa), entre el insumo de referencia y el insumo problema, la fórmula debe incluir el incremento de azúcares reductores/unidades de enzima.

Este método tiene la ventaja de ser rápido y se basa en la velocidad de liberación de azúcares reductores, por acción de las enzimas del camarón sobre los polisacáridos y disacáridos (digeribles) presentes en la muestra. Las desventajas del método incluyen que la digestibilidad de carbohidratos representa la suma de digestibilidades de los polisacáridos presentes en la muestra. El método solo considera la velocidad inicial de hidrólisis y no la capacidad de digestión del total de los carbohidratos del ingrediente o alimento.

El método esta siendo utilizado en el CIBNOR. No hay datos aún de correlación entre digestibilidad *in vitro* en *in vivo*.

#### **Digestibilidad *in vitro* de lípidos (Nolasco, 2005)**

El método (pH stat) consiste en la digestión de lípidos, emulsificados, por la acción de las lipasas del camarón (Del Monte *et al.*, 2002, 2003). El método esta diseñado para medir la digestibilidad de lípidos (aceites). Por lo tanto su aplicación para medir la digestibilidad de la fracción lipídica de ingredientes y alimentos requiere la previa extracción de los lípidos totales para la preparación de la emulsión como sustrato.

Se propone como referencia el uso de tributirina, por su alta digestibilidad por las lipasas del camarón. Sin embargo, se puede buscar un triglicérido con ácidos grasos poli-insaturados y de cadena larga o un aceite de origen marino (aceite de pescado) como referencia, para pruebas de digestibilidad de insumos por organismos marinos. Para la digestibilidad de fosfolípidos se puede usar como referencia a la fosfatidilcolina.

Héctor Nolasco, Alberto del Monte Martínez, Patricia Hinojosa, Roberto Civera-Cerecedo, Fernando Vega-Villasante. 2006. Digestibilidad *in vitro* de Lípidos Alimentarios para el Camarón. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. Avances en Nutrición Acuícola VIII .VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15 - 17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.

Una alternativa para evitar la extracción de los lípidos, de los ingredientes y alimentos, es utilizar la metodología de la sección anterior (propuesta para la digestión de proteína) utilizando la(s) lipasa(s) semi-puras o puras del camarón como sistema enzimático.

Procedimiento:

#### *Preparación de la emulsión*

- 95 mL de agua destilada
- 5 g de goma arábiga
- 4 g de aceite
- Homogenización en licuadora por 10 min (o ultrasonificador, 2 min, 3 veces).
- Autoclave 15 lb/pulg<sup>2</sup>, 15min. (opcional, para incrementar vida de anaquel del sustrato)

#### Medición de la Digestibilidad

- 7 mL de tauracolato de sodio (20 mM, conc. final)
- 5 mL de la emulsión de aceite
- 2 mL de NaCl (1 mM, conc. final)
- 1 mL de CaCl<sub>2</sub> (20 mM, conc. final)
- Mezclar
- Ajustar el pH a 8.0
- Agregar 500 µL de EC (50 Unidades de lipasa de camarón, medidas por el método de Versaw *et al.*, 1989)
- Incubar 1,800 segundos, a 25 °C, en agitación
- Registrar el consumo de NaOH
- Construir la curva de consumo de NaOH por unidad de tiempo
- Calcular la ecuación de la curva y encontrar el valor de la pendiente (consumo de NaOH/seg) y calcular el consumo de NaOH/min.
- Utilizar a la tributirina como lípido de referencia (u otro lípido de referencia seleccionado)
- Calcular la velocidad de hidrólisis y la digestibilidad de acuerdo a la siguiente fórmula:

#### **Velocidad de hidrólisis (Digestibilidad):**

$$VH = \frac{(P-T) \times [NaOH]}{\text{Vol. Enzima} \times \text{Conc. de proteína}} \times 1000$$

P = Consumo de NaOH por hidrólisis del sustrato (mL/min).

T = Consumo de NaOH del testigo (mL/min).

[NaOH] = concentración de NaOH (Molaridad)

Vol. enzima = volumen de la enzima (mL)

Conc. Proteína = Conc. de proteína de la solución enzimática (mg/mL)

1000: Factor de conversión a µmoles de NaOH

El testigo se realiza de igual forma que el problema únicamente que se reemplaza la enzima por el mismo volumen de agua destilada. También puede utilizarse la misma solución enzimática pero inactivada previamente por tratamiento térmico (baño María a 100 °C, 5 min.)

El equipo utilizado es un pH stat Metrohm (modelo 736 GP Titrino), con NaOH 0.1M. La reacción de hidrólisis se lleva a cabo durante 1,800 segundos a un pH constante (8 +/- 0.02 unidades de pH), tomando lecturas de NaOH consumido cada 300 seg.

*Este método puede utilizarse también para expresar la actividad lipasa de extractos enzimáticos de diferente origen, utilizando uno o diferentes sustratos en forma de emulsión.*

Ahora, para medir la digestibilidad relativa de un insumo lipídico respecto a otro utilizado como referencia, se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Digestibilidad relativa (\%)} = \frac{\text{VH lípido problema}}{\text{VH lípido referencia}} \times 100$$

donde: VH = Velocidad de hidrólisis (Digestibilidad).

Este método tiene la ventaja de ser rápido y se basa en la velocidad de consumo de NaOH para mantener el pH a 8.0 ó al pH de trabajo seleccionado. El consumo de NaOH se considera como la velocidad de hidrólisis del lípido y esta como su digestibilidad.

### **Aplicación del método de digestibilidad *in vitro* de lípidos**

Utilizando el procedimiento anterior, se obtuvieron los resultados de velocidad de hidrólisis y digestibilidad relativa de diferentes fuentes lipídicas en juveniles del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

La Fig. 1 muestra el tipo de gráfico que se genera, que permite calcular la ecuación de la recta y obtener el consumo de hidróxido de sodio por unidad de tiempo.

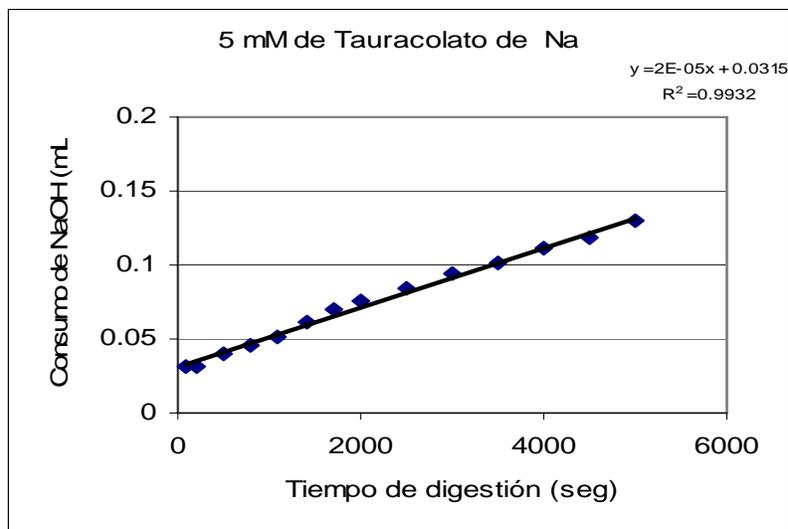


Fig. 1. Digestibilidad *in vitro* de tributirina. (La pendiente de la recta indica el consumo de NaOH por unidad de tiempo).

La Fig. 2 muestra la digestibilidad de diferentes fuentes lipídicas aplicando el método de digestibilidad *in vitro*, usando enzimas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

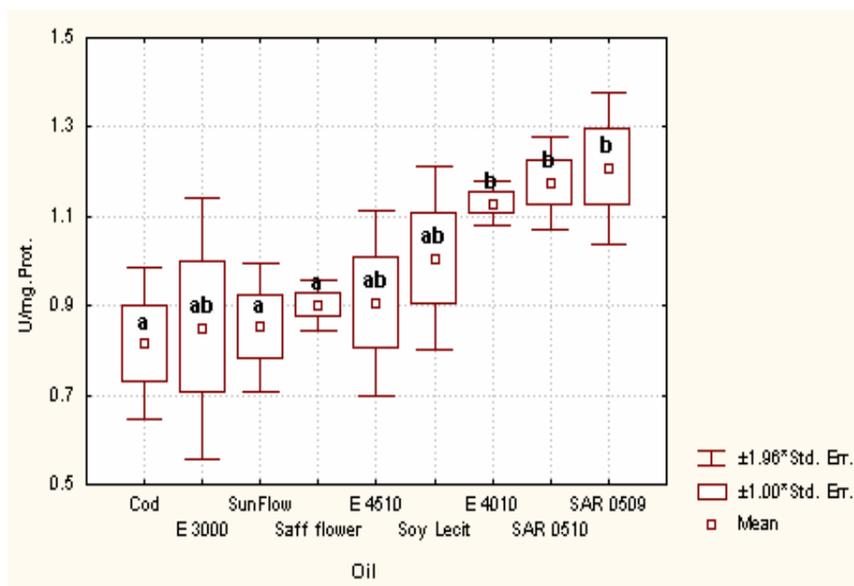


Fig. 2. Velocidad de digestión de diferentes fuentes lipídicas (U de digestión, micro moles de NaOH/ por unidad de tiempo).

COD: aceite de hígado de bacalao (HB0312; Farmacia Paris, D. F., México), E 3000 TG (EPAX, Lysaker, Noruega), SUNFLOW: aceite de girasol (Centro Comercial Californiano, La Paz, B. C. S., México), Safflower: aceite de cártamo (AcCar0511. Obtenido en el laboratorio de Nutrición del CIBNOR por extracción con éter de petróleo), E 4510 TG (45% EPA/10% DHA. EPAX, Lysaker, Noruega), SOY LECIT: lecitina de soya (LS0511; Odonaji, El Rey Sol, La Paz, B. C. S., México), E 1040 TG (10% DHA/40% EPA. EPAX, Lysaker, Noruega), SAR: aceites de sardina (AcSar0510 y AcSar0509. Matancitas, Puerto López Mateos, B. C. S., México).

La Tabla 1 resume la velocidad de digestión y la digestibilidad relativa de las diferentes fuentes lipídicas.

Tabla 1. Digestibilidad relativa de aceites de diferente origen en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Aceite <sup>1</sup>	Digestibilidad	Desviación Estándar	(P<0.05)	Digestibilidad (%)
Hígado de Bacalao	0.8146	0.1146	a	67.38
EPAX 3000 TG	0.8500	0.1819	ab	70.31
Girasol	0.8528	0.0973	a	70.54
Pescado*	0.8841	0.0868	a	73.14
Cártamo	0.9005	0.0382	a	74.49
EPAX 4510 TG	0.9060	0.1292	ab	74.94
Lecitina de soya	1.0056	0.1355	ab	83.18
EPAX 1040 TG	1.1297	0.0327	b	93.45
Sardina	1.1748	0.0709	b	97.18
<b>Sardina (Referencia)</b>	1.2089	0.1028	b	<b>100.00</b>

<sup>1</sup> Aceites de: hígado de bacalao (AcHB0312. Farmacia Paris, D. F., México), E 3000 TG (EPAX, Lysaker, Noruega), Girasol (Centro Comercial Californiano, La Paz, B. C. S., México), \*Peces marinos (Florenca, Italia), Cártamo (AcCar0511. Obtenido en el laboratorio de Nutrición del CIBNOR por extracción con éter de petróleo), E 4510 TG (45% EPA/10% DHA; EPAX, Lysaker, Noruega), Lecitina de soya (LS0511. Odonaji, El Rey Sol, La Paz, B. C. S., México), E 1040 TG (10% DHA/40% EPA. EPAX, Lysaker, Noruega), Sardina (AcSar0510 y AcSar0509. Matancitas, Puerto López Mateos, B. C. S., México).

El método *in vitro* para medir la digestibilidad de lípidos, tiene al menos 4 aplicaciones básicas: 1. Conocer la actividad lipasa utilizando substratos naturales, como triglicéridos y fosfolípidos. 2. Conocer la velocidad de digestión de diferentes insumos lipídicos por la especie, en función de su origen, composición, longitud de ácidos grasos asociados, calidad de los lípidos, etc. 3. Conocer la digestibilidad relativa respecto a un lípido de referencia, y 4. Hacer correlaciones de digestibilidad *in vivo* e *in vitro*. Esta información complementaria puede ser útil para la selección de insumos para la formulación de alimentos para acuicultura. Esta prueba de digestibilidad *in vitro* de lípidos será mas útil si se acompaña con el análisis de la calidad de ácidos grasos que contienen los triglicéridos presentes en el insumo. Finalmente, se debe garantizar que la fracción lipídica del alimento suministrado sea digestible y que aporte la cantidad y calidad de los ácidos grasos que requiere la especie en cultivo.

## Agradecimientos

El trabajo fue realizado con apoyo de los proyectos: SAGARPA-2003-C02-149 “Determinación de la digestibilidad de alimentos comerciales y de ingredientes utilizados en la formulación de alimentos balanceados para *Litopenaeus vannamei*”; SAGARPA 2003-C01-33 “Efecto de la incorporación del extracto total de langostilla roja (*Pleuroncodes planipes*) en la digestibilidad de dietas para camarones”, y del proyecto CONACYT México-Cuba 2002 “Aislamiento, purificación y caracterización de lipasas de origen marino con potencial aplicación industrial”. Los autores agradecen el apoyo técnico de Dulce Rocío Flores y de Alejandro Amador.

## Bibliografía

- Akiyama, D.M. Dominy, W.G., and Addison L.L. 1991. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industr. *In*: DM Akiyama and Tan R.K. (Eds). Proceedings of the aquaculture feed processing and nutrition workshop. September 19-25. American Soybean Association. pp 80-98.
- Balcao, V.M. and Malcata, F.X. (1996) "Reactors with immobilized lipase: mathematical modelling". en Engineering of/with lipases. Malcata, F.X., ed., Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 435-454.
- Berner, D.L. and Hammond, E.G. (1970) "Phylogeny of lipase specificity". *Lipids*. 5, p. 558-562.
- Biesot, M. P., Capuzzo, M. J., 1990a. Changes in digestive enzyme activities during early development of the American lobster *Homarus americanus* Milne Edwards. *J. Exp. Biol. Ecol.* 136, 107-122.
- Biesot, M. P., Capuzzo, M. J., 1990b. Digestive protease, lipase and amylase activities in stage I larvae of the American lobster, *Homarus americanus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 95, 1, 47-54.
- Bornscheuer, U.; Reif, O.W.; Lausch, R.; Freitag, R.; Scheper, T.; Kolisis, F.N. and Menge, U. (1994) "Lipase of *Pseudomonas cepacia* for biotechnological purposes: purification, crystallization and characterization". *Biochim. Biophys. Acta.* 1201, p. 55-60.
- Bowen, T. S., Sterling, G., 1978. Esterase and malate dehydrogenase isozyme polymorphisms in 15 artemia populations. *Comp. Biochem. Physiol.* 61B, 593-595.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brocherhoff, H. Hoyle, R. J., Hwang, P. C., 1970. Digestive enzymes of the American lobster (*Homarus americanus*). *J. Fish. Bd. Canada.* 27: 1357-1370.
- Brzozowski, A.M.; Derewenda, U.; Derewenda, Z.S.; Dodson, G.G.; Lawson, D.M.; Turkenburg, J.P.; Bjorkhing, F.; Hüge-Jensen, B.; Patkar, S.S. and Thin, L. (1991) "A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex". *Nature.* 351, p. 391-494.
- Cernia, E.; Magri, A.D.; Ortaggi, G.; Castagnola, M.; Rabino, R. and Bartoli, F. (1991). "Lipolytic enzymes separation and purification through functionalized synthetic polymers". en *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*, Vol. 16. Alberghina, L.; Schmid, R.D. and Verger, R. Eds, GBF Monographs, VCH, Weinheim, p. 369-372.
- Chávez, M.A.; Díaz, J.; Pérez, U. y Delfín, J. (1990) "Temas de enzimología". Ed. Min. Educación Superior. 567 pp., Cuba.
- Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (1955) "Preparation and assay of enzymes. Methods in Enzymology". Vol. I. Academic Press INC., Publishers. New York, 835 pp.
- Cuzon, G., A. Brito, L., Jiménez-Yan, R. Brito, G. García-Tomas, and G. Gaxiola. 2004. The effect of animal or plant based diets on energy partitioning in selected ontogenetic stages of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Sáez, L.E., D. Ricque Marie. M.G. Nieto, D. Villarreal, U. Scholz y M. González. *Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.* 16-19 Noviembre de 2004. Hermosillo, Sonora, México.
- De Caro, J.D.; Rouimi, P. and Rovey, M. (1986). "Hydrolysis of p-nitrophenyl acetate by the peptide chain fragment (336-449) of porcine pancreatic lipase". *Eur. J. Biochem.* 158, p. 601-607.
- Del Monte, A.; Romero, L. y Chávez, M.A. (1997<sup>a</sup>). "Detección de actividad fosfolipásica tipo A en extractos procedentes de la anémona marina *Condylactis gigantea*". *Rev. Biología.* 11, p. 125-127.
- Del Monte, A.; Sabuquillo, P.; Fernández-Lafuente, R.; Pío, D.; Díaz, J.; Chávez, M.A. y Guisán, J.M. (1997<sup>b</sup>). "Inmovilización de una lipasa procedente de la anémona marina *Stichodactyla helianthus* para su utilización en la preparación de precursores quirales". *Advances in modern biotechnology.* 4, p. E.32.
- Del monte, Alberto, Héctor Nolasco, Alina Forrellat, Carlos Aragón, Aliosha García, Joaquín Díaz y Olimpia Carrillo. 2002. Evidencias de la presencia de lipasas en el hepatopáncreas de *Litopenaeus schmitti*. *Simposium Virtual de Acuicultura.*
- Del Monte A., A. Forrellat, H. Nolasco, T. Estevez, B. Boburg, J. Díaz, O. Carrillo. 2003. Aislamiento y caracterización de lipasas en el hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei*. *CIVA* 2003. P. 755-767.
- Deering, J. M., Hewitt, R. D., 1996. Triacylglycerol digestion by the leader prawn *Penaeus monodon*. *J. World. Aquacult. Soc.* 27, 3, 359-361.
- Despamde, S.S. and Nielsen, S.S. 1987. *In vitro* digestibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) proteins. The role of heat stable protease inhibitors. *J Food Sci.* 52: 1330-1334.

Héctor Nolasco, Alberto del Monte Martínez, Patricia Hinojosa, Roberto Civera-Cerecedo, Fernando Vega-Villasante. 2006. Digestibilidad *in vitro* de Lípidos Alimentarios para el Camarón. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. *Avances en Nutrición Acuícola VIII .VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.* 15 - 17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.

- Divakaran, S., Ostrowski, C. A., 1990. Enzymes present in pancreatic extracts of the dolphin *Coryphaena hippurus*. J. World Aquacult. Soc. 1, 35-40.
- Erdmann, H.; Vorderwulbecke, T., Schmid, R.D. and Kieslich, K. (1991) "Comparison of lipase activities by different assays" en Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering, Vol. 16. Alberghina, L.; Schmid, R.D. and Verger, R. Eds, GBF Monographs, VCH, Weinheim, p. 425-428.
- Ezquerria, M., García-Carreño, F., and Carrillo, O. (1998). In vitro digestibility of dietary protein source for white shrimp (*penaeus vannamei*). Aquaculture, 163: 123-136.
- Fernández-Lafuente, R.; Armisen, P.; Sabuquillo, P.; Fernández-Lorente, G. and Guisán, J.M. (1998) "Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports". Chemistry and Physics of Lipids. 93, p. 185-197.
- Fernandez-Luna, M. Oliva, H. Nolasco, R.M. Chavez, M. Preciado y and F. Vega-Villasante. 1999. Contribution to the knowledge on the growth and molting cycle of the crab *Callinectes arcuatus* Ordway (1863) IN Nayarit Mexico. Revista de Investigaciones Marinas (Cuba) No. 20 (1-3) 94-100.
- Figueiredo, M.S.R.B., Krickler, J.A., Anderson, A.J., 2001. Digestive enzyme activities in the alimentary tract of Redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Decapoda:Parastacidae). J. Crus. Biol., 21,2, 334-344.
- Flaschel, E. and Renken, A. (1991) "The Behaviour of the *Candida rugosa* lipase in the presence of soluble substrates" in Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering, Vol. 16. Alberghina, L.; Schmid, R.D. and Verger, R. Eds, GBF Monographs, VCH, Weinheim, p. 349-352.
- Forrellat, A. 1998. El hepatopáncreas de camarón: Fuente de enzimas digestivas para la camaronicultura. Tesis Docoral. Universidad de La Habana. 109pp.
- Gibson, R., Barker, P.L., 1979. The decapods hepatopancreas. Oceangr. Mar. Biol. Annu. Rev., 17, 285-346.
- González-Baró, M. R., Heras, H., Pollero, R. J., 2000. Enzyme activities involved in lipids metabolism during embryonic development of *Macrobrachium borellii*. J. Exper. Zoo., 286, 231-237.
- González R. 1998. Variaciones de la actividad proteolítica y amilolítica en el hepatopáncreas de *Penaeus schmitti*. Ontogenia y efecto de algunos factores externos e internos. Tesis de Doctorado, Universidad de La Habana.
- 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, p. 12843-12847.
- Guisán, J.M.; Fernández-Lafuente, R.; Bastida, A.; Blanco, R.M.; Soler, G. and García-Junceda, E. (1996) "Utilization of unfolding/refolding strategies for reactivation of immobilized derivatives of lipases after inactivation by organic solvents". en Engineering of/with lipases. Malcata, F.X., ed., Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 257-271.
- Holwerda, K.; Verkade, P.E. and de Willigen, A.H.A. (1936) "Vergleichende untersuchungen uber die verseifungsgeschwindigkeit einiger ein sauriger triglyceride unter einfluss von pankreasextrakt". Rec. Trav. Chim. Pays-Bas. 55, p. 43-57.
- Hoyle, J.R., 1973. Digestive enzyme secretion after dietary variation in the American lobster (*Homarus americanus*). J. Fish. Res. Board Can. 30, 1647-1653.
- Hsu, H.W., D.L. Savak, I.D. Satterlee, and G.A. Millar. 1977. A multienzyme technique for stimulating protein digestibility. J. Food Sci. 42 (5): 1269-1273.
- López-López, S., H. Nolasco and Vega-Villasante, F. Characterization of digestive gland esterase-lipase activity of *Cherax quadricarinatus* juveniles. 2003. Comparative Biochemistry and Physiology 135: 337-347.
- Jensen, R.G. and Hamosh, M. (1996) "Selectivity of lipases: types and determination". en Engineering of/with lipases. Malcata, F.X., ed., Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 17-30.
- Jensen, R.G.; de Jong, F.A.; Lambert-Davis, L.G. and Hamosh, M. (1994) "Fatty acid and positional selectivities of gastric lipase from premature human infants, *In vitro* studies". Lipids. 29, p. 433-435.
- Kordel, M. and Schmid, R.D. (1991) "Inhibition of the lipase from *Pseudomonas spec.* ATCC 21808 by diethyl p-nitrophenylphosphate. Hints for one buried active site for lipolytic and esterolytic activity". en Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering, Vol. 16. Alberghina, L.; Schmid, R.D. and Verger, R. Eds, GBF Monographs, VCH, Weinheim, p. 385-387.
- Lee, G. P., Lawrence, L. A., 1985. Effects of diet and size on growth, feed digestibility and digestive enzyme activities of the marine shrimp, *Penaeus setiferus* LINNAEUS. J. World Maricul. Soc. 16, 275-287.
- Lehninger, A. (1979) "Bioquímica". 2<sup>da</sup> edición, Ed. Revolucionaria, La Habana. 1117 pp.
- Loizzi, F. R., Peterson, R. D., 1971. Lipolytic sites in crayfish hepatopancreas and correlation with fine structure. Comp. Biochem. Physiol. 39B, 227-236.
- Héctor Nolasco, Alberto del Monte Martínez, Patricia Hinojosa, Roberto Civera-Cerecedo, Fernando Vega-Villasante. 2006. Digestibilidad *in vitro* de Lípidos Alimentarios para el Camarón. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. Avances en Nutrición Acuícola VIII .VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15 - 17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.

- Longhi, S.; Fussetti, F.; Grandori, R.; Lotti, M.; Vanoni, M. and Alberghina, I. (1992) "Cloning and nucleotide sequences of two lipase genes from *Candida cylindracea*". Biochim. Biophys. Acta. 1131, p. 227-232.
- López-López, S., H. Nolasco and Vega-Villasante, F. (2003). Characterization of digestive gland esterase-lipase activity of *Cherax quadricarinatus* juveniles. Comparative Biochemistry and Physiology 135: 337-347.
- López-López, S., Nolasco, H., Villarreal-Colmenares, H., Civera-Cerecedo, R. (2005). Digestive enzyme response to supplemental ingredients in practical diets juvenile freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. 2005. Aquaculture Nutrition 19: 87-95.
- Lotti, M. and Alberghina, L. (1996) "*Candida rugosa* lipase isozymes. Cloning, sequencing, analysis of the substrate binding pocket". en Engineering of/with lipases. Malcata, F.X., ed., Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 115-124.
- Lotti, M.; Grandori, R.; Fussetti, F.; Longhi, S.; Brocca, S.; Tramontano, A. and Alberghina, L. (1993) "Cloning and analysis of *Candida cylindracea* lipase sequences". Gene. 124, p. 45-55.
- Malcata, F.X. (1996) "Engineering of/with lipases: scope and strategies". en Engineering of/with lipases. Malcata, F.X., ed., Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 1-16.
- Marletta, L. Carbonado, M., and Carnavale, E. 1992. In vitro protein and sulfur amino acid availability as a measure of bean protein quality. J.Sci. Food Agric. 59: 497-504.
- Morley, N.H. and Kuksis, A. (1974) "Hydrolysis of synthetic triglycerols by pancreatic and lipoprotein lipase". Lipids. 9, p. 481-488.
- Moss, S. M., Divakaran, S. and Kim, B. K., 2001. Stimulating effects of the pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Bonne). Aquacul. Res., 32, 125-131.
- Nolasco-Soria, H. y F., Vega-Villasante. 2000. Actividad enzimática digestiva, ritmos circadianos y su relación con la alimentación del camarón. pp 149-165 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) Avances en Nutrición Acuicola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México. Libro electrónico: ISBN-970-694-51-0.
- Nolasco, H., Flores, D., Vega-Villasante, F., Del Monte, A., and Carrillo-Farnés, O. 2004. Australasian Aquaculture. Sydney, Australia, Sep 26-29, 2004. pp 222.
- Mingarro, I.; Abad, C. and Braco, L. (1995) "Interfacial activation based molecular bioimprinting of lipolytic enzymes". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92, p. 3308-3312.
- Noble, M.E.M.; Cleasby, A.; Johnson, L.N.; Egmond, M.R. and Frenken, L.G.J. (1993). "The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate". FEBS Lett. 331, p. 123-128.
- Ransac, S.; Carriere, F.; Rogalska, E.; Verger, R.; Marquet, F.; Buono, G.; Melo, E.P.; Cabral, J.M.S.; Egloff, M.P.E.; van Tilbeurgh, H. and Cambillau, C. (1996) "The kinetics, specificities and structural features of lipases". en Engineering of/with lipases. Malcata, F.X., ed., Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 142-182.
- Rogelaka, E.; Cudrey, C.; Ferrato, F. and Verger, R. (1993) "Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases". Chirality. 5, p. 24-30.
- Rúa M.L.; Díaz-Mauriño, T.; Fernández, V.M.; Otero C. and Ballesteros, A. (1993) "Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*". Biochim. Biophys. Acta. 1156, p. 181-189.
- Sambhu, C., Jayaprakas, V., 1997a. Dietary supplementation of testosterone propionate on growth performance of whiteprawn, *Penaeus indicus* (M. Edwards). Indian J. Exper. Biol., 35. 1353-1358.
- Sambhu, C., Jayaprakas, V., 1997b. Impact of human Chorionic gonadotropin on digestive enzymes activity and nucleic acid contents of pearlspot, *Etroplus suratensis* (Bloch) and whiteprawn, *Penaeus indicus* (M. Edwards). Proc. Indian Natn. Sci. Acad. B63, 6, 515-522.
- Sarda, L. and Desnuelle, P. (1958). "Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion". Biocem. Biophys. Acta. 30, p. 513-521.
- Sévilla, C., Lagarrigue, J. G., 1975. Physiologie del Invertébrés.- Etude comparée des zymogrammes du tube digestif chez Isopodes (Crustacés, Péricadides). C.R. Acad. Sc. Paris, T. 281.
- Shiau, S.Y. 1997. Nutrient requirements of Penaid shrimps. Aquaculture. 164, 77-93
- Schonheyder, F. and Volquartz, K. (1945) "On affinity of pig pancreas lipase for tricaproin in heterogenous solution". Acta Physiol. Scand. 9, p. 57-67.
- Schrag, J.D.; Li, Y.; Wu, S. and Cygler, M. (1991) " Ser-his-glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Beotrichum candidum*". Nature. 351, p. 761-764.

Héctor Nolasco, Alberto del Monte Martínez, Patricia Hinojosa, Roberto Civera-Cerecedo, Fernando Vega-Villasante. 2006. Digestibilidad *in vitro* de Lípidos Alimentarios para el Camarón. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. Avances en Nutrición Acuicola VIII .VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 15 - 17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.

- Staggers, J.E.; Fernando-Warnakulasuriya, G.J.P. and Wells, M.A. (1981) "Studies on fat digestion, absorption and transport in the suckling rat. II. Triacylglycerols, molecular species, stereospecific analysis and specificity of hydrolysis by lingual lipase". *J. Lipid Res.* 22, p. 675-677.
- Sztajer, H.; Erdmann, H. Isobe, K.; Morelle, G. and Schmid, D. (1991) "Production and some properties of partially purified lipase from *Penicilium simplicissimum*". en *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*, Vol. 16. Alberghina, L.; Schmid, R.D. and Verger, R. Eds, GBF Monographs, VCH, Weinheim, p. 339-344.
- Tietz, N.W. and Shuey, D.F. (1993). "Lipase in serum- The elusive enzyme : an overview". *Clin. Chem.* 39 (5), p. 746-756.
- Tomizuka, N.; Ota, Y. and Yamada, K. (1966) "Studies on lipase from *Candida cylindracea*. Part. II. Aminoacid composition, carbohydrate component and some physical properties". *Agr. Biol. Chem.* 30, p. 1090-1096.
- Vega-Villasante, F., H. Nolasco and R. Civera. 1993. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*: I. Properties of the amylase activity in the digestive tract. *Comparative Biochemistry and Physiology* 106B (3): 547-550.
- Vega-Villasante, F., I. Fernandez, R.M. Preciado, M. Oliva, D. Tovar and H. Nolasco. 1999. The activity of digestive enzymes during the molting stages of the arched swimming *Callinectes arcuatus* Ordway 1863 (Crustacea: Decapoda: Portunidae), *Bulletin of Marine Science*, 65 (1): 1-9.
- Vega-Villasante, F., H. Nolasco, R. Civera-Cerecedo, E. Goitortua-Bores y C. Cota-Ruiz. 2000. La muda del camarón en el cultivo. *PANORAMA ACUÍCOLA* Vol. 5(No.5): 58-60.
- Versaw, K. W., Cuppet, L.S., Winters, D. D., Williams E. L., 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J. Food Sci.* 54, 6, 1557-1568.
- Vogt, G., 2002. Functional anatomy. In: David M. Holdrich (Ed.) *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science, pp. 87-100.
- Winkler, F.K.; D'Arcy, A. and Hunziker, W. (1990) "Structure of human pancreatic lipase". *Nature.* 343, p. 771-774.
- Wu, X.Y.; Jaaskelainen, S. and Linko, Y.Y. (1996) "Purification and partial characterization of *Rhizomucor miehei* lipase for esther synthesis". *Applied Biochem. Biotech.* 59, p. 145-158.