



Programa de Estudios de Posgrado

**“LIPASAS DIGESTIVA E INTRACELULAR DE *Penaeus vannamei*.
ESPECIFICIDAD Y ACTIVIDAD EN PRESENCIA DE SURFACTANTES”**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

P r e s e n t a

Raúl Balam Martínez Pérez

La Paz Baja California Sur, Octubre, 2012

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11:00 horas del día 25 del Mes de Octubre del 2012, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"LIPASAS DIGESTIVA E INTRACELULAR DE *Penaeus vannamei*. ESPECIFICIDAD Y ACTIVIDAD EN PRESENCIA DE SURFACTANTES"

Presentada por el alumno:

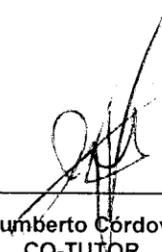
Raúl Balam Martínez Pérez

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN BIOTECNOLOGÍA.

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA


Dr. Fernando Luis García Carreño
DIRECTOR DE TESIS


Dr. Julio Humberto Córdova Murueta
CO-TUTOR


Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
CO-TUTOR


DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Fernando Luis García Carreño
Director de tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta
Co-Tutor
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Co-Tutor
Florida International University

COMITÉ REVISOR

Dr. Fernando Luis García Carreño

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dr. Fernando Luis García Carreño

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez

Suplente: Dra. Patricia Hernández Cortés

Resumen

Las lipasas (EC 3.1.1.3, triacilglicerol acilhidrolasas) se encuentran en una gran variedad de especies animales, microorganismos y plantas, las cuales han sido estudiadas con el objetivo de ser útiles en diversos procesos biotecnológicos, algunas poseen características de especificidad definida, como la especificidad por el ácido graso (acilo-especificidad), especificidad posicional (regio-selectividad) y estereo-especificidad, lo que hace atractivas a estas enzimas para los diferentes procesos en la industria biotecnológica. Algunas de las industrias con mayor demanda de lipasas son la de los detergentes, alimentaria y de biocombustibles, donde se aprovechan las características de regio-selectividad para catalizar la hidrólisis de sustratos naturales o sintéticos y estabilidad en presencia de diversos surfactantes para la formulación de detergentes comerciales. En este trabajo se estudio la especificidad de las lipasas digestiva e intracelular de *Penaeus vannamei* así como la estabilidad en presencia de surfactantes y su actividad en presencia de sustratos naturales para poder proponerlas como biocatalizadores para aplicaciones biotecnológicas. Se encontró 104.38% de actividad relativa de la lipasa intracelular en presencia de dodecil sulfato de sodio y un 78.83% para la lipasa digestiva. En Tritón X-100, Tween 20 y Brij 35 la actividad relativa disminuyó en comparación con SDS obteniendo valores menores del 70%. En presencia de sustratos naturales la lipasa intracelular mostró mayor actividad siendo de 1708.0 Umg^{-1} en presencia de aceite de oliva y los valores de K_m utilizando triacilglicéridos simples para la lipasas intracelular y digestiva mostraron ser de 1.2 y 3.25 respectivamente. El análisis de regio-selectividad mostró que ambas enzimas tienen una selectividad *sn*-2 como el caso de la lipasa de *Pseudomonas cepacia*. Se concluye que las lipasas de *P. vannamei* tienen la capacidad de ser utilizadas como potenciales biocatalizadores.

Palabras clave: Lipasas, regio-selectividad, surfactantes.

Abstract

Lipases (EC 3.1.1.3 triacylglycerol acyl hydrolases) are found in a great variety of animal species, microorganisms and plants, which have been studied with the purpose of being useful in different kinds of biotechnological procedures, some have defined specificity features, such as fatty acid specificity, (acylspecificity) positional specificity (regiospecificity) and stereospecificity, which make these enzymes eligible for different procedures in biotechnological industry. Some industries with higher lipases demand are detergent, food and biocombustible industries, where the regioselectivity is used to catalyze substrate hydrolysis, either from natural or synthetic origin in order to produce commercial detergents. This work studied digestive and intracellular lipases specificity from *Penaeus vannamei* as well as the stability in the presence of surfactants and their activity. The 104.38% intracellular lipase related activity was found in presence of sodium dodecyl sulfate. In presence of triton X-100, Tween 20 and Brij 25 the related activity dropped in comparison with SDS obtaining values below 70%. In presence of natural substrates, intracellular lipase showed a bigger activity being 1708.0 Umg^{-1} in presence of olive oil, the K_m values using simple triacylglycerides for intracellular and digestive lipases was 1.2 and 3.25 respectively. Regioselectivity analysis showed that both enzymes have *sn*-2 selectivity as shown by the *Pseudomonas cepacia*. It is concluded *P. vannamei* lipases are reliable to be used as potential biocatalyst.

Key words: Lipases, regioslelectivity, surfactant.

Dedicatoria

A todas las personas que me han acompañado en esta aventura y a todos los que me apoyaron, especialmente a José Raúl Martínez, Lucrecia Pérez, José Luis Martínez y Gabriela Robles.

Agradecimientos

A CONACyT por la beca otorgada (51087), y al proyecto 80935 (Enzimas digestivas en decápodos crustáceos: proteinasas ácidas y lipasas verdaderas. Desde el gen hasta la función).

Al CIBNOR y a los departamentos de posgrado y de eventos por hacer más sencillo el quehacer diario.

A mis padres

Al Dr. Fernando Luis García Carreño por toda la paciencia y el apoyo.

Al Dr. Julio Córdova Murueta por su comprensión y su continua ayuda en cada etapa del desarrollo de la maestría.

A la Dra. Crisalejandra Rivera Pérez por su amistad y por todos los consejos.

A la Dra. Patricia Hernández Cortés por hacer mas divertida esta aventura

A la técnico María de los Ángeles Navarrete del Toro (Ann) por todo su cariño, la amistad y por todas las cosas que me mostraste a hacer en el laboratorio.

Al técnico Erick Julián Nuñez Vázquez por el apoyo en la realización de la técnica de cromatografía en capa fina.

A la M. en C. Claudia Maytorena por su amistad y guía en la maestría

A la cDra. Margarita Zamorano por las risas, los tips, por escucharme y mostrarme su amistad.

A la I.B. Betsaida Bibó, gracias por su amistad, por ser una clase de terapeuta y aguantarme todos los días.

A la Ing. Biot. María Cristina Galaviz Bustamante por los buenos momentos, la compañía, apoyo, comprensión y sobre todo su amistad incondicional.

A Diana Martínez Alarcón por ayudarme a conocer los límites de mi persona.

A mis compañeros de posgrado quienes fueron a la par conmigo en esta aventura

A los muchachos de eventos que facilitaron la planeación de los seminarios de bioquímica, a Jorge Collins, Hugo Geraldo Gonzales y Francisco Partida Padilla muchas gracias.

A Ángel Tirado, Juan Antonio López y todas las personas que de alguna forma lograron hacer esta aventura un camino más bonito de lo que podría haber sido.

Contenido

Introducción	12
Marco teórico.....	16
Características de <i>Penaeus vannamei</i>	16
Lipasas.....	16
Reacciones catalizadas por lipasas	18
Especificidad.....	20
Métodos de evaluación de la actividad de lipasas.....	21
Características de las lipasas del camarón blanco <i>P. vannamei</i>	22
Detergentes.....	26
Enzimas en la industria	29
Hipótesis.....	33
Objetivo general.....	33
Objetivos específicos	33
Materiales y métodos	34
Obtención de muestras	34
Determinación de la actividad de lipasa.....	34
Electroforesis	35
Purificación de la lipasa digestiva.....	35
Cromatografía de exclusión molecular	35
Cromatografía de intercambio aniónico.....	36
Purificación de la lipasa intracelular.....	36
Evaluación del K_M	37
Evaluación de la especificidad mediante cromatografía en capa fina (TLC)	37

Actividad en presencia de surfactantes.....	37
Resultados.....	39
Purificación de las lipasa digestiva de <i>P. vannamei</i>	39
Purificación de la lipasa Intracelular de <i>P. vannamei</i>	41
Actividad de las lipasas Intracelular y digestiva de <i>P. vannamei</i>	42
Actividad de lipasa en presencia de aceites naturales	43
Actividad de lipasa en presencia de surfactantes.....	44
Regioselectividad de las lipasas de <i>P. vannamei</i>	45
Discusión.....	46
Actividad de las lipasas digestiva e intracelular de <i>P. vannamei</i> , con diferentes sustratos sintéticos y naturales.....	46
Actividad en presencia de surfactantes.....	49
Evaluación de la selectividad posicional de las lipasas intracelular y digestiva de <i>P. vannamei</i>	51
Conclusiones	53
Referencias.....	54

Lista de Figuras.

- Figura 1. Reacción de hidrólisis catalizada por lipasas (Stehr, 2003), TAG: triacilglicérido, AGL: ácido graso libre 17
- Figura 2. Conformación de las lipasas. (A) Topología de las α/β hidrolasas, $\beta 1-\beta 8$, placas β , A-F, α -hélices, S-H-D/E, indican la localización de los residuos catalíticos, S: serina, H: histidina, D/E: ácido aspártico/ácido glutámico (Scharg et al., 1997) (B). La lipasa de *Candida rugosa* representando la conformación cerrada (1) y abierta (2) con la “lid” en color negro. En la conformación activa (2) el sitio activo de la enzima permite el acceso al sustrato, aquí representados por un inhibidor (gris oscuro) y resaltada el círculo punteado (Verger, 1997). 18
- Figura 3. Reacciones catalizadas por lipasas (Houde et al., 2004). 19
- Figura 4. Triacilglicéridos. (A) Enlaces éster capaces de ser hidrolizados por las lipasas (Casas-Godoy et al., 2012), (B) Diacilglicéridos análogos, los cuales puede reconocer una lipasa estéreo-específica (Douchet et al., 2003). 21
- Figura 5. Modelo in silico de la lipasa digestiva de *P. vannamei*. CT: Carboxilo terminal, NT: Amino terminal, H,S y D: Aminoácidos de la triada catalítica (Maytorena-Verdugo, 2011). 23
- Figura 6. Comparación de los aminoácidos hidrofóbicos que interactúan en el bolsillo de enlace del sustrato de la lipasa digestiva de *P. vannamei* y *Pseudomonas cepacia*. En el recuadro rojo se indica la secuencia consenso de las lipasas (GX SXG) y en recuadros negros los aminoácidos homólogos que pueden influir en la interacción enzima-sustrato 26
- Figura 7. Disolución de una membrana biológica con surfactantes (Bhairi et al., 2007). 27
- Figura 8. Cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel. 39
- Figura 9. Fracciones de la cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel

con actividad de lipasa digestiva.....	40
Figura 10. Cromatografía de intercambio aniónico (segundo paso de purificación de la lipasa digestiva de <i>P. vannamei</i>).....	40
Figura 11. Actividad de lipasa digestiva en las fracciones de la cromatografía de intercambio aniónico como segundo paso de purificación revelada utilizando MUF-Butirato, MM: marcador de bajo peso molecular, EC: extracto crudo de glándula digestiva de <i>P. vannamei</i> , GF: Fracción obtenida de filtración en gel con actividad de la lipasa digestiva, 21-31: fracciones de la cromatografía de intercambio iónico con actividad de lipasa digestiva.	41
Figura 12. Cromatograma de la purificación de la lipasa intracelular de <i>P. vannamei</i> obtenida de pleopodos.	42
Figura 13. Lipasa intracelular purificada, MM: marcador de alto peso molecular, L1 y L2, lipasa intracelular.	42
Figura 14. Cromatografía en capa fina, PVL y PV_IL son los productos de la hidrólisis de trioleína en presencia de las lipasas digestiva e intracelular de <i>P. vannamei</i> respectivamente. Recuadro rojo indica productos de Rx	46

Introducción

Los lípidos constituyen gran parte de la biomasa de la tierra y cumplen diversas funciones como componentes de membrana celular, hormonas, vitaminas liposolubles, aislantes térmicos y reservas de energía para mantener la homeostasis (Beisson et al., 2000). Los triacilglicéridos (TAGs) o grasas neutras, son capaces de almacenarse en los adipocitos para posteriormente ser utilizados como fuente de energía. Debido a esto, existen enzimas especializadas que se encargan de la hidrólisis de los TAGs para su movilización. Las lipasas naturalmente catalizan la hidrólisis de enlaces éster de tri-, di-, y monoacilglicéridos para producir ácidos grasos y glicerol. De acuerdo con la Comisión de Enzimas de la IUPAC (International Unión of Pure and Applied Chemistry) las lipasas son definidas como triacilglicerol acilhidrolasas (E.C. 3.1.1.3). Se sabe que tanto las carboxil esterases como las lipasas pueden hidrolizar el enlace éster de diferentes sustratos, se ha utilizado gliceril triolato (trioleína) como sustrato específico para identificación de las lipasas. Con este sustrato se han evidenciado lipasas de diversas fuentes. Las lipasas son conocidas desde principios del Siglo XX en las bacterias *Serratia marcescens*, *Pseudomona aeuriginosa* y *Pseudomonas fluorescens* (Jeager et al., 1999), sin embargo, los primeros estudios de caracterización se realizaron en una lipasa pancreática de ternero, que en comparación con otras carboxil esterases, esta lipasa mostraba ser activa en presencia del triacilglicérido triacetina (Sarda et al., 1958).

Dentro de las características de importancia biotecnológica de las lipasas esta la especificidad por el sustrato, el pH y temperatura óptima en que se mantienen activas, además de la estabilidad que presentan en interacción con los surfactantes. La importancia biotecnológica de las lipasas con respecto al sustrato está basada en la capacidad que tienen para discriminar entre diferentes tipos de cadenas hidrocarbonadas presentes en las posiciones del TAG. Al poder distinguir entre el tamaño de las cadenas hidrocarbonadas (acilo-especificidad) así como su posición (regio-selectividad) convierte a las lipasas en enzimas de amplia

versatilidad al momento de llevar a cabo la modificación de aceites y grasas. El poder catalizar diferentes reacciones como hidrólisis y síntesis (esterificación y transesterificación) las hace atractivas para la industria, siempre y cuando sus características cinéticas se lo permitan (Song et al., 2008). La regio-selectividad de las lipasas es una de las propiedades de mayor interes, ya que ha permitido la modificacion de diversos sustratos de gran valor en la industria alimentaria, farmacéutica y de biocombustibles (Gandhi, 1997a). En la industria de biocombustibles utilizan diferentes aceites naturales como los de canola, linaza, cártamo y semillas de algodón para la produccion de biodiesel mediante la transesterificación de los ácidos grasos en presencia de solventes organicos (Chakravorty, 2012; Royon et al., 2007); en la industria farmacéutica la regioselectividad y la interacción sufractante-lipasa es de gran importancia al llevar a cabo la síntesis de algunos compuestos activos como el naproxeno (Kwon et al., 2009; Savelli et al., 2000).

Una de las industrias con mayor demanda de lipasas es la de los detergentes, donde las lipasas son mezcladas con surfactantes para la fabricación de productos de limpieza, lo que implica que las lipasas deban ser estables en presencia de estos mismos, así tambien entre otros ingredientes presentes en los productos de limpieza (Polizelli et al., 2008; Stamatis et al., 1999). Las lipasas que actualmente se comercializan para formulación de detergentes mantienen su actividad en amplios intervalos de pH y temperatura a los cuales mantienen su actividad (Cherif et al., 2011). Debido al potencial uso de las lipasas en diferentes biotecnologías han sido extensivamente estudiadas y caracterizadas, a partir de diferentes organismos,(plantas, animales, hongos, levaduras) de los cuales, las lipasas de uso comercial son aisladas principalmente de microorganismos, por su fácil manejo y producción (Ghosh et al., 1996; Pahoja et al., 2002; Schmidt-Dannert et al., 1996).

El estudio realizado sobre lipasas de organismos acuaticos como peces y crustáceos es escaso, sin embargo, se tienen reportes sobre lipasas en la carpa de agua dulce *Labeo rohita*, las cuales son localizadas en el intestino y estómago (Nayak et al., 2003); y las reportadas en la fase larvaria de la langosta *Homarus*

americanus y las del cangrejo *Carcinus mediterraneus*, todas con función digestiva (Biesiot et al., 1990; Cherif et al., 2007). En camarones, recientemente se describieron dos lipasas en *Penaeus vannamei*; una lipasa con función digestiva (PVL) y otra con función intracelular (PV_IL) (Rivera-Pérez et al., 2011a; Rivera-Pérez et al., 2011b). Ambas lipasas fueron localizadas en la glándula digestiva (GD). Sin embargo, Rivera-Pérez et al. (2011b) demostraron por medio de zimogramas que la lipasa intracelular se encuentra en otros tejidos como urópodos (UR), y pleópodos (PL), siendo pleópodos donde se encontraba en mayor concentración.

Los trabajos de Rivera et al. (2011a, 2011b) y Maytorena-Verdugo (2011) relativos a la caracterización bioquímica de las lipasas de *P. vannamei* han permitido conocer los valores óptimos de temperatura y pH, además de la actividad en presencia de diferentes solventes orgánicos, los cuales son los principales medios de reacción para la obtención de productos biotecnológicos (Esteban et al., 2011). Por lo tanto el generar conocimiento sobre fuentes alternativas de lipasas que reúnan los requerimientos de las industrias biotecnológicas es importante para disminuir costos y hacer más eficientes los procesos. Una de las fuentes alternativas para la obtención de lipasas está constituido por algunos desperdicios de la industria pesquera y camaronícola; según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, en 2010 la producción global del camarón blanco *P.vannamei* fue de 2,700,000 toneladas (FAO, 2012). De esta producción una parte significativa es comercializada sin cabeza (cefalotorax) (FAO, 2012), la cual representa aproximadamente el 40% de la biomasa y constituye el principal material de desecho. En el cefalotórax se encuentra la glándula digestiva, que es el órgano donde se sintetizan las enzimas digestivas (Proteasas , lipasas, entre otras) que podrían ser recuperadas para su incorporación en alguna biotecnología.

Ya se conocen algunas características tanto catalíticas como bioquímicas de las lipasas digestiva e intracelular de *P. vannamei* (Rivera-Pérez et al., 2011a; Rivera-Pérez et al., 2011b), también se sabe su estabilidad en presencia de solventes orgánicos (Maytorena-Verdugo, 2011), de ahí la importancia de estudiar otras

propiedades que las potencialicen como eficientes biocatalizadores en la industria. Debido a lo anterior, en este trabajo se estudiará la estabilidad de las lipasas de *P. vannamei* en presencia de algunos surfactantes, así como conocer su regioselectividad, la cual es importante en la producción de diversas biotecnologías.

Marco teórico

Características de *Penaeus vannamei*

El peneido *P. vannamei* se distribuye a lo largo de la costa del Océano Pacífico, desde Sonora en México, hasta Tumbes en Perú (Barón-Sevilla et al., 2004). Habita en ambientes con salinidad de 1 ppm hasta 40 ppm (Valdez et al., 2008) y en temperaturas superiores a los 20 °C. Se le puede encontrar a profundidad de hasta 72 m en la línea costera (Dores et al., 1987).

Los camarones Peneidos se distinguen por tener el cuerpo poco comprimido, compuesto de un cefalotórax, abdomen, pleópodos y pereiópodos, el rostrum es moderadamente largo con 7-10 dientes dorsales, y de 2-4 dientes ventrales, su color es variable y normalmente translúcido; en el abdomen se localizan cinco pares de pleópodos (apéndices con función natatoria), la mayor parte de los órganos se encuentran en el cefalotórax (sistema digestivo, nervioso y respiratorio), junto con los apéndices usados para la locomoción y alimentación (Felgenhauer, 1992).

Lipasas

Las lipasas pertenecen a la familia de la serino hidrolasas, se clasifican como triacilglicerol acilhidrolasas (EC 3.1.1.3) y catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos cuyos productos son diacilglicéridos, monoacilglicéridos, ácidos grasos y glicerol (Figura 1). Las lipasas están clasificadas dentro de la súper familia de las α/β hidrolasas, donde también se encuentran las esterases, peroxidasas y proteasas (Jeager et al., 1999) . En todas estas enzimas la triada catalítica se encuentra constituida por tres aminoácidos: una serina que actúa como nucleófilo, un ácido (aspártico o glutámico) y uno alcalino (histidina) (Figura 2-A). El residuo de serina aparece conservado en el pentapéptido Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly (Arpigny et al., 1999), el cual es parte esencial para el mecanismo de catálisis.

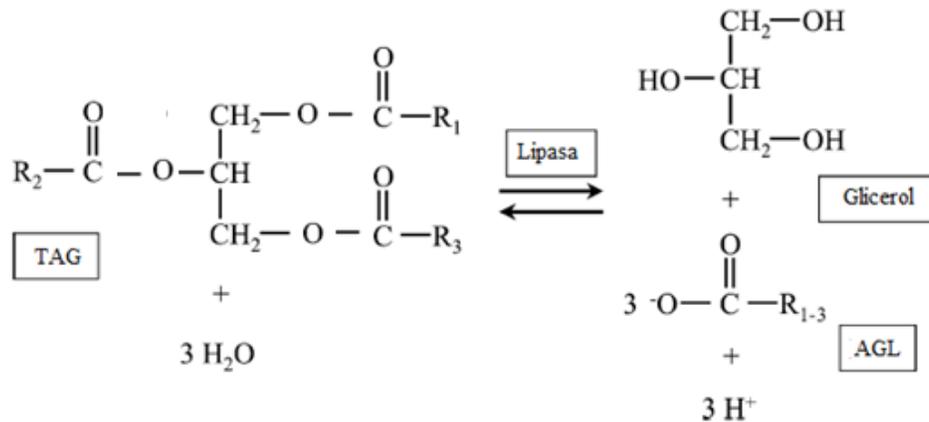


Figura 1. Reacción de hidrólisis catalizada por lipasas (Stehr, 2003), TAG: triacilglicérido, AGL: ácido graso libre

En medios acuosos homogéneos, el centro activo de las lipasas se aísla del medio de reacción por una cadena polipeptídica, llamada tapadera o lid (Scharg et al., 1997), haciendo inaccesible la entrada de los sustratos (conformación cerrada). Esta cadena polipeptídica presenta en su cara interna una serie de residuos hidrofóbicos que interaccionan con las zonas hidrofóbicas que rodean al sitio activo de las lipasas (Brady et al., 1990; Derewenda et al., 1992; Derewenda et al., 1994; Lawson et al., 1994). Sin embargo, cuando la enzima se encuentra en la interface agua/lípido, se obtiene una conformación distinta, conformación abierta, en la cual la lid se ha desplazado, interaccionando por medio de puentes salinos, puentes de hidrógeno, etc. Con otra zona de la superficie de la lipasa, dejando libre el centro activo de la enzima (Brady et al., 1990; Cygler et al., 1997) (Figura 2-B).

Este conocimiento ha permitido establecer que en el mecanismo catalítico de las lipasas ocurre lo que se denomina activación interfacial de lipasas (Beisson et al., 2000). Según esta propuesta, en sistemas homogéneos las lipasas se encuentra en una conformación cerrada, con el centro activo bloqueado, las cuales en presencia de interfaces hidrofóbicas se adsorben a la misma desplazando la "lid" y originando la conformación abierta. Este mecanismo de acción permite a las

lipasas actuar en las interfaces. Evidentemente, dado que el sustrato natural de las lipasas son las grasas y aceites, esta actividad en la interface es un requerimiento indispensable para la función biológica de las lipasas.

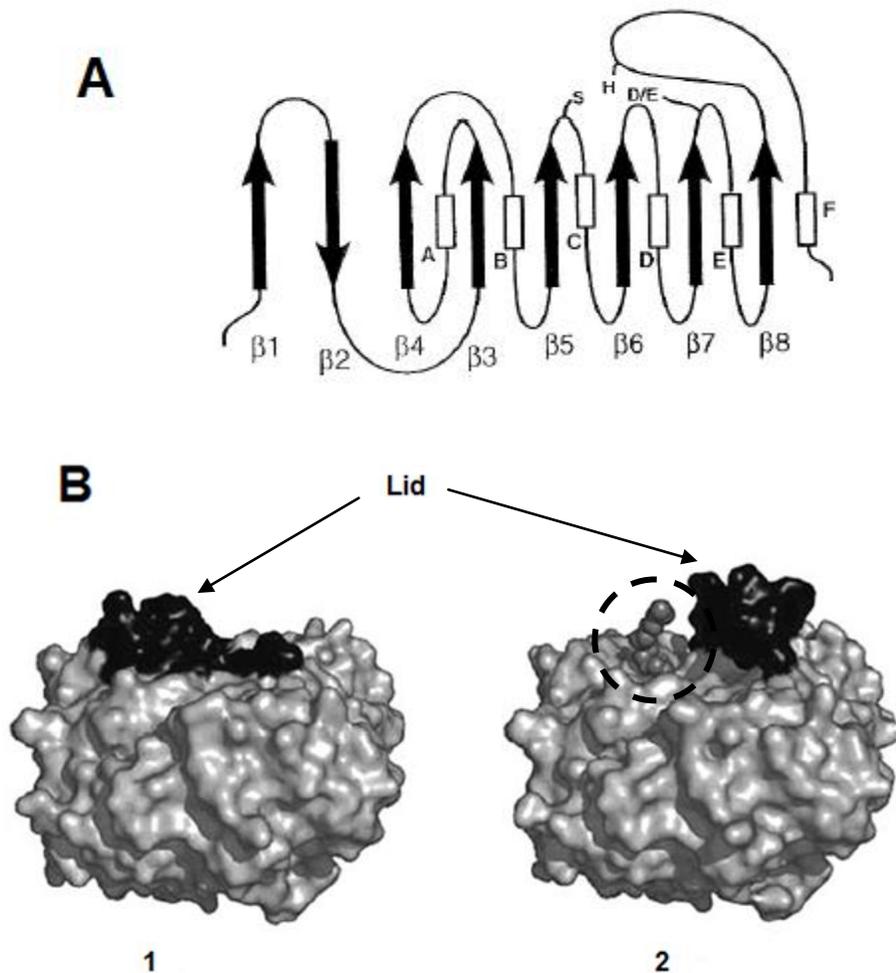


Figura 2. Conformación de las lipasas. (A) Topología de las α/β hidrolasas, $\beta 1$ - $\beta 8$, placas β , A-F, α -hélices, S-H-D/E, indican la localización de los residuos catalíticos, S: serina, H: histidina, D/E: ácido aspártico/ácido glutámico (Scharg et al., 1997) (B). La lipasa de *Candida rugosa* representando la conformación cerrada (1) y abierta (2) con la "lid" en color negro. En la conformación activa (2) el sitio activo de la enzima permite el acceso al sustrato, aquí representados por un inhibidor (gris oscuro) y resaltada el círculo punteado (Verger, 1997).

Reacciones catalizadas por lipasas

Las lipasas, en condiciones no fisiológicas pueden catalizar otras reacciones además de la hidrólisis de TAGs, como la esterificación y transesterificación, la cual puede a su vez clasificarse en alcoholólisis, acidólisis e interesterificación, y se llevan a cabo entre un éster y un alcohol, un éster y un ácido carboxílico o dos ésteres, respectivamente (Houde et al., 2004; Lee et al., 2006). Este tipo de reacciones ocurren en medio acuoso con solventes orgánicos o libres de ellos, utilizando sustratos naturales o sintéticos. Además de las reacciones mencionadas anteriormente, las lipasas pueden catalizar reacciones menos comunes como la aminólisis (reacción de un éster con una amina primaria para dar una amida y un alcohol) (Klivanov, 2001). Debido al amplio rango de sustratos que pueden catalizar, las lipasas se consideran enzimas promiscuas. (Figura 3). La capacidad de las lipasas para llevar a cabo diferentes reacciones, les ha conferido un rango amplio de posibles usos en la industria biotecnológica.

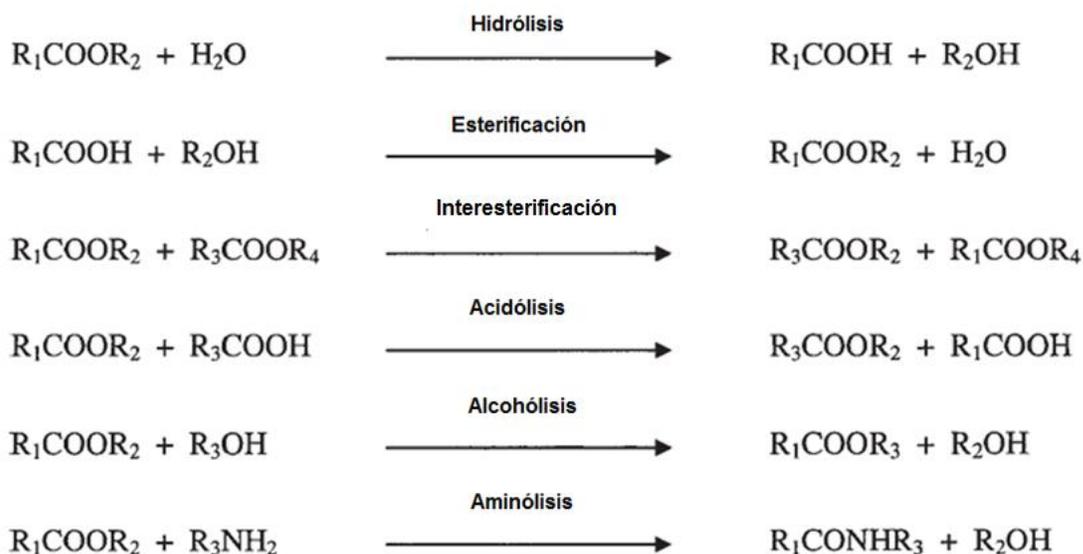


Figura 3. Reacciones catalizadas por lipasas (Houde et al., 2004).

Especificidad

La especificidad de las lipasas por el sustrato se clasifica por las características de las cadenas hidrocarbonadas unidas al glicerol (acilo-especificidad), la especificidad posicional (regio-selectividad) y estereo-especificidad:

- 1) Regio-selectividad: es la capacidad de hidrolizar los grupos éster carboxílicos en la posición *sn*-1 y *sn*-3 con respecto a la posición *sn*-2 (Stránský et al., 2007) (Figura 4-A).
- 2) Acilo-especificidad: La mayoría de las lipasas son selectivas respecto de un ácido graso, o bien, una clase de ácidos grasos, que contienen una longitud de la cadena hidrocarbonada específica y grados de insaturación dada. Esta característica de las lipasas está determinada por la interacción enzima-sustrato, de tal forma que la presencia de ramificaciones o insaturaciones y la posición en el glicerol influyen en la capacidad de la lipasa para llevar a cabo la hidrólisis (Miller et al., 1988).
- 3) Estéreo-especificidad: Las lipasas tienen la capacidad de discriminar entre sustratos enantiómeros. Cuando se trata de sustratos quirales, así mismo son importantes dos aspectos: 1) La discriminación por la enzima entre las diferentes moléculas de enantiómeros del sustrato depende de la simetría de reflexión, y 2) la discriminación entre los grupos pares no equivalentes de una molécula de un sustrato proquiral en particular (Rogalska et al., 1990) (Figura 4-B).

En general, la especificidad de las lipasas ha sido de utilidad en un gran campo de aplicaciones en diferentes biotecnologías como la oleoquímica de lípidos estructurados, resolución de mezclas racémicas y la síntesis de compuestos ópticamente activos.

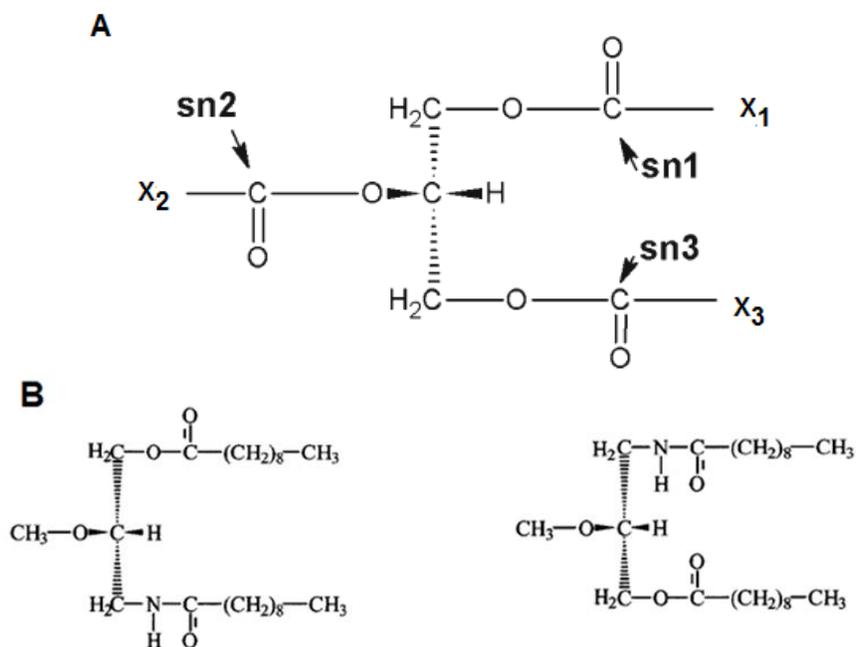


Figura 4.Triacilglicéridos. (A) Enlaces éster capaces de ser hidrolizados por las lipasas (Casas-Godoy et al., 2012), (B) Diacilglicéridos análogos, los cuales puede reconocer una lipasa estéreo-específica (Douchet et al., 2003).

Métodos de evaluación de la actividad de lipasas

Entre las metodologías disponibles para cuantificar la actividad de las lipasas, se encuentran diferentes técnicas que incluyen métodos: Titrimétricos, espectrofotométricos (fluorometría, fotometría, infrarojo), cromatográficos, radioactivos, de tensiometría interfacial, Nefelometría, Conductimetría, Inmunoquímica y Microscopía de fuerza atómica (Beisson et al., 2000). Uno de los métodos más utilizados para la detección de la actividad de las lipasas es mediante el uso de técnicas radiométricas, sin embargo, comparado con los métodos fluorogénicos resulta de mayor costo y tiempo. Prim et al. (2003) probaron un método cuantitativo para medir la actividad de las lipasas, el cual consistió en el uso de derivados de 4-Metilumeliferilferona como sustrato fluorogénico utilizando diferentes longitudes de onda (λ_{ex} : 355 nm y λ_{em} : 460 nm). En años recientes este método ha sido esencial para el estudio de actividad de las lipasas obtenidas de diferentes fuentes.

Características de las lipasas del camarón blanco *P. vannamei*

En *P. vannamei*, así como en otras especies de crustáceos, la localización de la actividad lipolítica en diferentes tejidos permite conocer la función fisiológica de las lipasas. Aquellas lipasas que se encuentran en la glándula digestiva están relacionadas con la digestión de TAGs, mientras que las lipasas localizadas en tejidos diferentes a la glándula digestiva (telson, urópodos y pleopodos, entre otros) son responsables de la hidrólisis de TAGs que se encuentran almacenados como cuerpos grasos (Smith et al., 1994). En algunos invertebrados se encuentran sustancias como la taurina, la cual se encargan de la emulsión de los lípidos para la posterior hidrólisis catalizada por las lipasas digestivas, sin embargo otros como *P. vannamei* carecen de ellas. Estudios *in vitro* realizados con lipasas *P. vannamei* en presencia de sales biliares demostraron que estas tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad de la lipasa digestiva (Rivera-Pérez et al., 2011b)

El grupo de Bioquímica del CIBNOR ya ha generado conocimiento que demuestra que la lipasa digestiva de *P. vannamei* mantiene el 80% de la actividad a temperaturas de 30 y 40 °C, mientras que la lipasa intracelular a temperaturas de 50-60 °C conserva el 50% de su actividad. También se sabe que el pH óptimo para la lipasa digestiva es de 8.0 mientras que para la lipasa intracelular se encuentra entre 8.0 y 10.0 (Rivera-Pérez et al., 2011a; Rivera-Pérez et al., 2011b). También se demostró que la secuencia parcial de nucleótidos de la lipasa intracelular es de 620 pb (Tabla 1-A). La secuencia de nucleótidos de la lipasa digestiva ha permitido ha permitido generar un modelo *in silico* en el que se muestran los aminoácidos de la triada catalítica así como la estructura denominada “lid” que permite la interacción enzima-sustrato, lo cual contribuye explicar la capacidad que tiene para mantenerse activa en diferentes solventes orgánicos (Maytorena-Verdugo, 2011; Rivera-Pérez et al., 2011a).

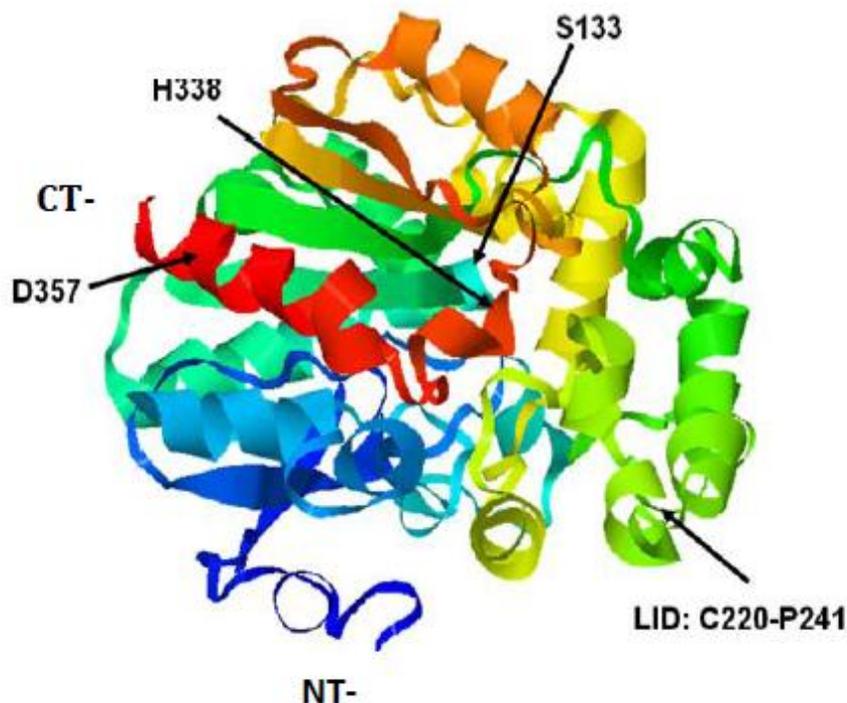


Figura 5. Modelo in silico de la lipasa digestiva de *P. vannamei*. CT: Carboxilo terminal, NT: Amino terminal, H,S y D: Aminoácidos de la triada catalítica (Maytorena-Verdugo, 2011).

Con respecto a la actividad relativa de las lipasas de *P. vannamei* en presencia de solventes orgánicos Maytorena-Verdugo (2011) demostró que a concentraciones del 10-50% de metanol y a temperaturas de 30-50 °C la actividad relativa de la lipasa intracelular oscila entre 130 y 140%, mientras que la lipasa digestiva en las mismas condiciones es de 110% . En presencia de otros solventes como el hexano la actividad se mantiene al 100%, mientras que con dimetil sulfóxido (DMSO) se pierde el total de la actividad. Respecto a la actividad relativa de la lipasa intracelular de *P. vannamei*, en presencia de hexano se ha demostrado que aumenta 30%, mientras que en DMSO se mantiene sin cambios (Maytorena-Verdugo, 2011) (Tabla 1-B). Esta es una característica importante para la industria de la elaboración de biocombustibles tal como el biodiesel, donde durante su producción se utiliza metanol y hexano, así como temperaturas de reacción de 40 °C (Liu et al., 2011).

Tabla 1-A. Características bioquímicas de las lipasas de *Penaeus vannamei* (Rivera-Pérez et al., 2011a; Rivera-Pérez et al., 2011b)

	Lipasa intracelular	Lipasa digestiva
Temperatura optima	30 °C	30 °C
pH optimo	8.0	8.0-10.0
Conformación	Dimérica	Monomérica
Masa molecular	196 kDa	44.8 kDa
Punto isoelectrico	5.0	3.5
Glicolisaciones	N/A	Si
Secuencia del ADNc	Parcial (620 pb)	Completa (1,186 pb)
Cofactores	N/A	N/A

Tabla 1-B. Actividad residual (%) de las lipasas de *P. vannamei* en presencia de diferentes solventes orgánicos (Maytorena-Verdugo, 2011).

Solvente	Lipasa intracelular					Lipasa digestiva				
	10%	20%	30%	40%	50%	10%	20%	30%	40%	50%
Metanol	125	120	67	45	21	71	109	69	73	115
Dimetil Sulfóxido	90	84	63	0	0	119	85	119	86	130
Etanol	72	56	39	30	10	97	157	110	170	38
Acetona	60	42	20	0	0	105	97	60	58	60
Propanol	70	43	40	33	0	78	50	19	0	0
Butanol	0	N/A	N/A	N/A	N/A	96	99	97	97	71
Hexano	196	225	N/A	N/A	N/A	91	89	118	99	101

Otra de las características importantes para usos biotecnológicos es la regioselectividad de las lipasas. Aun se desconoce la selectividad que poseen las lipasas de camarón, debido a esto, se han realizado comparaciones de secuencias de aminoácidos para tratar de indicar cuál podría ser la preferencia posicional en la que hidrolizan.

Se conocen pocos estudios sobre la regioselectividad de lipasas de origen marino. Patton et al. (1975), demostraron que las lipasas digestivas encontradas en el intestino de diferentes especies de peces (*Engraulis mordax*, *Oncorhynchus gorbuscha*, *Trachurus symmetricus*, *Scomber japonicus*) mostraron tener regioselectividad *sn-2* tal como la selectividad que muestra la lipasa de la bacteria *Pseudomonas cepacia* (PCL), en el caso de los peces su principal fuente de lípidos consta de TAGs de cadena larga (C20:4 y C20:5), en los cuales estos ácidos grasos se encuentran en la posición *sn-2* del TAG y son utilizados como fuente de energía para llevar a cabo los procesos fisiológicos. Los lípidos que principalmente se encuentran en el alimento natural del camarón están también estructurados por ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados, parecidos a los que se encuentran en el alimento de los peces mencionados anteriormente, lo que indica que existe la posibilidad de que las lipasas del camarón tengan una regioselectividad similar. Para corroborar esto se comparó la secuencia de aminoácidos de lipasa digestiva de *P. vannamei* contra la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PCL), dicha comparación indicó que algunos residuos de aminoácidos son homólogos al sitio de enlace de la lipasa digestiva de *P. vannamei* (Jeager et al., 1999).

Penaeus	MDKWQKYGNLINRYRRNVNCTMEYGRIFSFYEN--KIVKAMERRDRPGDRERQQTQR	58
Pseudomas	-----MAKSMRSRVMAGAVACAMSVAPFAGTTALTTLATTHAAMAATAPADDYATTRYPI	55
Penaeus	KATKALAYKLADAGYDVWLSNMRGNTYSRNHVLDPEDI	118
Pseudomas	ILVHGLTGTDKYAGVLDYWYGIQEDLQQHGATVYVANLS	115
Penaeus	VLEMTGAEAVYYIGWSMGITVFWAMSEKPEYNEKVRAMAAMAPVAFMNAEGPIMALAP	178
Pseudomas	VLAATGATKVNLIHGSQGLTSRYVAAVAPDLVASVTTIGTPHRGSEFADFVQDVLAYDP	175
Penaeus	YSDDLDFMATLLGVGEFLPSS-----DIIDHVFVETYCDSEAVTAEVCYNFLLLLAGPDP	232
Pseudomas	TELSSTVYAAFVNVFGILTSSSHNTINQDFAASLKLTLTAAQATYNQNYPSAGLGAPGSCQ	235
Penaeus	DEIPKDFLP--IHTAHTPAGASVHTVNHYAQLVMSGVFDKYDYGLIGNLNHYGQNTIPHLF	290
Pseudomas	TGAPTEVGGNTFLYLSWAGTAIQPT--LSLFGVTGATDITSTVPVVDPANVLDPSTLALF	293
Penaeus	NLSVAAPVGLFWGSTDWLADPTDVARLAEGLPNLALNHKVDKEEFNHLDFGWGIHADEL	350
Pseudomas	GTGVMINRGS--GENDGLVSKCSALYGAVSTR-YKWNHIDEINQLLGVRGAYAEDPVAV	350
Penaeus	VYRHILDFFANY	362
Pseudomas	IRTHANRLKLAG	362

Figura 6. Comparación de los aminoácidos hidrofóbicos que interactúan en el bolsillo de enlace del sustrato de la lipasa digestiva de *P. vannamei* y *Pseudomonas cepacia*. En el recuadro rojo se indica la secuencia consenso de las lipasas (GX SXG) y en recuadros negros los aminoácidos homólogos que pueden influir en la interacción enzima-sustrato

Detergentes

Los surfactantes son denominados como detergentes, sin embargo los detergentes son aquellos productos que contienen además de surfactantes otros aditivos para el lavado. Los surfactantes son moléculas anfipáticas que contienen un grupo polar (cabeza) y uno no polar “cola”, donde la cabeza hidrofílica forma enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua, mientras la cola hidrofóbica induce la formación de micelas. Los surfactantes disminuyen la tensión superficial del agua (Bhairi et al., 2007), además poseen la capacidad de solubilizar proteínas de la membrana celular, ya que a baja concentración de surfactante (concentración micelar crítica [CMC] baja), son capaces de enlazarse a la bicapa

lipídica por particionamiento. A alta concentración (concentración micelar crítica [CMC] alta), las bicapas son saturadas con el surfactante y entonces se desintegran para formar micelas mixtas (surfactante-lípidos) y proteína-surfactante (usualmente una proteína por micela) (Figura 7) (Bhairi et al., 2007).

Los surfactantes se han utilizado en la formulación de detergentes comerciales para lavandería, los cuales confirieren a los productos la capacidad de formar micelas con sustancias oleosas. En el agua, el surfactante presente en los detergentes comerciales forma una emulsión constituida por micelas, que son partículas estables debido a que los grupos hidrófilos están unidos por puentes de hidrógenos a las moléculas de agua que los rodea, mientras que los grupos hidrófobos están protegidos en el interior de la micela e interactúan con otros grupos hidrófobos donde, grupos de 100 a 200 moléculas del surfactante con sus “cabezas” polares en la superficie del agrupamiento y sus cadenas de hidrocarburo en el interior, interactúan para llevar a cabo la remoción de suciedad (Mathews et al., 2002).

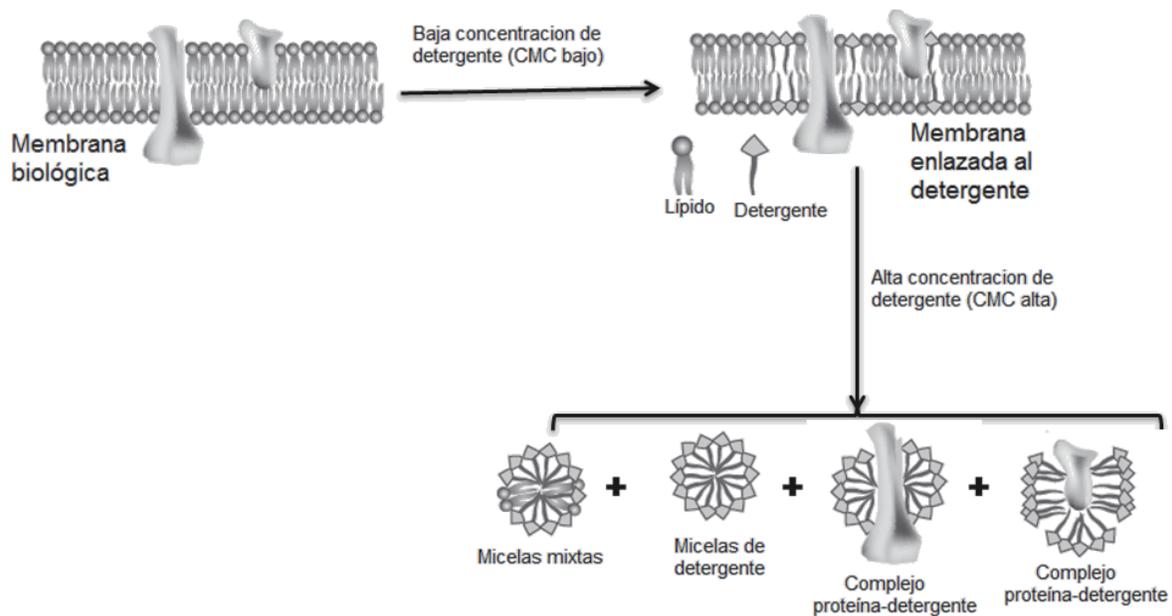


Figura 7. Disolución de una membrana biológica con surfactantes (Bhairi et al., 2007).

Las micelas se suspenden con facilidad en el agua debido a que están cubiertas de los grupos hidrófilos del surfactante, esto les confiere a los surfactantes ser el principal componente y el ingrediente activo de las formulaciones detergentes. Se considera como surfactante toda aquella sustancia que en disolución disminuye la tensión superficial del líquido, para lo cual su molécula ha de constar de dos partes bien diferenciadas: una cadena hidrófoba, generalmente formada por un número de átomos de carbono superior a 8 y uno o varios grupos polares que contrarrestan la hidrofobicidad de la cadena apolar. En función de la naturaleza del grupo o grupos polares los tensoactivos se clasifican en cuatro grandes grupos: aniónicos, catiónicos, no iónicos y anfóteros (Bhairi et al., 2007):

- **Aniónicos:** El grupo hidrófilo puede llevar una carga negativa tal como en el ión carboxilato (RCOO^-), el ión sulfonato (RSO_3^-) o el ión sulfato (ROSO_3^-). Las sales de sodio y potasio de ácidos grasos de cadena recta de menos de 10 átomos de carbono son muy solubles para disminuir la tensión superficial, pero de más de 20 átomos de carbono son insolubles en medio acuoso, donde el grupo polar se ioniza en solución acuosa adquiriendo carga negativa. Este tipo de surfactantes se encuentran presentes en la totalidad de las formulaciones detergentes, debido a sus características.
- **Catiónicos:** Cuando el grupo hidrófilo, tiene una carga positiva como por ejemplo los haluros de amonio cuaternario ($\text{R}_4\text{N}^+\text{Cl}^-$). Estos surfactantes que contienen un grupo con carga positiva son compatibles con los no iónicos y anfóteros.
- **No iónicos:** No se ionizan cuando se disuelven en agua. La carga hidrófilica que poseen proviene de la hidratación de los grupos polares presentes en su molécula (grupos etoxi, éteres amina o amida). Su uso general es como agentes humectantes, emulsionantes y de poder espumante.
- **Anfóteros:** Poseen dos o más grupos funcionales con capacidad para disociarse en solución acuosa, originando iones positivos o negativos en función del pH del medio.

Los surfactantes más frecuentes son las sales de amonio cuaternario que poseen gran afinidad por la piel y el cabello a pesar de su baja detergencia, por lo que se usan en formulaciones como acondicionadores y suavizantes, además se encuentran en formulaciones para detergentes de uso comercial para el lavado de material de cocina, además, útiles en productos para el blanqueado de prendas (Nakamura et al., 1990), en disolventes de limpieza en seco (Abo, 1990), limpiadores de cuero (Kobayashi, 1989), limpieza de lentes de contacto (Bathia, 1990), para el tratamiento de plantas de procesamiento de alimentos, inodoros, etc.

Cerca del 32% del total de producción mundial de enzimas es destinada a la formulación de detergentes y representan una de las aplicaciones más demandadas de la industria biotecnológica (Sharma et al., 2001), donde las lipasas juegan un papel de gran importancia para la remoción de grasas y aceites. Lipasas que trabajan a pH alcalino son usadas efectivamente para llevar a cabo la remoción de aceites e incrementar la eficiencia de los detergentes comerciales. Los detergentes comerciales contienen surfactantes que interactúan con las lipasas que pueden ocasionar la inhibición o activación de la enzima, por tal motivo, el entender la relación enzima-surfactantes es importante para determinar si una lipasa puede o no utilizarse como aditivo en formulación de detergentes comerciales y en la producción de fármacos.

Enzimas en la industria

Los procesos utilizados a nivel industrial catalizados por enzimas son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas en comparación con catalizadores convencionales de origen no biológico (Rivera-Pérez et al., 2007). Las enzimas han sido producidas a gran escala durante décadas y con el desarrollo de la tecnología se han sofisticado los procesos para su obtención, lo cual ha permitido contar con un amplio rango de enzimas para diversas funciones (Falch, 1991). La aplicación de enzimas en procesos industriales es una de las más dominantes como el de las industrias de bebidas y confitería entre otras

(Schäfer et al., 2006). Según NOVOZYMES en el 2011 el mercado de enzimas representó cerca de los \$10,510 billones de dólares anuales de ganancias tan solo para la industria de detergentes. Enzimas como amilasas, celulasas, proteasas y lipasas, son utilizadas en la industria para la producción de fármacos, textiles, tratamiento de aguas residuales y otras (Aravindan et al., 2006; Mahopatra et al., 2003). El incremento en la demanda de las lipasas en el mercado ha llevado a buscar nuevas fuentes de obtención. La primera lipasa comercial fue obtenida del hongo *Thermomices lanuginosa*, la cual fue lanzada al mercado en el año de 1988 por Novo-Nordisk con el nombre comercial de "Lipolase", posterior a esto, empezaron a utilizarse lipasas sintetizadas por microorganismos en la producción de ciertos alimentos como el queso (Seitz, 1974). Cerca del 2% de los microorganismos conocidos han sido estudiados como potencial fuentes de alguna enzima para alguna biotecnología.

Las lipasas se han utilizado para la síntesis de esteres mediante esterificación de alcoholes y ácidos grasos, así mismo esta reacción puede ser útil en la obtención de polímeros como el poliéster. Otras reacciones llevadas a cabo por las lipasa es la de transesterificación la cual, es relevante para la modificación de grasas y aceites, siendo una de las características muy importantes para la síntesis de lípidos estructurados en la industria de la oleoquímica. Otro de los procesos de interés catalizado por las lipasas es la hidrólisis de aceites vegetales como el aceite de oliva y el aceite de coco, para producir ácidos grasos libres y glicerol, productos de utilidad para aplicaciones esencialmente en cosmética y productos de belleza como jabones y perfumes, debido a que los mono, di y triacilglicéridos de cadena de ocho y diez carbonos (cadena mediana) pueden actuar como colorantes y bases de perfumes (Gandhi, 1997b). Las lipasas también son utilizadas en procesos para la hidrólisis de esteres de ceras, y en la manufactura de pieles, en conjunto con proteasas que se encargan de hidrolizar los lípidos encontrados en los tejidos, donde una importante cantidad de residuos de grasa y proteínas son removidas (Christner et al., 1991; Figurin et al., 1990) (Tabla 2).

En la industria alimentaria las lipasas se emplean para el desarrollo de sabores de

diferentes alimentos como el queso, la mantequilla y la margarina (Arnold et al., 1975), además de acelerar la maduración y resaltar los sabores de los quesos (Posorske, 1984). En aplicaciones médicas, se han usado para el tratamiento de tumores cancerígenos, ya que las lipasas pueden desempeñar una activación del factor de necrosis tumoral (Kato et al., 1989).

Tabla 2. Lipasas de uso comercial

Fuente	Aplicación	Compañía productora
<i>Humicola lanuginosa</i>	Aditivo para detergente	Novo Nordisk
<i>Candida cylindracea</i>	Procesamiento de alimentos	Atlas Biologics, Amano, Meito Sangyo
<i>Candida rugosa</i>	Síntesis orgánica	Amano y Novozymes
<i>Rhizomucor miehei</i>	Procesamiento de alimentos	Novozymes
<i>Termomices lanuginosus</i>	Aditivo para detergente	Novozymes
<i>Aspergillus niger</i>	Procesamiento de alimentos	Novozymes
<i>Rhizopus oryzae</i>	procesamiento de alimentos	Amano y Vyven
<i>Rhizopus niveus</i>	Oleoquímica	Amano y Biocatalysts
<i>Mucor miehei</i>	Procesamiento de alimentos	Amano
<i>Mucor javanicus</i>	procesamiento de alimentos	Gist-Biocades y Novo Nordisk
<i>Penicillium roquefortii</i>	Procesamiento de alimentos	Amano
<i>Penicillium camemberti</i>	oleoquímica	Biocatalysts
<i>Penicillium sp.</i>	Procesamiento de alimentos	Amano
<i>Candida antarctica A/B</i>	Síntesis orgánica	Biocatalysts, Boehringer Mannheim

La industria biotecnológica busca lipasas regio-selectivas para generar productos nutracéuticos como aceites enriquecidas con ácidos grasos esenciales, también con la capacidad de producir 2-monoacilgliceroles, los cuales son de importancia para la formulación de leche materna, entre otras aplicaciones. Las características que presenten las lipasas son importantes al momento de utilizarlas para alguna

biotecnología, dentro de las características de mayor importancia se encuentra el rango de pH en el que sean estables y activas, ya que en la industria de detergentes el pH de las formulaciones comerciales es de 8 a 11; y las temperaturas de reacción son de 30 a 60 °C (Hasan et al., 2010); el conocer la estabilidad en presencia de solventes orgánicos nos ayuda a elegir lipasas que resisten concentraciones hasta del 50% , además de que la regioselectividad que presenten (*sn*-2 ó *sn*-1,3) indicará la posible industria biotecnológica en la cual puede ser usada.

Las lipasas de organismos de origen acuático han sido poco exploradas. Solo se conocen las de algunas especies como la del calamar (*Ommastrephes bartrami*), también en algunos peces (*Scomber japonicus*, *Oncorhynchus gorboscha*, *Trachurus symmetricus*, *Engraulis mordax*) y crustáceos (*Carcinus mediterraneus*, *Homarus americanus*, *Penaeus vannamei*) entre otros. En el camarón *P. vannamei* se han descrito dos lipasas que trabajan a pH alcalino, que es el pH en el cual algunas lipasas comerciales son usadas en la formulación de detergentes, para esta aplicación también es necesario que mantengan su actividad a temperaturas de 30 a 50 °C y ya se sabe que las lipasas de *P. vannamei* pueden trabajar a estas temperaturas. Otra de las características que presentan las lipasas del camarón es la estabilidad en solventes orgánicos como hexano y metanol, los cuales son los solventes mayormente utilizados en la producción de biocombustibles entre otras aplicaciones. Estas características les dan a las lipasas del camarón potencialidad para ser utilizadas como biocatalizadores de importancia biotecnológica. El conocimiento de la regioselectividad de las lipasas del camarón, así como la estabilidad en diferentes surfactantes ampliara las posibilidades de ser aplicadas en alguna biotecnología.

Hipótesis

Si las lipasas digestivas de los organismos acuáticos conocidos hasta el momento muestran especificidad *sn*-2, además, si la secuencia de aminoácidos de la lipasa digestiva de *P. vannamei* (PVL) y la de *P. cepacia* presentan residuos de aminoácidos homólogos en el sitio de enlace, entonces la especificidad que presentará la PVL será *sn*-2.

Si las lipasas utilizadas en formulación de detergentes comerciales son alcalinas y mantienen su actividad en presencia de surfactantes a temperaturas de 30-60 °C y las lipasas de *P. vannamei* son alcalinas, además conservan su actividad a temperaturas de 30-50 °C, entonces serán activas y estables en presencia de surfactantes.

Objetivo general

Evaluar la especificidad de las lipasas de *P. vannamei* así como su actividad en presencia de surfactantes.

Objetivos específicos

- ❖ Purificar las lipasas digestiva e intracelular de *P. vannamei*.
- ❖ Medir la actividad en presencia de diferentes triacilglicéridos y aceites naturales
- ❖ Evaluar la regio-selectividad de las lipasas intracelular y digestiva de *P. vannamei*.
- ❖ Medir la actividad de las lipasas intracelular y digestiva en presencia de surfactantes aniónicos y no iónicos.

Materiales y métodos

Obtención de muestras

Los camarones (*Penaeus vannamei*) se obtuvieron de las facilidades del CIBNOR y fueron mantenidos en el laboratorio húmedo del laboratorio de bioquímica en tanques de fondo plano a 28 °C, 38 ppm de salinidad y 7.4 mg/L de oxígeno. Con el objetivo de purificar la lipasa digestiva e intracelular, los camarones fueron decapitados, previo aletargamiento en hielo, separando el cefalotórax del abdomen, para obtener las glándulas digestivas y los pleópodos adicionando amortiguador de fosfatos (Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) y amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.0 respectivamente, en una dilución equivalente 1:4 p/v, a continuación fueron centrifugados a 10,000 g a 4 °C, la fracción acuosa denominado extracto crudo fue almacenado a -20 °C hasta su uso. La concentración de proteína fue cuantificada por el método de Bradford (1976) empleando albúmina sérica bovina como estándar.

Determinación de la actividad de lipasa

La actividad de lipasa se evaluó empleando dos métodos basados en la titulación de los ácidos grasos libres y otro mediante la emisión de fluorescencia. El ensayo de actividad mediante titulación de los ácidos grasos libres por la hidrólisis de TAGs se llevó a cabo utilizando 0.25 mL de trioleína (Sigma T7140) en 30 mL de amortiguador Tris-HCl 2.5 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0 y goma arábiga al 3% (Gargouri et al., 1984). La actividad lipolítica fue calculada empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Ecuación: } \quad \text{Umg}^{-1} = ((A/t_A - B/t_B)(0.01)/E)(10^3)$$

Donde Umg⁻¹ se refiere a los ácidos grasos libres (μmol/m⁻¹) por mg de proteína, A y B significa el volumen de NaOH 0.01 N, t_A y t_B se refieren al tiempo de reacción (minutos) del ensayo y del blanco, respectivamente; E es la concentración de la muestra en mg/mL.

El ensayo fluorométrico se realizó con el sustrato fluorogénico MUF-Butirato (Metilumbeliferil-butirato, Fluka, 19362). La concentración utilizada de sustrato fue de 100 μM en un volumen total de 300 μL de un amortiguador Tris-HCl (50 mM, pH 8.0). La fluorescencia fue medida a 355 nm (λ_{ex}) y 460 nm (λ_{em}) después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente en un fluorómetro (BioTek Synergy 4). Una unidad de actividad corresponde a una unidad de fluorescencia relativa (UFR) por minuto. La actividad de la enzima fue calculada por mg de proteína.

Electroforesis

Para la identificación de las lipasas mediante electroforesis con geles de poliacrilamida al 12% y 8% (SDS-PAGE) de acuerdo a Laemmli (1970). La separación de proteínas se llevo a cabo a 15 mA, las bandas de proteínas fueron reveladas mediante la inmersión del gel en una solución de azul de coomasie (R-250) 0.1%, ácido acético 7.5% y metanol 5% a temperatura ambiente, posteriormente se realizó el desteñido con ácido acético 10% y metanol 40%.

Posteriormente se llevó a cabo una incubación en 50 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, el cual contenía Tritón X-100 al 1% durante 30 min, después, el gel fue sumergido e incubado en el sustrato que consistió en una solución de MUF-Butirato 100 μM en Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 por 10 min (Diaz et al., 1999). El revelado se llevó a cabo bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador BioRad (ChemiDoc TM XRS+ con el software Image Lab).

Purificación de la lipasa digestiva

Cromatografía de exclusión molecular

Se llevo a cabo la deslipidación de la glándula digestiva de *P. vannamei* mediante centrifugación, el extracto crudo se pasó por una columna NAPTM-10 Sephadex G25 (Amersham biosciences) para quitar fragmentos que afecten la matriz y se eluyó con 1.5 mL de amortiguador de fosfatos. A continuación las proteínas

contenidas en el extracto crudo se separaran por masa molecular utilizando la técnica de filtración en gel, para lo cual se empleó una columna de 150 mL de gel Sephacryl™ S-100 High Resolution (Amersham Pharmacia Biotech AB, 17-0612-10), las proteínas se eluyeron empleando 200 mL de amortiguador de fosfatos y se monitorearon con la absorbancia de 280 nm. El flujo utilizado fue de 1 mL/min y el volumen final de elución fue de 154 mL. A las fracciones colectadas (2 mL cada una) se les midió actividad específica para lipasa, aquellas que presentaron actividad específica para lipasa fueron concentradas mediante centrifugación con tubos Amicon® Ultra-15, Millipore a 4,000 g por 15 min a 25 °C para obtener un volumen final de 500 µL.

Cromatografía de intercambio aniónico

Se aplicó el concentrado de las fracciones que presentaron actividad de lipasa a una columna NAP™-5 Sephadex G25 (Amersham Biosciences) para la separación de sales y lípidos, la elución se realizó usando un amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 8.0. A continuación las fracciones con actividad de lipasa se aplicaron a una columna Resource Q (Pharmacia, Biotech). Para la elución se utilizó un gradiente de NaCl (0-1 M) en amortiguador de fosfatos. El flujo utilizado fue de 1 mL/min y el volumen de elución final de 35 mL. Fracciones de 500 µL fueron colectadas. La actividad de lipasa en cada una de las fracciones se midió utilizando el un sustrato fluorogénico (MUF-Butirato). Las fracciones con la proteína aislada con actividad de lipasa fueron almacenadas a -20 °C hasta su posterior uso.

Purificación de la lipasa intracelular

Las muestras de pleópodos que ya se encontraban en Tris-HCl 50 mM, (NH₄)SO₄ 0.5 M, pH 7.0 fueron aplicadas a una columna de Fenil-sefarosa CL-4B (1 mL), equilibrada con el mismo amortiguador. Durante el lavado de la columna, las proteínas que no se unieron a la matriz fueron removidas en el lavado. Las proteínas unidas con menor afinidad se eluyeron mediante la reducción del

(NH₄)SO₄ y la proteína de interés se eluyó mediante un gradiente de propanol (0-100%). Las fracciones obtenidas se monitorearon a 280 nm, usando un flujo de 1 mL/min con un volumen final de elución de 30 mL. Se colectaron fracciones de 500 µL cada una, el solvente de las muestras eluidas fue removido por centrifugación (AMICON® Ultra-15, Millipore) a 4,000 g por 15 min a 25 °C, la muestra sin solvente fue almacenada a -20 °C hasta su posterior uso.

Evaluación del K_M

Se evaluó el K_M de la lipasa digestiva e intracelular aisladas de *Penaeus vannamei* fueron evaluadas utilizando tributirina (C4:0), tripalmitina (C16:0), triheptanoína (C17:0) y trioleína (C18:1) a 30 °C y el método gráfico de Lineweaver-Burk, utilizando concentraciones de sustrato de 0 – 20 mM (Rivera-Pérez et al., 2011a).

Evaluación de la especificidad mediante cromatografía en capa fina (TLC)

La especificidad posicional de la lipasa fue examinada mediante cromatografía en capa fina (TLC), utilizando trioleína (Sigma, T7140) como sustrato. La mezcla de reacción contenía 0.2 mL de trioleína (150 mg), 1.8 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8.0, y 2 U de lipasa fue incubada a 30 °C con una agitación de 500 rpm durante 1 hora. Inmediatamente después de la incubación se adicionaron 10 mL de éter de petróleo con agitación. La mezcla se almacenó a -80 °C, y el éter fue decantado, las muestras fueron aplicadas en la sílica (Merck 5x20 cm, 250 micras) y sujetas a dos procedimientos de elución con diferentes solventes, método modificado de Bilyk et al. (1991). La primer mezcla de solventes para la elución consistió en Tolueno/éter dietílico/Tris/ácido acético (80:10:10:1, vol/vol); la segunda mezcla de reacción consistió en hexano/éter dietílico/ácido acético (80:20:2, vol/vol) (Song et al., 2008). Los productos de la hidrólisis se visualizaron mediante aspersion con una solución de 50% metanol, 50% ácido sulfúrico a 200 °C por 5 min.

Actividad en presencia de surfactantes

Para comparar el efecto de los surfactantes en la actividad enzimática de las

lipasas de *P. vannamei*, se midió el efecto de los surfactantes usados en la lipasas de *Aspergillus niger*, páncreas porcino y germen de trigo. Las lipasas fueron incubadas por separado en los surfactantes dodecil sulfato de sodio (SDS), etoxilato de octifenol (Tritón X-100), polisorbato 20 (Tween 20) y el éter laurílico polioxetileno 23 (Brij 35) a una concentración de 10 mM en amortiguador Tris-HCl pH 8.0, 50 mM a una temperatura de 25 °C por 60 minutos, posteriormente se utilizó el método fluorométrico para la medición de actividad de lipasa utilizando Metilumbeliferil-butirato (MUF-Butirato) 100 µM, con 500 µL de dimetil sulfoxido (DMSO) en 25 mL de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.0. Se utilizaron tres controles diferentes: 1) enzima, amortiguador y surfactante; 2) amortiguador y 3) sustrato, amortiguador y surfactante.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de la caracterización de PVL y PV_IL se analizaron utilizando análisis de varianza (ANOVA) de una vía (nivel de significancia de $p < 0.05$).

Resultados.

Purificación de las lipasa digestiva de *P. vannamei*

La lipasa digestiva fue purificada mediante dos pasos cromatográficos. Como primer paso fue la cromatografía de exclusión molecular, en la cual se observó actividad de lipasa en las fracciones 35-49 mediante zimogramas, para lo cual se utilizó el sustrato fluorogénico MUF-Butirato. Esta cromatografía de exclusión molecular también permitió aislar la lipasa intracelular (Fracciones 35-39) (Figura 8). Las fracciones con actividad de lipasa digestiva se utilizaron posteriormente para la cromatografía de intercambio aniónico, permitiendo separar otras proteínas que co-eluyeron de la cromatografía de exclusión molecular, para posteriormente almacenarse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

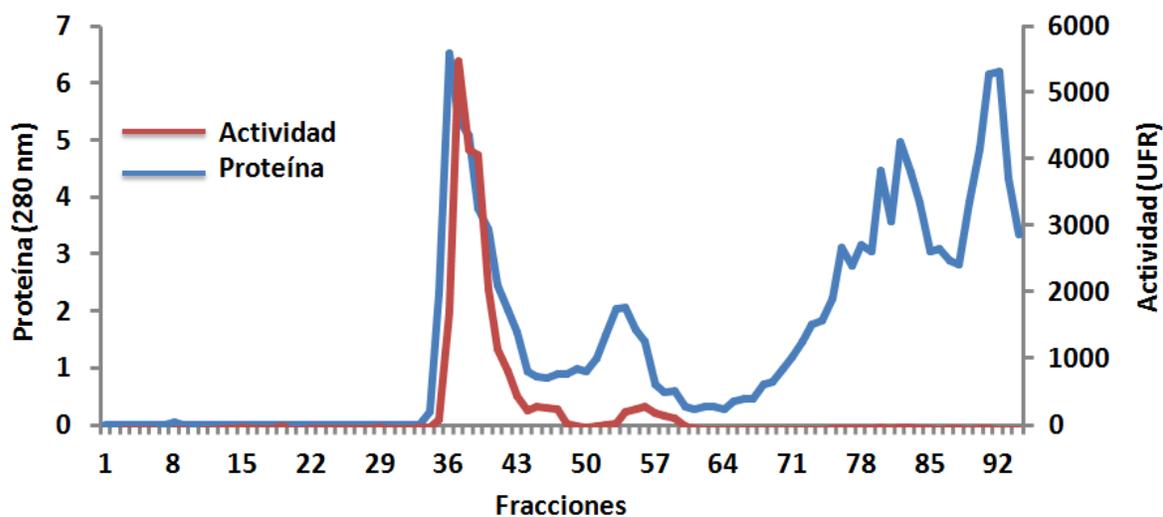


Figura 9. Cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel.

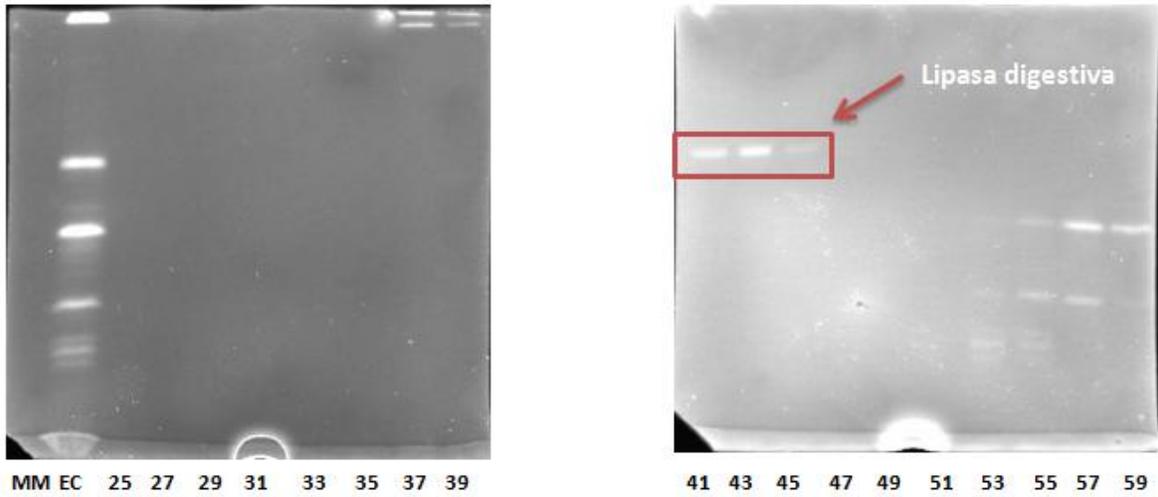


Figura 9. Fracciones de la cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel con actividad de lipasa digestiva.

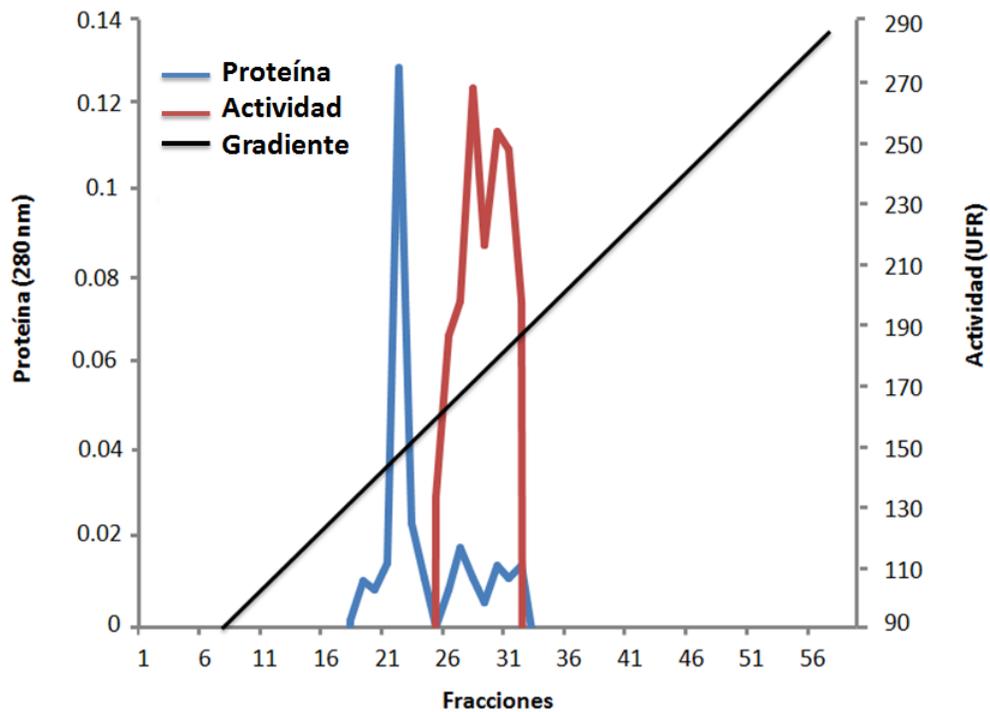


Figura 10. Cromatografía de intercambio aniónico (segundo paso de purificación de la lipasa digestiva de *P. vannamei*).

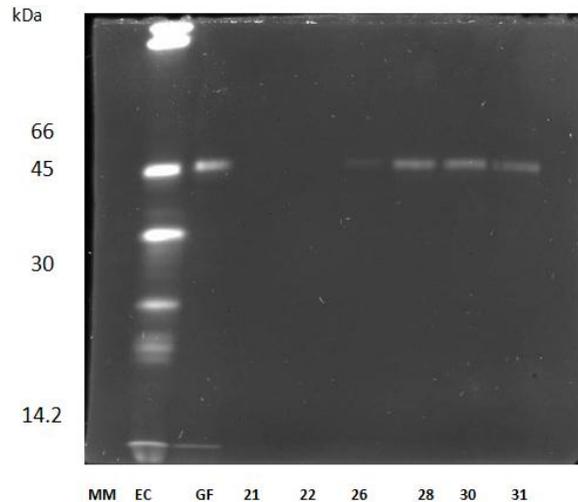


Figura 11. Actividad de lipasa digestiva en las fracciones de la cromatografía de intercambio aniónico como segundo paso de purificación revelada utilizando MUF-Butirato, MM: marcador de bajo peso molecular, EC: extracto crudo de glándula digestiva de *P. vannamei*, GF: Fracción obtenida de filtración en gel con actividad de la lipasa digestiva, 21-31: fracciones de la cromatografía de intercambio iónico con actividad de lipasa digestiva.

Purificación de la lipasa Intracelular de *P. vannamei*

La lipasa intracelular de *Penaeus vannamei* (PV_IL) se purificó según Rivera-Pérez et al. (2011b), las fracciones que se colectaron con actividad de PV_IL se visualizaron en un SDS-PAGE con MUF-Butirato bajo luz UV. En las primeras fracciones de la cromatografía se lograron separar las proteínas menos hidrofóbicas, al momento de disminuir la concentraciones de sales se observa como otras proteínas eluyen y cuando se hace un gradiente con propanol se observa que las proteínas que tuvieron una mayor afinidad por la matriz se eluyen. Al analizar las fracciones usando MUF-butirato se observa que las proteínas eluidas mediante propanol pertenecen a la PV_IL (Fig. 12, 13)

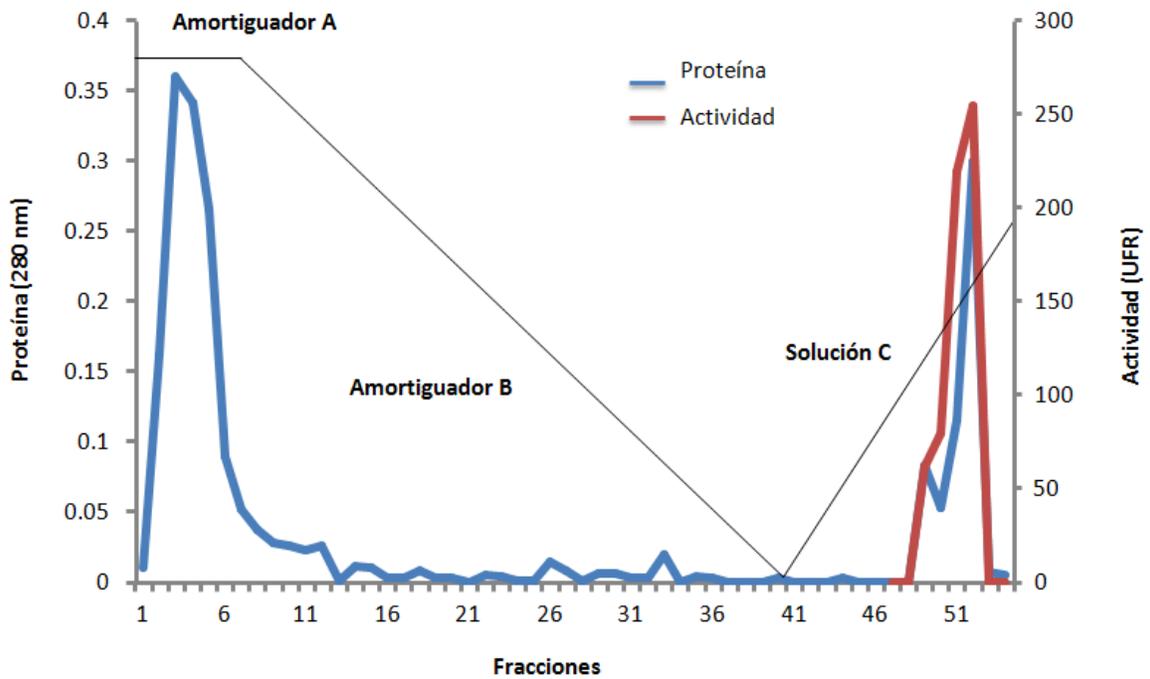


Figura 12. Cromatograma de la purificación de la lipasa intracelular de *P. vannamei* obtenida de pleopodos.

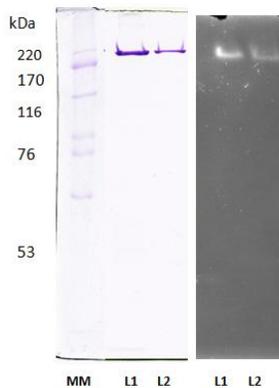


Figura 13. Lipasa intracelular purificada, MM: marcador de alto peso molecular, L1 y L2, lipasa intracelular.

Actividad de las lipasas Intracelular y digestiva de *P. vannamei*

Para demostrar que ambas lipasas tienen la capacidad de hidrolizar grasas neutras se utilizaron cuatro diferentes sustratos (tributirina, tripalmitina, triheptanoína y trioleína), a los cuales se le calculó la actividad específica promedio y la afinidad por el sustrato (K_M) (Tabla 3). Las lipasas demostraron mayor

especificidad hacia la trioleína, esto indicando que la hidrólisis del sustrato es más eficiente cuando se encuentra en presencia de TAGs de cadena larga hidrocarbonada (mayor de 14 carbonos) (Rivera-Pérez et al., 2011a). Así mismo los valores de K_M muestran que a pesar de que ambas enzimas son específicas para TAGs de de cadena larga, la lipasa intracelular tiene mayor afinidad que la lipasa digestiva al hidrolizar TAGs de cadena larga.

Tabla 3. Actividad y K_M de de lipasa en presencia de TAGs con ácidos grasos de diferente largo de cadena.

Sustrato	Actividad específica (Umg^{-1})		K_M (mM)	
	Lipasa digestiva	Lipasa Intracelular	Lipasa digestiva	Lipasa intracelular
Tributirina (C4:0)	476.2 ± 0.1	217.1 ± 0.8	38 ± 0.1	29 ± 0.4
Tripalmitina (C16:0)	658.2 ± 0.2	215.3 ± 0.7	5.6 ± 0.1	4.2 ± 0.2
Triheptanoína (C17:0)	853.7 ± 0.5	652.4 ± 0.4	4.5 ± 0.3	4.8 ± 0.4
Trioleína (C18:1)	1791.4 ± 1	929.8 ± 0.9	3.25 ± 0.2	1.2 ± 0.1

Actividad de lipasa en presencia de aceites naturales

Las lipasas (EC 3.1.1.3) tienen la capacidad de hidrolizar mezclas complejas de lípidos que se encuentran en los aceites naturales. En la Tabla 4 se muestra la actividad específica presentada por las lipasas de *P. vannamei* sobre diferentes aceites complejos, los cuales son principalmente para la estructuración de lípidos y obtención de ácidos grasos. La mayor actividad lipolítica se obtuvo en presencia del aceite de pescado, esto se debe probablemente a la cantidad de triacilglicéridos de cadena larga que contiene en comparación con los aceites de oliva y de linaza.

Tabla 4. Actividad de las lipasas intracelular y digestiva usando sustratos naturales.

Sustrato	Actividad específica (Umg ⁻¹)	
	Lipasa digestiva	Lipasa intracelular
Aceite de oliva	857.2 ± 2	1708 ± 2
Aceite de linaza	625.8 ± 6	2113 ± 2
Aceite de pescado	1207 ± 3	2573 ± 5

Actividad de lipasa en presencia de surfactantes

La estabilidad de las lipasas de *P. vannamei* en presencia de diferentes surfactantes demostraron ser más estables que las lipasas de páncreas porcino, germen de trigo y *Aspergillus niger*. En presencia de SDS la actividad relativa de la lipasa intracelular y digestiva fue de 104.38 y 71.83 UFR respectivamente, en comparación con las lipasas de páncreas porcino y la de Germen de trigo, lo que indica que estas lipasas son más estables. En presencia de los surfactantes Tritón X-100, Tween 20 y Brij 35 (Tabla 4), la actividad relativa que mostraron las lipasas del camarón a pesar de que disminuyó, fue mayor que la actividad relativa de las enzimas con las que se compararon.

Tabla 5. Actividad de lipasa en presencia de 10 mM de surfactante.

Lipasa	SDS	Tritón X-100	Tween 20	Brij 35
	% Actividad relativa *			
<i>Aspergillus niger</i>	99.2 ± 0.8	20 ± 0.3	39.6 ± 0.2	11.9 ± 0.1
Páncreas porcino	0	28 ± 0.5	55.33 ± 0.8	0
Germen de trigo	13.9 ± 0.2	22.37 ± 0.2	52.44 ± 0.1	29.37 ± 0.2
PV_IL	104.38 ± 0.2	47.8 ± 0.3	67.72 ± 0.5	33.86 ± 0.2
PVL	71.83 ± 0.1	39.4 ± 0.1	58.4 ± 0.3	21.8 ± 0.3

* Cada muestra se realizó por triplicado utilizando MUF-Butirato como sustrato, 100% es la actividad sin surfactante.

Regioselectividad de las lipasas de *P. vannamei*

Para conocer la especificidad de las lipasas se realizó una comparación con diferentes estándares (Trioleína, dioleína, monooleína y ácido oleico). Siguiendo el la metodología de Song et al. (2008) se llevó a cabo una cromatografía de capa fina para conocer los productos de la hidrólisis de trioleína generados por las lipasas del camarón. Al revelar la cromatoplaqueta se pudieron observar manchas que al relacionarlas con los estándares utilizados indican que las enzimas de *P. vannamei* hidrolizan específicamente en la posición *sn*-2, esta especificidad también ha sido reportada en otros organismos acuáticos (Patton et al., 1975). En la Figura 14 se muestra la cromatografía en capa fina donde se indica en el recuadro rojo la especificidad de las lipasas del camarón.

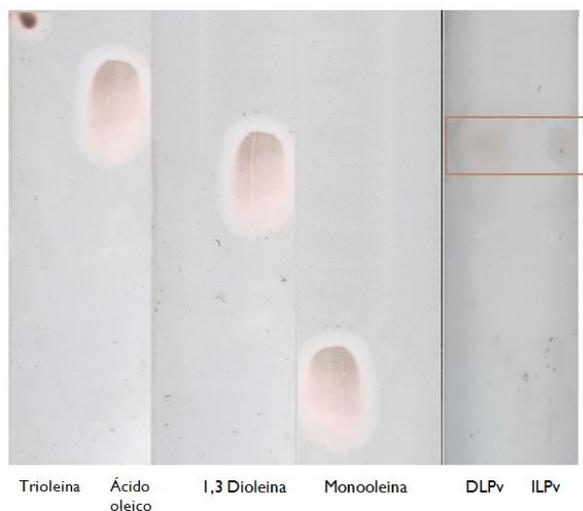


Figura 14. Cromatografía en capa fina, PVL y PV_IL son los productos de la hidrólisis de trioleína en presencia de las lipasas digestiva e intracelular de *P. vannamei* respectivamente. Recuadro rojo indica productos de Rx

Discusión

Actividad de las lipasas digestiva e intracelular de *P. vannamei*, con diferentes sustratos sintéticos y naturales.

Las lipasas catalizan una gran variedad de sustratos, incluyendo aceites naturales, triacilglicéridos y ésteres de ácidos grasos. Las grasas neutras o triacilglicéridos se han utilizado para la caracterización de lipasas verdaderas, dependiendo de las características del TAG (cadena corta, mediana o larga) la actividad que las lipasas mostrarán será diferente, esto nos indica la preferencia por el tipo de TAGs de la enzima, que es útil para conocer su aciloespecificidad. Las lipasas de *P. vannamei* son capaces de hidrolizar triacilglicéridos de cadena larga, es decir, triacilglicéridos con la longitud de la cadena hidrocarbonada compuesta de catorce o más carbonos. Lipasas microbianas, de hongos y algunos mamíferos hidrolizan preferentemente TAGs de cadena mediana o corta, como el caso de la lipasa pregástrica de ternero (calf), la cual hidroliza específicamente TAGs de cadena corta como la tributirina (O'Connor et al., 1997). Los valores de K_M que presenta la calf se ven incrementados cuando la cadena hidrocarbonada del triacilglicérido es de mayor longitud, el mismo caso se presenta con la lipasa de *Pseudomonas*

fluorescens S1K WI, esta lipasa muestra una mayor especificidad hacia el ácido tricaproico (C6:0) y tricaprilin (C8:0), presentando una actividad de 7395 U_{mg}⁻¹ en comparación con otros TAGs (Lee et al., 1993), la lipasa de *Candida rugosa* hidroliza preferentemente TAGs de cadena mediana (Wong et al., 2000) y la lipasa de la cepa Wai 28A 45 de *Bacillus* sp., en un medio que contenía tripalmitina (C16:0) y triestearina (18:0) como fuente de carbono. Estos resultados demostraron que la tripalmitina (C16:0) era el TAG que mostraba ser el mejor inductor de la actividad de la lipasa (Janssen et al., 1994). En comparación con las lipasas antes mencionadas, las lipasas del camarón muestran una mayor especificidad hacia TAGs de cadena larga, sin embargo, la entre la PVL y la *pv_li* se ha observado que a pesar de que las dos enzimas pueden hidrolizar eficientemente la trioleína, es la afinidad de la PV_IL para trioleína es mayor que la PVL.

La composición química de los ácidos grasos de los crustáceos marinos existe una alta cantidad de ácidos grasos de cadena larga insaturados en comparación con los de agua dulce (Ackman et al., 1967). Los decápodos *Pandalus borealis* (camarón), *Meganyctiphanes norvegica* (krill) y *Homarus gammarus* (langosta) contienen en efecto altas concentraciones de ácidos grasos de cadena larga (Ackman et al., 1967; Zandee, 1967) (Tabla 6A). Por otro lado se ha demostrado que los camarones tienen una limitada habilidad para sintetizar *de novo* la familia de ácidos grasos omega 3 y 6 (AGCL), incluyendo los ácidos linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3), también carecen de la habilidad de elongar y desaturar los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (Sánchez-Paz et al., 2006) y por tal motivo deben incluirlos en su dieta. Las lipasas son las encargadas de la hidrólisis de estos TAGs de cadena larga que resultan esenciales para obtener la energía necesaria para el crecimiento y la reproducción (Yepiz-Plascencia et al., 2000).

Tabla 6. Composición de ácidos grasos de organismos acuáticos. A) Composición de ácidos grasos de *P. borealis*, *M. norvegica* y *H. gammarus*, B) Perfil de ácidos grasos y distribución (%mol) del aceite de menhaden (aceite de pescado), 1,2,3 (triacilglicérido), 2 (monoacilglicérido con el ácido graso en la posición dos), 1,3 (diacilglicérido con ácidos grasos en la posición *sn*-1,3) (Ackman & Eaton, 1967; Zandee, 1967).

Ácidos grasos (numero de carbonos)	A)			B)			
	<i>P. borealis</i> Lípidos totales	<i>M. norvegica</i> Lípidos totales	<i>H. gammarus</i> Lípidos de la glandula digestiva	Aceite <i>sn</i>	Aceite de menhaden		
					1,2,3	2	1,3
14:0†	0.3	0.2	8:0			
14:0	2.9	4.8	1.6	14:0	8.5	11.4	7.0
15:0	0.5	0.6	1.4	16:0	19.4	22.1	18.0
16:0	14.9	15.2	17.7	16:1	10.3	9.6	10.7
16:1	14.1	11.8	10.3	17:0	3.9	3.4	4.2
17:0	0.3	0.7	5.8	18:0	5.4	4.2	6.0
18:0	2.6	1.3	3.9	18:1	15.0	8.2	18.4
18:1	20.2	15.3	29.9	18:2	3.5	1.2	4.6
18:2	0.8	1.3	0.1	18:3	1.7	0.3	2.4
18:3	1.0	18:4	3.6	0.5	5.2
20:0	20:1	1.4	0.7	1.8
20:1	4.8	10.5	10.7	20:5	11.9	17.1	9.2
20:4	2.0	1.1	22:1	2.5	2.8	2.4
20:5	15.3	9.3	22:6	12.9	18.4	10.1
22:1	4.9	13.1				
22:6	8.9	8.1				

Los valores de K_M de las lipasas de *P. vannamei* fueron diferentes cuando se utilizaron TAGs de distinto largo de cadena como sustrato. Las lipasas del camarón mostraron menor especificidad que las lipasas de microorganismos *Penibacillus* sp., BP-23 EstA, *Bacillus* sp., BP-7 EstA1 y *Bacillus subtilis* LipA (Prim et al., 2003) en MUF-Butirato (Rivera et al, 2011b).

La modificación de grasa y aceites es una de las principales áreas en la industria del procesamiento de alimentos y bioenergéticas (Gupta et al., 2003), los aceites naturales son la principal fuente de aceites utilizados en las “tecnologías verdes”, y se utilizan lipasas para poder modificar estos aceites. La PVL y PV_IL son capaces de hidrolizar los aceites naturales (oliva, pescado y linaza), mostrando mayor actividad en aceite de pescado, esto se explica por el tipo de TAGs contenidos en los aceites usados en este estudio. El aceite de menhaden (aceite de pescado) tiene un alto contenido de ácidos grasos de cadena larga, principalmente ácido eicosapentanoico (EPA) y docosahexanoico (DHA) ubicados en la posición *sn*-2 (Xu et al., 2000) (Tabla 6-B). En comparación el aceite de

pescado, el de oliva contiene una menor concentración de ácidos grasos poliinsaturados mayor de 18 carbonos y un contenido mayor de ácido oleico. A pesar de que el aceite de linaza contiene ácido oleico, su concentración es menor que en los aceites de oliva y el de pescado, sin embargo, el aceite de linaza ha sido utilizado como sustrato para la producción de la lipasa (Parihar, 2012). La actividad que presentan las lipasas del camarón parece estar influenciadas por el tipo de TAGs presentes en cada aceite y las características de tamaño de estos son de suma importancia para conocer la acilo-especificidad de la enzima. La aciloespecificidad que presentan las lipasas del camarón y la capacidad de hidrolizar los aceites naturales dan potencial uso en la biotecnología de los lípidos estructurados para generar aceites con mayor valor nutritivo (Nunes et al., 2011).

Actividad en presencia de surfactantes

El pH es uno de los factores importantes al momento de elegir alguna enzima para uso en detergentes, las lipasas que son estables y trabajan a pH de 8-11 y estables en temperaturas desde los 25 a los 50 °C tienen potencial para el uso en la industria de los detergentes (Hasan et al., 2006). La lipasa producida por *Acinetobacter radioresistens* muestra una actividad en el rango de pH de 6-8 y es considerada como potencial para uso en detergentes (Chen et al., 1998). Las lipasas PVL y PV_IL tienen un pH óptimo de 8 y 8-10 respectivamente (Rivera-Pérez et al., 2011a; Rivera-Pérez et al., 2011b) y una temperatura óptima de 30 °C.

Las lipasas del camarón mostraron tener actividad a concentraciones de 10 mM de distintos surfactantes, observando la mayor actividad relativa en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS). La PV_IL presentó un incremento de la actividad en un 4% más en comparación con la PVL que disminuyó aproximadamente un 30%, sin embargo, la comparación con los surfactantes Brij 35, Tween 20 y Tritón X-100 ambas lipasas mantienen una mayor actividad que las lipasas de *Aspergillus niger*, Páncreas porcino y Germen de trigo. La lipasa de *A. niger* se ha probado anteriormente en presencia de distintos detergentes comerciales como

Henko, Surf Ultra, Ariel, Surf Exlel y Tide. El SDS y el Tween 80 han demostrado ser eficiente en la remoción de aceite de oliva en prendas de algodón con un 33% (Saisubramanian et al., 2006), la lipasa de páncreas porcino ha presentado inhibición por concentraciones menores de 10 mM. Sin embargo a concentraciones de 12 mM de SDS la actividad de de la enzima se mantiene en presencia de ácido taurodeoxicólico (TDC) (Borgström et al., 1976) , así mismo los surfactantes no iónicos Brij 35, Tritón X-100 y polisorbato 20 pueden inhibir la actividad enzimática de la lipasa pancreática (Gargouri et al., 1983) dato que se corrobora con los resultados obtenidos. La información acerca de la lipasa de germen de trigo en presencia de surfactantes no se había informado hasta este trabajo, sin embargo la actividad de otras lipasas de origen vegetal se ha descrito, como la lipasa de la cucurbitácea *Cucumeropsis manii naud* en presencia de Tween 20 produce un aumento en la actividad de un 200% mientras que el Tritón X-100 muestra un efecto inhibitorio a concentraciones de 10 mM (Eze et al., 2010), por otro lado la lipasa de *Pachira aquatica* muestra inhibición de un 35% y 50% en presencia del surfactante Tritón X-100 y Tween 80 respectivamente.

La actividad lipolítica para las diferentes lipasas se ve afectada en presencia de surfactantes, explicaciones sobre el efecto del surfactante incluye un incremento y/o decremento en la estabilidad de la enzima, que afecta la interacción del sustrato con el sitio activo de la enzima (Kristensen et al., 2007). Se sabe que las lipasas pueden interactuar con los surfactantes en solución o en una interface. Experimentos *in vitro* han demostrado que los surfactantes con diferentes propiedades (no iónicos, catiónicos, aniónicos y anfóteros) se pueden utilizar para la modulación de estas interacciones. Con los surfactantes no iónicos y anfóteros las interacciones son principalmente hidrófobas, mientras que los surfactantes aniónicos o catiónicos promueven interacciones electrostáticas relacionadas con la carga de la proteína (Antipova et al., 2001). Los surfactantes iónicos (por ejemplo el SDS) forman un complejo con la enzima que altera la estabilidad y la hidrofobicidad de la superficie de la proteína se modifica. Las lipasas de camarón no necesitan de sales biliares para activarse, sin embargo, ya que las sales biliares en otras lipasas como la lipasa pancreática humana son necesarias para

cambiar la conformación de la enzima y la lid se acomoda para permitir la entrada del sustrato. En presencia de los surfactantes ocurre lo mismo, la PVL y la PV_IL pueden estar cambiando la movilidad de la lid al formar un complejo lipasa-surfactante. La actividad que presentan las dos enzimas en presencia de los surfactantes las convierte en enzimas capaces de utilizarse en alguna biotecnología, ya sea en la farmacéutica o de detergentes entre otras.

Evaluación de la selectividad posicional de las lipasas intracelular y digestiva de *P. vannamei*

Hasta el momento es poca la información acerca de las lipasas de invertebrados que se hayan descrito y menos información sobre la especificidad de las mismas. Dentro de las lipasas de invertebrados descritas se encuentra la del calamar *Ommastrephes bartramii* (Sakurno et al., 1996), la cual no muestra selectividad posicional hacia algún sitio del triacilglicérido, otras lipasas se han encontrado en crustáceos y descritas en la langosta *Panulirus argus* (Perera et al., 2008), en el cangrejo *Carcinus mediterraneus* (Cherif et al., 2007), y en los camarones *Macrobrachium borelli* (González-Baró et al., 2000), *P. monodon* (Deering et al., 1996) y *P. setiferus* (Lovett et al., 1990), sin embargo, no se conoce la regioselectividad de ninguna de ellas. En este estudio se muestra que las lipasas del camarón *P. vannamei* son capaces de hidrolizar en la posición *sn*-2 de triacilglicéridos, una de las especificidades más inusuales, ya que gran variedad de lipasas microbianas, hongos y animales muestran especificidad *sn*-1,3 y tan solo algunas presentan la especificidad *sn*-2, esta selectividad es conocida en la lipasa de *Geotrichum candidum* (Sugihara et al., 1991), la lipasa A de *Candida antártica* (Rogalska et al., 1993) y *Pseudomonas cepacia* (Jeager et al., 1999).

No se conoce con certeza el mecanismo de la regioselectividad en las lipasas, sin embargo, se han estudiado lipasas *sn*-2 y se ha llegado a conocer mediante mutaciones e inhibidores específicos de lipasas que los aminoácidos hidrofóbicos llevan a cabo un papel muy importante en el reconocimiento y acomodo del sustrato en el. Por otra parte estudios de regioespecificidad así como la

enantioselectividad de los cristales de las lipasas *sn-2* y *sn-1,3* han permitido conocer a los diferentes aminoácidos que le dan la especificidad a la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PCL), esto mediante la introducción de una combinación de tres mutaciones, Val266Leu, Leu287Ile y Phe221Leu. La Val 266 se encuentra situada en la entrada del bolsillo de acilo (en la posición *sn-3*), mientras que Leu 287 se encuentra al comienzo del bolsillo *sn-2*, así mismo la Leu287Ile y la sustitución de Val266Leu afectan el tamaño y el ancho de las posición de los bolsillos *sn-2* y *sn-3*, respectivamente, así mismo se describe que el residuo de Phe en la posición 221 se encuentra alejada como para influir directamente en especificidad de la enzima. Sin embargo, la mutación Phe221Leu logró disminuir su enantioselectividad. Estas observaciones pueden dar la clave de la especificidad de las lipasas, PCL en el sitio de enlace muestra tener una ranura hidrófoba en la que la cadena *sn-3* acilo encaja, una hendidura con una mezcla hidrófila/hidrófoba de aminoácidos para el resto *sn-2* del sustrato y una ranura hidrófoba más pequeño para la cadena *sn-1* (Jeager et al., 1999). Las diferencias en el tamaño y la parte hidrófila/hidrófoba de varios bolsillos de la enzima pueden dar la enantioselectividad y determinar las regiopreferencias de la enzima.

Conclusiones

Las lipasas intracelular y digestiva de *P. vannamei* tienen una aciloespecificidad hacia triacilglicéridos de cadena larga, los cuales son utilizados en muchos procesos biotecnológicos en la industria farmacéutica o de cosméticos.

Las lipasas de camarón mostraron la capacidad de hidrolizar aceites naturales, obteniendo una mayor K_M con aceite de pescado, el cual contiene un su mayoría ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son de importancia en la industria de oleoquímicos para la estructuración de lípidos, así también utilizados como sustratos para generar biocombustibles.

La actividad de las lipasas del camarón mantienen su actividad en presencia de 10 mM de diferentes surfactantes, y una actividad residual del 104% para la PV_IL lo que la convierte en una enzima con mayor potencial para uso en detergentes.

Con respecto a la especificidad de las lipasas PVL y PV_IL mostraron una selectividad posicional *sn*-2, la cual es de gran valor en la industria alimentaria ya que con este tipo de enzimas se puede llevar a cabo la formulación de sustitutos de leche materna.

Ambas lipasas del camarón han mostrado ser enzimas con potencial para uso en diversas industrias, ya que las características de especificidad que se han encontrado son de gran versatilidad en procesos biotecnológicos para la síntesis de aceites con mayor valor nutritivo, sustitutos de mantequillas, producción de biocombustibles y algunos fármacos.

Referencias

- Abo, M., 1990. Method of purifying dry-cleaning solvent by decomposing liquid contaminant with a lipase. World Organization Patent. 90, 606.
- Ackman, R.G., Eaton, C.A., 1967. Fatty acid composition of the decapod shrimp *Pandalus borealis*, in relation to that of Euphasid, *Meganyctiphanes norvegica*. Journal of Fisheries Research Board of Canada. 24, 467-471.
- Antipova, A., Semanova, M., Belyakova, L., Il'in, M.M., 2001. On relationships between molecular structure, interaction and surface behavior in mixture: small-molecule surfactant+ protein. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 21, 217-230.
- Aravindan, R., Anbamathi, P., Viruthagiri, T., 2006. Lipase application in food industry. Indian Journal of Biotechnology. 6, 141-158.
- Arnold, R.G., K.M., S., Dwivedi, B.K., 1975. Application of Lipolytic Enzymes to Flavor Development in Dairy Products. Journal of Dairy Science. 58, 1127–1143.
- Arpigny, J.L., Jaeger, K.E., 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. The Biochemical Journal. 343, 177-183.
- Barón-Sevilla, B., Ramírez, L.F., Hernández-Rodríguez, M., 2004. Intensive cultura of *Litopenaeus vannamei* Boon 1931, in a recirculating seawater system. Ciencias Marinas. 30, 179-188.
- Bathia, R.P., 1990. Contact lens cleaning composition containing an enzyme and a carboxylvinyl polymer. United States Patent. 4, 630-921.
- Beisson, F., Tiss, A., Rivière, C., Verger, R., 2000. Methods for lipase detection and assay: a critical review. European Journal of Lipid Science and Technology. 102, 133-153.
- Bhairi, S.M., Mohan, C., 2007. Detergents, A guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry. EMB Biosciences, afiliado de Merck KGaA, 1-37.
- Biesiot, P.M., Capuzzo, J.M., 1990. Changes in digestive enzyme activities during early development of the American lobster *Homarus americanus* Milne

- Edwards. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 136, 107-122.
- Bilyk, A., Piazza, G.J., Bistline, R.G., Haas, M.J., 1991. Separation of cholesterol, and fatty acylglycerols, acids and amides by TLC. 26. 405-406.
- Borgström, B., Donnér, J., 1976. Interactions of pancreatic lipase with bile salts and dodecyl sulfate. *Journal of Lipid Research*. 17, 491-497.
- Bradford, M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
- Brady, L., Brzozowsky, A.M., Derewnda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Hüge-Jensen, B., Norskov, L., Thim, L., Menge, U., 1990. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*. 334, 767-770.
- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G., Marty, A., 2012. Lipases and Phospholipases. *Methods in Molecular Biology*. 861, 3-30.
- Cygler, M., Schrag, J.D., 1997. Structure as a basis for understanding the interfacial properties of lipases. *Methods Enzymology*. 284, 284-327.
- Chakravorty, D., 2012. Unraveling the rationale behind organic solvent stability of lipases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 167, 439-461.
- Chen, S.J., Cheng, C.Y., Chen, T.L., 1998. Production of alkaline lipase by *Actinobacter radioresistens*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 86, 308-312.
- Cherif, S., Mnif, S., Hadrich, F., Abdelkafi, S., Sayadi, S., 2011. A newly high alkaline lipase: an ideal choice for application in detergent formulations. *Lipids in Health and Disease*. 10, 221.
- Cherif, S., Fendri, A., Miled, N., Trabelsi, H., Mejdoub, H., Gargouri, Y., 2007. Crab digestive lipase acting at high temperature: Purification and biochemical characterization. *Biochimie*. 89, 1012-1018.
- Christner, J., Pfeiderer, E., Taeger, T., 1991. Enzyme-Aided Soaking Process for Skins and Hides. United Kingdom Patent 2,233665.
- Deering, M.J., Hewitt, D.R., Brock, I., 1996. Triacylglycerol Digestion by the Leader

- Prawn *Penaeus monodon*. Journal of the World Aquaculture Society. 27, 359-361.
- Derewenda, U., Brozowski, A.M., Lawson, D.M., Derewenda, Z.S., 1992. Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. Biochemistry. 31, 1532-1541.
- Derewenda, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Yamaguchi, S., Joerger, R., Haas, M.J., Derewenda, Z.S., 1994. Current progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi. Protein Engineering. 7, 551-557.
- Diaz, P., Prim, N., Pastor, F.I., 1999. Direct fluorescence-base lipase activity assay. BioTechnique. 27, 696-700.
- Dores, I., Frimodt, C., 1987. An illustrated guide to shrimp of the world. Osprey books, Huntington, NY, USA, 229.
- Douchet, I., Haas, G., Verger, R., 2003. Lipase Regio- and Stereoselectivities Toward Three Enantiomeric Pairs of Didecanoyl-deoxyamino-O methyl glycerol: A Kinetic Study by the Monomolecular Film Technique. Chirality 15, 220-226.
- Esteban, L., Jiménez, M.J., Hita, E., González, P.A., Martín, L., Robles, A., 2011. Production of structured triacylglycerols rich in palmitic acid at sn-2 position and oleic acid at sn-1,3 positions as human milk fat substitutes by enzymatic acidolysis. Biochemical Engineering Journal. 54, 62-69.
- Eze, S.O.O., Chilaka, F.C., 2010. Lipolytic activities in some species of germinating cucurbitaceae: *Cucumeropsis manii naud*, *colocynthis vulgaris* L. and *Cucubita moschata schrad*. World Journal of Agricultural Sciences. 6, 700-706.
- Falch, E.A., 1991. Industrial enzymes-developments in production and application. Biotechnology Advances. 9, 643-658.
- FAO, 2012. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/en.
- Felgenhauer, B.E., 1992. Internal anatomy of the decapoda: an overview. Microscopic Anatomy of Invertebrates. 10, 45-75.
- Figurin, Y.V., Shestakova, I.S., Mironova, T.F., Shtein, I.V., Arends, I.M., 1990.

- Method of Processing Hides and Skins. Union of the Soviet Socialist Republic Patent 1,567,634.
- Gandhi, N., 1997a. Applications of lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 74, 621-634.
- Gandhi, N., 1997b. Applications of lipase. *Journal of American's Oil Chemistry Society*. 74, 621-634.
- Gargouri, Y., Julien, R., Bois, A.G., Verguer, R., 1983. Studies on the detergent inhibition of pancreatic lipase activity. *Journal of Lipid Research*. 24, 1336-1342.
- Gargouri, Y., Julien, R., Pieroni, G., Verguer, R., Sarda, L., 1984. Studies on the inhibition of pancreatic and microbial lipases by soybean proteins. *Journal of Lipid Research*. 25, 1214-1221.
- Ghosh, P.K., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P., Davison, S., 1996. Microbial lipases: production and applications. *Science Progress*. 79, 119-157.
- González-Baró, M.R., Heras, H., Pollero, R.J., 2000. Enzyme activities involved in lipid metabolism during embryonic development of *Macrobrachium borellii*. *Journal of Experimental Zoology*. 286, 231-237.
- Gupta, R., Rathi, P., Bradoo, S., 2003. Lipase Mediated Upgradation of Dietary Fats and Oils. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43, 635-644.
- Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A., 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. 39, 235-251.
- Hasan, F., Shah, A.A., Javed, S., Hameed, A., 2010. Enzymes used in detergent: lipases. *African Journal of Biotechnology*. 9, 4839-4844.
- Houde, A., Kademi, A., Leblanc, D., 2004. Lipases and Their Industrial Applications An Overview. *Applied Biochemistry And Biotechnology*. 118, 155-170.
- Janssen, P.H., Monk, C.R., Morgan, H.W., 1994. A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp., and continuous assay of its *p*-nitro-phenyl-palmitate esterase activity. . *FEMS Microbiology Letters*. 120, 195-200.
- Jeager, K.-E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T., 1999. Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. *Annual Review in Microbiology*. 53, 315-351.

- Kato, K., Nakamura, S., Sakugi, T., Kitai, K., Yone, K., Suzuki, J., Ichikawa, Y., 1989. Tumor Necrosis Factor and Its Activators for the Treatment of Malignant Tumors. Japanese Patent 1,186,820.
- Klivanov, A.M., 2001. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*. 409, 241-246.
- Kobayashi, H., 1989. Liquid leather cleaners. Japanese Patent. 1, 225-700.
- Kristensen, J.B., Börjesson, J., Bruum, M.H., Tjerneld, F., Jorgensen, H., 2007. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology*. 40, 888-895.
- Kwon, C.H., Lee, H.J., Kim, S.W., Kang, J.W., 2009. Lipase-catalyzed Esterification of (S)-Naproxen Ethyl Ester in Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19, 1596-1602.
- Laemmli, U.K., 1970. Clavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
- Lawson, D.M., Brozowski, A.M., Rety, S., Verma, C., Dodson, G.G., 1994. Probing the nature of substrate binding in *Humicola lanuginosa* lipase through X-ray crystallography and intuitive modelling. *Protein Engineering*. 7, 543-550.
- Lee, D.H., Park, C.H., Yeo, J.M., Kim, S.W., 2006. Lipase Immobilization on Silica Gel Using a Cross-linking Method. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 12, 777-782.
- Lee, Y.P., Chung, G.H., Rhee, J.S., 1993. Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK WI lipase expressed in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Acta*. 166, 156-164.
- Liu, Y., Chen, D., Yan, Y., Peng, C., Xu, L., 2011. Biodiesel synthesis and conformation of lipase from *Burkholderia cepacia* in room temperature ionic liquids and organic solvents. *Bioresource Technology*. 102, 10414-10418.
- Lovett, D.L., Felder, D.L., 1990. Ontogenetic Change in Digestive Enzyme Activity of Larval and Postlarval White Shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *The Biological Bulletin*. 178, 144-159.
- Mahopatra, B.R., Bampuji, M., Sree, A., 2003. Production of Industrial Enzymes

- (Amylase, Carboxymethylcellulase and Protease) by Bacteria Isolated from Marine Sedentary Organisms. *Acta Biotechnology*. 23, 75-84.
- Mathews, K., van Holde, K.E., Ahern, K.G., 2002. *Bioquímica*. Tercera edición, . Pearson Education, 353-392.
- Maytorena-Verdugo, C., 2011. Efecto de solventes organicos y temperatura en la actividad enzimatica de las lipasas digestiva e intracelular de *P. vannamei*. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, 1-56.
- Miller, C., Austin, H., Posorske, L., Gonzales, J., 1988. Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 65, 927-931.
- Nakamura, K., Nasu, T., 1990. Enzyme containing bleaching composition. *Japanese Patent*. 2, 208-400.
- Nayak, J., Viswanathan Nair, P.G., Ammu, K., Mathew, S., 2003. Lipase activity in different tissues of four species of fish: rohu (*Labeo rohita Hamilton*), oil sardine (*Sardinella longiceps Linnaeus*), mullet (*Liza subviridis Valenciennes*) and Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta Cuvier*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83, 1139-1142.
- Nunes, P.A., Pires-Cabral, P., Ferreira-Dias, S., 2011. Production olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases. *Food Chemistry*. 127, 993-998.
- O'Connor, C., Manuel, R., 1997. Calf pregastric lipase catalyzed hydrolysis of short and medium chain-length monoacid triglycerides: Temperature, pH and lipid concentration effects formation and dynamics of self-organized structures in surfactants and polymer solutions, pp. 188-191.
- Pahoja, V.M., Sethar, M.A., 2002. A review of enzymatic properties of lipases in plants, animals and microorganisms. *Pakistan Journal of Applied sciences*. 2, 474-484.
- Parihar, D.K., 2012. Production of lipase utilizing linseed oil cake as fermentation substrate. *International Journal of Science, Enviroment and Technology*. 1, 135-143.
- Patton, J., Nevenzel, J., Benson, A., 1975. Specificity of digestive lipases in

- hydrolysis of wax esters and triglycerides studied in anchovy and other selected fish. *Lipids*. 10, 575-583.
- Perera, E., Moyano, F.J., Díaz, M., Perdomo-Morales, R., Montero-Alejo, V., Rodriguez-Viera, L., Alonso, E., Carrillo, O., Galich, G.S., 2008. Changes in digestive enzymes through development and molt stages in the spiny lobster *Panulirus argus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 151, 250-256.
- Polizelli, P., Tiera, M., Bonilla-Rodriguez, G., 2008. Effect of Surfactants and Polyethylene Glycol on the Activity and Stability of a Lipase from Oilseeds of *Pachira aquatica*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 85, 749-753.
- Posorske, L., 1984. Industrial-scale application of enzymes to the fats and oil industry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 61, 1758-1760.
- Prim, N., Sánchez, M., Ruiz, C., Javier Pastor, F.I., Diaz, P., 2003. Use of methylumbeliferyl-derivative substrates for lipase activity characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 22, 339-346.
- Rivera-Pérez, C., García-Carreño, F., 2007. Enzimas Lipolíticas y su Aplicación en la Industria del Aceite. *BioTecnología*. 11, 37-45.
- Rivera-Pérez, C., García-Carreño, F., Saborowski, R., 2011a. Purification and Biochemical Characterization of Digestive Lipase in Whiteleg Shrimp. *Marine Biotechnology*. 13, 284-295.
- Rivera-Pérez, C., del Toro, M.d.I.Á.N., García-Carreño, F., 2011b. Purification and characterization of an intracellular lipase from pleopods of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 158, 99-105.
- Rogalska, E., Ransac, S., Verger, R., 1990. Stereoselectivity of lipases. *The Journal of Biological Chemistry*. 226, 20271-20276.
- Rogalska, E., Cudrey, Ferrato, F., Verger, R., 1993. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. *Chirality*. 5, 24-30.
- Royon, D., Daz, M., Ellenrieder, G., Locatelli, S., 2007. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresource*

- Technology. 98, 648-653.
- Saisubramanian, N., Edwinoliver, N.G., Nandakumar, N., Kamini, N.R., Puvanakrishnan, R., 2006. Efficacy of lipase from *Aspergillus nigeras* an additive in detergent formulations: a statical approach. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 33, 669-676.
- Sakurno, Takahashi, K., Huatano, M., Sakurai, Y., 1996. Lipase from neon flying squid hepatopancreas: purification and properties. *Food Chemistry*. 57, 515-521.
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Muhlia-Almazán, A., Peregrino-Uriarte, A.B., Hernández-López, J., Yepiz-Plascencia, G., 2006. Usage of energy reserves in crustaceans durin starvation: Status and future directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 36, 241-249.
- Sarda, L., Desnuelle, P., 1958. Action de la lipase pancréatique sur les esteres en emulsion. *Biochemical and Biophysical Acta*. 30, 513-552.
- Savelli, G., Spreti, N., Di Profio, P., 2000. Enzyme activity and stability control by amphiphilic self-organizing systems in aqueous solutions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 5, 111-117.
- Schäfer, T., Borchert, T.W., Nielsen, V.S., Skagerlind, P., Gibson, K., Wenger, K., Hatzack, F., Nilsson, L.D., Salmon, S., Pedersen, S., Heldt-Hansen, H.P., Poulsen, P.B., Lund, H., Oxenbøll, K.M., Wu, F.G., Pederse, H.H., Xu, H., 2006. *Industrial Enzymes. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 105, 59-131.
- Scharg, J.D., Cygler, M., 1997. Lipases and the α/β fold. *Methods in Enzymology*. 284, 85-106.
- Schmidt-Dannert, C., Rúa, M.L., Atomis, H., Schmidt, R.D., 1996. Termoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochemical Engineering Journal*. 1301, 105-114.
- Seitz, E.W., 1974. Industrial Application of Microbial Lipases: A Review. *Journal of The American Oil Chemists Society*. 51, 12-16.
- Sharma, R., Chisti, Y., Benerjee, U.C., 2001. Production purification and

- characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. 19, 627-662.
- Smith, G.M., Rothwell, K., Wood, S.L., Yeaman, S.J., Bownes, M., 1994. Specificity and localization of lipolytic activity in adult *Drosophila melanogaster*. *Biochemical Journal Reviews*. 304, 775-779.
- Song, X., Qi, X., Hao, B., Qu, Y., 2008. Studies of substrate specificities of lipases from different sources. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 110, 1095-1101.
- Stamatis, H., Xenakis, A., Kolisis, F.N., 1999. Bioorganic reactions in microemulsions: the case of lipases. *Biotechnology Advances*. 17, 293-318.
- Stehr, F., 2003. Microbial lipases as virulence factors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 22, 347-355.
- Stránský, K., Zarevúcka, M., Kejík, Z., Wimmer, Z., Macková, M., Demnerová, K., 2007. Substrate specificity, regioselectivity and hydrolytic activity of lipases activated from *Geotrichum* sp. *Biochemical Engineering Journal*. 34, 209–216.
- Sugihara, A., Shimada, Y., Tominga, Y., 1991. A novel *Geotrichum candidum* lipase with some preference for the 2-position on a triglyceride molecule. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 35, 738-740.
- Valdez, G., Díaz, F., Sierra, E., Sierra, E., 2008. Efecto de la salinidad sobre la fisiología energética del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Hidrobiológica*. 18, 105-115.
- Verger, R., 1997. Interfacial activation” of lipases: facts and artifacts. *Trends in Biotechnology*. 15, 32-38.
- Wong, W., Basri, M., Razak, C., Salleh, A., 2000. Synthesis of medium-chain glycerides using lipase from *Candida rugosa*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 77, 85-88.
- Xu, X., Fomuso, L., Akoh, C., 2000. Modification of menhaden oil by enzymatic acidolysis to produce structured lipids: Optimization by response surface design in a packed bed reactor. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 77, 171-176.

- Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I., 2000. Peneid shrimp hemolymph lipoproteins. *Aquaculture*. 191, 177-189.
- Zandee, D.I., 1967. Absence of cholesterol synthesis as contrasted with the presence of fatty acid synthesis in some arthropods. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 20, 811-822.