



UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS**

POSGRADO EN BIOCENCIAS

**CARACTERIZACIÓN PARCIAL Y
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ENZIMÁTICA DE LA LIPASA PANCREÁTICA
DE *Totoaba macdonaldi*.**

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

presenta:

EDNA BERENICE SANTANA BEJARANO

Hermsillo, Sonora, México

Septiembre de 2017

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestra en Biociencias** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca de Ciencias Biológicas y de la Salud para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

Edna Berenice Santana Bejarano

Autor

Dra. Nohemí Gámez Meza

Coordinadora del Programa de Maestría en Biociencias

CARACTERIZACIÓN PARCIAL Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ENZIMÁTICA DE LA LIPASA PANCREÁTICA DE *Totoaba macdonaldi*.

T E S I S

que para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

presenta:

EDNA BERENICE SANTANA BEJARANO

Hermosillo, Sonora, México.

08 de Septiembre de 2017

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis intitulada "Caracterización parcial y determinación de la actividad enzimática de la lipasa pancreática de *Totoaba macdonaldi*" presentada por Edna Berenice Santana Bejarano, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias.



Dra. Mayra Lizett González Félix
Directora y Presidenta



Dr. Martín Pérez Velázquez
Co-director



Dra. Nohemi Gámez Meza
Sinodal interno y Secretario



Dra. Teresa Gollas Galván
Sinodal externo

DEDICATORIA

“A mi familia,
por brindarme su luz en tiempos de oscuridad,
por ser en tiempos difíciles mi estrella polar,
por ser lo mejor y más hermoso que la vida me pudo dar,
los AMO como ustedes me enseñaron,
desde lo más profundo de mi alma
sincera y eternamente”

A la vida...

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS) y al Posgrado en Biociencias por permitirme realizar mis estudios de posgrado dentro de sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico durante mi maestría.

A mi directora de tesis la Dra. Mayra Lizett González Félix, por apoyarme incondicionalmente, por haber compartido sus experiencias, conocimientos, consejos y por el tiempo dedicado durante la realización de mi trabajo de tesis, así como en mi formación profesional. Al Dr. Martín Pérez Velázquez, por sus importantes contribuciones y constante motivación para el desarrollo adecuado de este trabajo. A mis sinodales la Dra. Nohemí Gámez y la Dra. Teresa Gollas por todo el apoyo y tiempo dedicado a este proyecto, por las asesorías y acertadas opiniones que llevaron este trabajo por buen camino.

Al Centro de Reproducción de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES), por la donación de los organismos evaluados en este trabajo.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD A.C.), por permitirme llevar a cabo mi estancia de investigación.

Un agradecimiento muy especial a Ana Gloria Villalba por apoyarme durante todo este proceso, por los consejos brindados y por siempre motivarme a seguir adelante. A Perla Urquidez por ser un hombro donde apoyarme y por su ayuda en todo momento. A la Dra. Burboa y Edgar por su apoyo incondicional, por permitirme trabajar dentro de su laboratorio, por los consejos brindados, por su amabilidad y amistad. A Cecilia Piri por brindarme su apoyo y hacer menos pesado mi estancia en la Universidad de Sonora.

A mis compañeros de generación, Felipe, Daniela, Lara y Cire. A los Songos, que siempre estuvieron al pendiente de este trabajo y por apoyarme durante todo este proceso.

Especialmente deseo agradecer a mi familia, que siempre ha estado a mi lado para apoyarme de todas las formas posibles. A mi madre, Margarita Bejarano, por siempre escucharme, por su cariño incondicional, por ser mi apoyo y la persona más importante en mi vida, porque gracias a ella soy quien soy ahora. A mis hermanos y hermanas Jessica, Vitaliano, Dupret, Hildegardo, Uriel, Judith, Jaziel y Margarita, por siempre aconsejarme y guiarme por el buen camino, por brindarme su apoyo y cariño a pesar de la distancia. A mis sobrinos Sahak, Bastian, Merak, Sofia y Ana, por ser mi motivación diaria. A mis cuñados Gabriela, Sandra y Nelson por el gran apoyo y confianza que me han brindado desde siempre.

Y a toda la gente que de alguna forma me apoyó durante la realización de este trabajo, muchas gracias.

RESUMEN

Los lípidos son uno de los principales macronutrientes que constituyen los alimentos balanceados utilizados en acuicultura. La secreción de la lipasa pancreática promueve la digestión del lípido dietario en la parte anterior del intestino delgado de los peces y su concentración varía en función de la dieta y la edad. Sin embargo, la caracterización y cuantificación de la lipasa en peces no es algo común, especialmente en especies como *Totoaba macdonaldi*, cuyo cultivo es relativamente reciente, y para la cual aspectos básicos como sus requerimientos nutricionales todavía se siguen investigando. El objetivo de este trabajo fue realizar la caracterización parcial y determinar la actividad enzimática de la lipasa pancreática de *T. macdonaldi*. Conocer las características de la lipasa pancreática ayudará en la optimización de los lípidos dietarios incluidos en el alimento balanceado para su cultivo. Se determinó el peso molecular de la lipasa pancreática nativa mediante electroforesis SDS-PAGE y se evaluó su actividad en extractos enzimáticos de diversas regiones del tracto gastrointestinal. Los índices biológicos analizados reflejaron que los organismos evaluados presentaban un buen estado nutricional, y se estimó un peso molecular de 70.4 kDa para su lipasa pancreática; la banda de la enzima se confirmó mediante un zimograma donde se evidenció actividad de la enzima mediante la huella de actividad de tono amarillento en un gel teñido por un sustrato cromogénico. Se observó actividad óptima para la enzima a 45°C y a pH de 8.0, siendo su concentración y actividad mayor en el intestino anterior y ciegos pilóricos que en las partes distales del intestino. Las características bioquímicas observadas para la lipasa de *T. macdonaldi* en este estudio son similares a las reportadas para algunas lipasas de peces cultivados en el mundo, y representa un avance en el conocimiento de la lipasa pancreática involucrada en el proceso digestivo de esta especie.

ABSTRACT

Lipids are one of the main macronutrients that constitute balanced feeds used in aquaculture. Adequate utilization of dietary lipid is influenced by the activity of pancreatic lipase, an enzyme that promotes digestion of dietary lipids in the anterior gastrointestinal tract of fish, and whose concentration varies with diet and animal size. Characterization and quantification of lipase in fish is not common, particularly for species like *Totoaba macdonaldi*, with quite a recent story in aquaculture, and for which nutritional requirements have been partially investigated and established. The aim of this work is to partially characterize and evaluate the enzymatic activity of pancreatic lipase for *T. macdonaldi*. Knowing the characteristics of pancreatic lipase for this species could help optimize the dietary lipids included in balanced feeds for its culture. Pancreatic lipase molecular weight was determined by SDS-PAGE electrophoresis and its activity was evaluated in enzymatic extracts from different gastrointestinal tract regions. Biological indexes showed that experimental organisms had a good nutritional status; molecular weight of lipase was estimated to be 70.4 kDa. The band corresponding to the enzyme was confirmed with a zymogram where the enzymatic activity was evidenced by a yellow track on a gel stained by a chromogenic substrate. Optimal activity for this enzyme was observed at 45°C and pH of 8.0, being its activity and concentration much higher in the anterior intestine and pyloric caeca than in the distal parts of the intestine. The biochemical characteristics observed for the lipase of *T. macdonaldi* in this study are similar to some other lipases of fish cultured worldwide; these observations represent new knowledge of the role pancreatic lipase plays in the digestive process of this species.

ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN	<i>i</i>
DEDICATORIA	<i>ii</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>iii</i>
RESUMEN	<i>iv</i>
ABSTRACT	<i>v</i>
INDICE DE FIGURAS	<i>viii</i>
INDICE DE TABLAS	<i>x</i>
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	3
I.1. Acuicultura en México	3
I.2. Cultivo de peces marinos	4
I.3. La familia Sciaenidae	5
I.3.1. <i>Totoaba macdonaldi</i>	6
I.3.1.1. Sistemática de la totoaba	6
I.3.1.2. Biología de la especie	7
I.3.1.3. La pesca y el cultivo de totoaba	8
I.4. Requerimientos nutricionales en peces	9
I.4.1. Proteínas	9
I.4.2. Lípidos	10
I.4.2.1. Importancia de los lípidos en peces	11
I.4.2.2. Metabolismo energético	13
I.5. Enzimas digestivas en peces	15
I.5.1. Factores que influyen en la actividad enzimática	17
I.5.1.1. pH	17
I.5.1.2. Temperatura	18
I.6. Las lipasas	19
I.6.1. Estructura de las lipasas	19
I.6.2. Mecanismo de acción	21
I.6.3. Aplicaciones de las lipasas	21
I.7. Lipasa pancreática en peces	23
II. JUSTIFICACIÓN	25
III. HIPOTESIS	26
IV. OBJETIVOS	27
IV.1. Objetivo general	27
IV.2. Objetivos específicos	27

	Página
V. MATERIALES Y MÉTODOS	28
V.1. Obtención de organismos	28
V.2. Determinación de los índices biológicos	28
V.3. Determinación del peso molecular	29
V.3.1. Obtención del extracto enzimático	29
V.3.2. Determinación de proteína	29
V.3.3. Electroforesis SDS-PAGE	29
V.3.4. Zimograma	30
V.3.4.1. Detección de la lipasa en zimograma	30
V.3.4.2. Preparación del sustrato cromogénico	30
V.4. Determinación de la actividad de la lipasa	31
V.4.1. Obtención del extracto enzimático	31
V.4.2. Determinación de la actividad de la lipasa en el tracto gastrointestinal	31
V.4.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la lipasa	33
V.4.4. Efecto del pH sobre la actividad de la lipasa	33
V.5. Análisis estadístico	34
VI. RESULTADOS	35
VI.1. Índices biológicos	35
VI.2. Peso molecular y concentración de la lipasa pancreática	37
VI.3. Actividad enzimática de la lipasa en el tracto gastrointestinal	39
VI.3.1. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la lipasa	40
VI.3.2. Efecto del pH sobre la actividad de la lipasa	42
VII. DISCUSIÓN	45
VII.1. Índices biológicos	45
VII.2. Peso molecular y concentración de la lipasa pancreática en diferentes	47
secciones del tracto gastrointestinal	
VII.3. Actividad enzimática de la lipasa en diferentes secciones del tracto	48
gastrointestinal	
VII.3.1. Efecto de la temperatura en la actividad de la lipasa	50
VII.3.2. Efecto del pH en la actividad de la lipasa	51
VIII. CONCLUSIONES	53
IX. RECOMENDACIONES	54
X. LITERATURA CITADA	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Contribución de la acuicultura y la pesca de captura al pescado para consumo humano (FAO, 2016).	4
2	Producción acuícola de peces marinos a nivel mundial en el 2010 (FAO, 2012).	6
3	<i>Totoaba macdonaldi</i> .	7
4	Morfología de <i>Totoaba macdonaldi</i> (Fischer <i>et al.</i> , 1995).	7
5	Conformación del tipo α/β de la lipasa (Ollis <i>et al.</i> , 1992).	20
6	A) Condiciones de corrida del extracto enzimático nativo para detección en zimograma de la lipasa pancreática de <i>T. macdonaldi</i> . B) Gel nativo después de la corrida electroforética sumergido en el substrato cromogénico.	31
7	Mezcla de reacción antes (A) y después (B) de la determinación de la determinación de la actividad enzimática.	33
8	Tracto gastrointestinal de <i>Totoaba macdonaldi</i> .	36
9	Visceras de <i>Totoaba macdonaldi</i> .	36
10	Gel de electroforesis en poliacrilamida para determinar el peso molecular de lipasa pancreática de <i>Totoaba macdonaldi</i> , correspondiente a 70.4 kDa.	37
11	Lipasa pancreática de <i>Totoaba macdonaldi</i> : A) Gel nativo teñido con QC Colloidal Coomassie: Carril 1. Intestino medio, carril 2. Intestino anterior, carril 3. Ciegos pilóricos, carril 4. Intestino posterior, carril 5. Intestino medio, carril 6. Intestino anterior de <i>Totoaba macdonaldi</i> , y carril 7. Lipasa humana. B) Zimograma: Carril 1 y 2. Lipasa pancreática del intestino anterior de <i>Totoaba macdonaldi</i> .	38
12	Concentración de lipasa pancreática (mg/g de tejido) a lo largo del tracto gastrointestinal de <i>Totoaba macdonaldi</i> .	39
13	Actividad enzimática de la lipasa pancreática en diferentes regiones del tracto gastrointestinal de <i>Totoaba macdonaldi</i> a 35°C.	40
14	Actividad enzimática de la lipasa pancreática en el intestino anterior de <i>Totoaba macdonaldi</i> a diferentes temperaturas.	41
15	Actividad enzimática de la lipasa pancreática en ciegos pilóricos de <i>Totoaba macdonaldi</i> a diferentes temperaturas.	42

16	Actividad enzimática de la lipasa pancreática en intestino anterior de <i>Totoaba macdonaldi</i> a diferentes pH	43
17	Actividad enzimática de la lipasa pancreática en ciegos pilóricos de <i>Totoaba macdonaldi</i> a diferentes pH.	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
I	Índices biológicos de <i>Totoaba macdonaldi</i> . Los valores indican el promedio de 40 organismos experimentales \pm error estándar de la media (E.E.).	35
II	Actividad enzimática de lipasa a diferentes temperaturas en intestino anterior y ciegos pilóricos de <i>Totoaba macdonaldi</i> .	41
III	Actividad enzimática de lipasa a diferentes pH en intestino anterior y ciegos pilóricos de <i>Totoaba macdonaldi</i> .	43

INTRODUCCIÓN

El interés en el cultivo de peces marinos ha crecido en México y en el resto del mundo en la última década, pues es una opción sumamente rentable desde el punto de vista económico para diversificar las especies acuícolas que actualmente se comercializan en el mercado nacional e internacional (Perez-Velazquez *et al.*, 2015) y que contribuyen a satisfacer la demanda por alimentos con un alto contenido de proteína y de ácidos grasos esenciales (FAO, 2014). El desarrollo sustentable de esta actividad propone también un beneficio ecológico al ofrecer una opción alternativa a la pesquería como fuente exclusiva de algunas especies de peces comerciales (Carta Nacional Acuícola, 2012), incluso mediante el repoblamiento como una oportunidad para reducir su impacto en las poblaciones naturales.

La comercialización de peces marinos cultivados en México es sumamente limitada si se compara con otros países como China (1,189.7 mil toneladas), Noruega (1,330.4 mil toneladas), Chile (899.4 mil toneladas), Japón (238.7 mil toneladas), o España (44 mil toneladas), por mencionar algunos (FAO, 2016). Sin embargo, recientemente se ha introducido exitosamente en el mercado nacional el filete de *Totoaba macdonaldi*, un sciánido cultivado en el noroeste del país que es endémico del Golfo de California. Instituciones de educación superior como la Universidad de Sonora y la Universidad Autónoma de Baja California, así como el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada Baja California (CICESE) y el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), han contribuido al establecimiento de sus requerimientos nutricionales para la formulación de un alimento balanceado nacional para su cultivo comercial, todavía incipiente, pero con gran potencial. Sin embargo, existen todavía algunas precisiones por hacer respecto al requerimiento de algunos macro y micronutrientes para optimizar las formulaciones de alimento comercial para esta especie, y en ello se continúa trabajando.

Entre otros nutrientes, los lípidos son uno de los principales macronutrientes que constituyen los alimentos balanceados utilizados en acuicultura para promover el crecimiento (González-Félix *et al.*, 2015). Son componentes de tejidos y membranas celulares e

importantes fuentes de energía para peces, crustáceos y moluscos cultivados (Tocher, 2003). En peces, cuando este nutriente se incluye en la dieta a un nivel superior al óptimo requerido, la grasa tiende a almacenarse en el cuerpo del organismo y ello puede afectar la calidad del filete (Bromley, 1980; Hillestad y Johnsen, 1994). Por otra parte, se ha observado en especies como la curvina roja *Sciaenops ocellatus* (Ellis y Reigh, 1991; McGoogan y Gatlin, 1999) y la totoaba (Rueda-López *et al.*, 2011), que el exceso de lípido dietario limita la tasa de consumo de alimento, lo que resulta en un crecimiento limitado.

En general, se ha observado que en peces la proteína dietaria puede fácilmente ser utilizada como fuente de energía, por lo que el uso preferencial del lípido dietario para este mismo fin puede tener un “efecto ahorrador” de proteína y facilitar su uso para el crecimiento somático (Shiau y Lan, 1996; Thoman *et al.*, 1999; Rueda-López *et al.*, 2011; Hixson, 2014). Sin embargo, el conocimiento sobre los procesos metabólicos que permiten a los peces marinos el uso del lípido dietario es muy limitado.

Para corregir esto, se hace necesario el estudio de las características funcionales de la lipasa pancreática, enzima que juega un papel fundamental en la hidrólisis de lípidos en el intestino de vertebrados, de hecho, es considerada la enzima lipolítica más importante (Kurtovic *et al.*, 2010). En peces, se han reportado lipasas pancreáticas en especies como el bacalao del atlántico *Gadus morhua* (Gjellesvik *et al.*, 1989, 1992), la dorada (*Sparus aurata*; Nolasco *et al.*, 2011), el pargo japonés (*Pagrus major*; Iijima *et al.*, 1998), el salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*; Kurtovic *et al.*, 2010), y la lisa gris (*Liza parsia*; Islam *et al.*, 2008), entre otros. Se ha observado que la actividad y concentración de esta enzima en diferentes especies de peces varía en función de su dieta y su hábitat (Rueda-López *et al.*, 2017).

Totoaba no presenta cambios significativos en su crecimiento al ser alimentada con una dieta con 46% de proteína y niveles de lípido dietario que van desde 8 a 22% (Pérez-Velázquez *et al.*, 2016). Sin embargo, se desconoce si el nivel de inclusión de lípido dietario ejerce alguna influencia sobre la concentración de la lipasa pancreática en el intestino de esta especie; también se desconocen las características de la enzima y bajo qué condiciones su actividad es óptima. Conocer dichos aspectos de la lipasa pancreática de *T. macdonaldi* contribuirá a la optimización en la formulación de los lípidos en el alimento para su cultivo.

I. ANTECEDENTES

I.1. Acuicultura en México

La acuicultura se puede definir como el cultivo de diferentes especies acuáticas como peces, crustáceos, moluscos y plantas bajo condiciones controladas, teniendo como principal objetivo el proveer alimento para consumo humano (Edwards, 2000). Esta actividad es de gran importancia comercial a nivel mundial y la producción anual se encuentra en constante crecimiento, mientras que la producción pesquera se ha estancado desde hace tiempo, siendo en el año 2014 la primera vez que la acuicultura aportó más cantidad de pescado destinado a la alimentación humana con poco más de 10 Kg per cápita (Figura 1, FAO, 2016), en comparación con el volumen aportado por las pesquerías. En este mismo año, la acuicultura produjo un total de 73.8 millones de toneladas de productos acuáticos, de los cuales, 6.3 millones corresponden al cultivo de especies de peces marinos y costeros (FAO, 2016).

México es un importante productor acuícola que se destaca principalmente por la producción de peces de agua dulce y camarón. Según la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, la producción total de captura en México alcanzó en 2012, 1.43 millones de toneladas, mientras que la acuicultura aportó casi 300 mil toneladas de producción (CONAPESCA, 2013). Sin embargo, la producción de camarón se ha reducido debido a su elevada susceptibilidad a patógenos y en consecuencia se han tratado de diversificar las especies de cultivo en el país, siendo los peces marinos uno de los grupos principales en los que se ha centrado el interés para su cultivo comercial (Perez-Velazquez *et al.*, 2014).

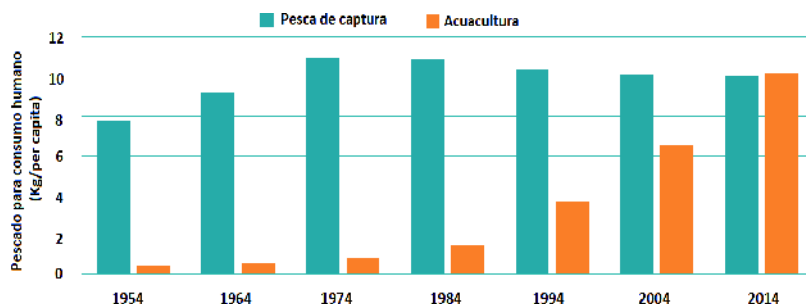


Figura 1. Contribución de la acuicultura y la pesca de captura al pescado para consumo humano (FAO, 2016).

I.2. Cultivo de peces marinos

Entre las especies de peces marinos que se han logrado cultivar exitosamente en el mundo se encuentran el pargo *Pagrus major*, la anguila *Anguilla japonica*, el ambejack *Seriola quinqueradiata* y el lenguado *Paralichthys olivaceus* en Japón, la dorada *S. aurata* y la lubina europea *Dicentrarchus labrax* en el mar Mediterráneo, el salmón del Atlántico *Salmo salar*, el lenguado *Psetta máxima* y la lisa *Mugil cephalus* en Europa y América, la curvina roja *S. ocellatus* en Estados Unidos, *Chanos chanos* y barramundi *Lates calcarifer* en Asia, por mencionar algunos (Garibaldi, 1996; FAO, 2014)

En México, la comercialización de peces marinos cultivados es sumamente limitada registrándose una producción de apenas 1,629.8 toneladas en el año 2012 (CONAPESCA, 2012). Sin embargo, los esfuerzos por lograr el cultivo de algunas especies marinas no han cesado y actualmente muchos centros de investigación se encuentran evaluando el potencial acuícola de diferentes especies marinas (Minjarez-Osorio *et al.*, 2014). Entre ellas, se encuentran algunos miembros pertenecientes a la familia Sciaenidae que han mostrado tener características adecuadas para la producción exitosa y rentable de su cultivo comercial, dentro de las que destacan una elevada tasa de crecimiento, la aceptación de alimento balanceado, resistencia a enfermedades, facilidad de reproducción en cautiverio, maduración temprana, alta fecundidad, conversión eficiente de alimento (ADCP, 1978), además de una gran aceptación por parte de los consumidores debido a la gran calidad de su carne (Cárdenas, 2012).

I.3. La familia Sciaenidae

Los sciánidos, también conocidos como curvinas o roncadorez debido al sonido que producen por acción de su vejiga natatoria, es un grupo muy diverso y se encuentra representado por 70 géneros y alrededor de 270 especies distribuidas en aguas de todo el planeta (Cárdenas, 2011). Aunque en su mayoría son especies marinas también existen especies dulceacuícolas. Habitan zonas poco profundas cerca de las regiones continentales con fondos arenosos y lodosos (CITES, 2005; Paredes *et al.*, 2010).

La pesquería de sciánidos es una actividad muy importante a nivel mundial y su cultivo ha ido en aumento en los últimos años. Según la FAO (2012), en el año 2010 el grupo de los sciánidos ocupó el tercer lugar de peces marinos más cultivados en el mundo con una producción aproximada de 150,000 toneladas (Figura 2). Entre las especies de sciánidos que se han adaptado exitosamente a condiciones de cultivo podemos mencionar a la curvina pinta *Cynoscion nebulosus*, curvina blanca *Atractoscion nobilis*, curvina amarilla *Pseudosciaena crocea* y la curvina roja *S. ocellatus* (Cárdenas, 2012).

En México la familia Sciaenidae es uno de los grupos de peces marinos con mayor importancia comercial. En el año 2013 se obtuvo una producción pesquera de sciánidos o corvinas de 8,261 toneladas en peso vivo (CONAPESCA, 2013), y solamente en el Golfo de California se han descrito alrededor de 30 especies (Van der Heiden, 1985). *Totoaba macdonaldi* es uno de estos sciánidos, la especie es endémica del Golfo de California, y cuenta con un gran potencial para su cultivo comercial; recientemente se ha iniciado exitosamente su comercialización en el mercado nacional provenientes de la empresa Earth Ocean Farms en Baja California (Juárez, 2016).

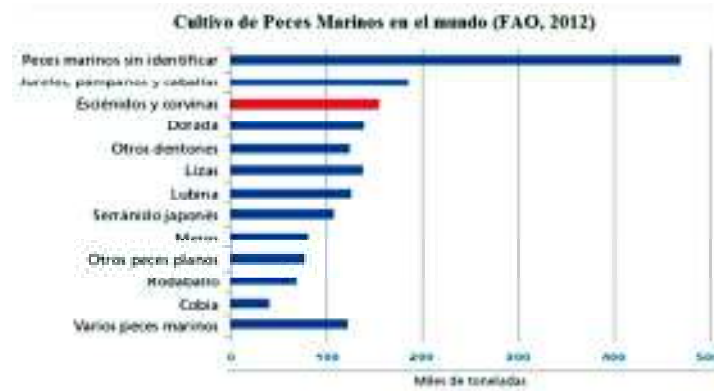


Figura 2. Producción acuícola de peces marinos a nivel mundial en 2010 (FAO, 2012).

I.3.1. *Totoaba macdonaldi*

I.3.1.1. Sistemática de la totoaba

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Perciformes

Familia: Sciaenidae

Género: *Totoaba*

Especie: *Totoaba macdonaldi* (Fig. 3)



Figura 3. *Totoaba macdonaldi*.

I.3.1.2. Biología de la especie

La totoaba *T. macdonaldi* puede alcanzar tallas de hasta dos metros de longitud y pesar más de 100 kg, siendo la especie más grande dentro del grupo de los sciánidos (CITES, 2005; Paredes *et al.*, 2010; Minjarez-Osorio *et al.*, 2014). Es una especie carnívora, se alimenta de pequeños peces pelágicos, camarones y otros invertebrados bentónicos marinos (Rueda-López *et al.*, 2011). Su coloración es gris plateada, su mandíbula inferior es levemente prominente, en los organismos adultos y su aleta caudal es bifurcada (Figura 4), mientras que en la de los juveniles es prolongada; su vejiga natatoria es relativamente grande en comparación con el resto de los órganos del pez (Fischer *et al.*, 1995).

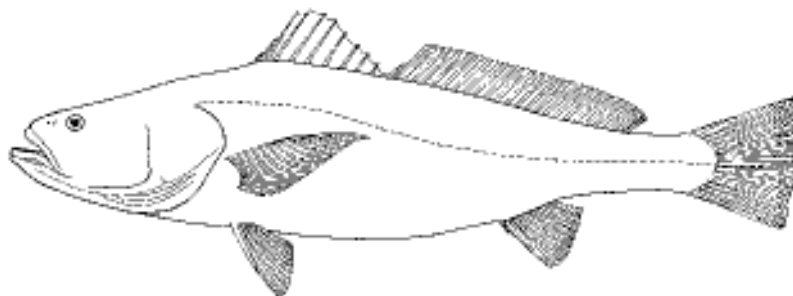


Figura 4. Morfología de *Totoaba macdonaldi* (Fischer *et al.*, 1995).

Es una especie poiquiloterma (no regula su temperatura corporal), presenta sexos separados y fertilización externa. Una de sus características principales es la realización de migraciones a las zonas de reproducción del alto Golfo de California durante los meses de

octubre hasta finales de Junio (CITES, 2005).

I.3.1.3. La pesca y el cultivo de totoaba

A principios de 1900, la pesquería de totoaba fue una actividad de gran importancia en el noroeste de México, su captura se realizaba principalmente para la extracción de su vejiga natatoria, que era exportada a Estados Unidos y Asia (CITES, 2005). Según algunos reportes esta pesquería alcanzó su captura máxima en 1942 con cerca de 2,300 toneladas, disminuyendo drásticamente a 59 toneladas en 1975 (Lercari y Chávez, 2007). Algunos de los factores que propiciaron el colapso de su pesquería fueron la sobrepesca en épocas reproductivas, la pesca incidental e ilegal y el daño a su hábitat natural. Finalmente, en 1975 el gobierno mexicano vedó definitivamente su captura a lo largo del Golfo de California bajo la norma oficial mexicana NOM-059-SEMARNAT y en el año 1991 fue declarada como especie en peligro de extinción (Pedrín-Osuna *et al.*, 2001). Hoy en día no se conoce con certeza el estado real en que se encuentran las poblaciones naturales (Valenzuela-Quiñonez, 2014).

Hace poco más de 15 años el gobierno mexicano financió un programa de cultivo experimental de totoaba con el fin de fomentar la recuperación de las poblaciones en su medio natural, siendo la Unidad en Biotecnología de la Facultad de Ciencias Marinas, Unidad Ensenada pionera en este proyecto (Rueda-López *et al.*, 2011; Minjarez-Osorio *et al.*, 2012). Aunado a esto, se han realizado cultivos experimentales en granjas para evaluar su potencial de cultivo comercial y gracias a esto, los métodos de cultivo y reproducción han mejorado progresivamente (Lercari y Chavez, 2007). En octubre de 2012 y noviembre de 2013 se le otorgaron al Centro de Reproducción de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES) permisos para capturar ejemplares de totoaba, y hoy en día han logrado la producción de alevines para repoblamiento y la comercialización con fines de cultivo, mientras que la empresa Earth Ocean Farms en Baja California recientemente ha comercializado el filete de totoaba cultivada en el mercado nacional (Juárez, 2016).

I.4. Requerimientos nutricionales de peces marinos

Uno de los principales retos en el cultivo de especies acuáticas es el desarrollo de alimentos rentables y adecuados a las necesidades fisiológicas de cada especie (Moyano, 2006), ya que sus requerimientos nutricionales son distintos en función de sus hábitos alimenticios. Los principales nutrientes que se incorporan en el alimento balanceado de los peces utilizados en acuicultura son las proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales, y su aprovechamiento eficiente radica en la capacidad del pez para digerirlos adecuadamente (Gatlin, 2002; Hixson, 2014).

I.4.1. Proteínas

Muchos peces marinos son carnívoros estrictos con altos requerimientos de proteína. Los peces tienen la capacidad metabólica de obtener energía a partir de lípidos, proteínas y carbohidratos, sin embargo, se encuentran mejor adaptados para utilizar proteínas y lípidos para este fin debido a la escasez de carbohidratos en el ambiente marino (Couto *et al.*, 2012; Hixson, 2014). Se ha observado que, en peces, una adecuada inclusión de lípido dietario puede ayudar a conservar la proteína y destinar su uso directamente en el crecimiento y no como fuente de energía (Shiau y Lan, 1996; Thoman *et al.*, 1999; Rueda-López *et al.*, 2011; González-Félix *et al.*, 2015).

La proteína dietaria constituye el ingrediente de mayor concentración y costo en la formulación de alimentos para peces carnívoros marinos en cultivo y es determinante en su crecimiento. Por ello, es fundamental determinar adecuadamente su nivel de inclusión y el requerimiento para cada especie (Craig, 2009), pues una eficiente utilización de la proteína promueve peces en mejor condición y alimentos más sustentables disminuyendo la cantidad de desechos nitrogenados tóxicos producidos por su digestión (Thoman *et al.*, 1999).

I.4.2. Lípidos

Los lípidos son un grupo muy variado de sustancias que comparten la característica general de ser solubles en solventes orgánicos no polares como el cloroformo, benceno, etc. Estas moléculas están compuestas por carbono, hidrógeno y oxígeno, formando cadenas hidrocarbonadas unidas a un grupo carboxilo y en ocasiones pueden contener fósforo y nitrógeno (Curtis y Barnes, 2001).

Son esenciales para los organismos vivos ya que participan en numerosos procesos biológicos, son las moléculas energéticas más importantes aportando 9 cal/g al ser metabolizadas mediante la ruta de la β -oxidación en la mitocondria. Juegan un papel estructural en membranas celulares, están relacionados con los eventos de señalización en la célula (Gilham y Lehner, 2005), son transportadores de distintos nutrientes, pigmentos y hormonas, algunos ácidos grasos son esenciales pues no se pueden sintetizar o la tasa de biosíntesis es limitada, de manera que éstos o sus precursores se deben obtener directamente de la dieta. Entre estos ácidos grasos esenciales se encuentran algunos de la familia n-3, como el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3), así como también el ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6) de la familia n-6 (Turchini *et al.*, 2009; Tocher, 2010, 2015; González-Félix *et al.*, 2016). Estas moléculas altamente energéticas se clasifican de acuerdo a la función que desempeñan en el organismo, siendo los lípidos neutros como los triglicéridos, los encargados del almacenamiento de energía y los lípidos polares como los fosfolípidos y el colesterol, los que forman parte estructural de las membranas (Curtis y Barnes, 2001).

Los requerimientos de proteína y energía de varias especies de peces de la familia Sciaenidae han sido evaluados. Thoman *et al.* (1999) observaron en *S. ocellatus* un crecimiento máximo cuando se cultiva en agua de mar con al menos 44% de proteína dietaria y un nivel de inclusión de lípido dietario de 9.2 a 13.2%. Rueda-López *et al.* (2011) observaron que el mayor peso ganado de *T. macdonaldi* se obtuvo al utilizar 52% de proteína y 8% de lípido, observándose un incremento en el peso al incrementar el nivel de proteína, pero una reducción del crecimiento al utilizar elevados niveles de lípido en organismos de 12.12 gramos de peso inicial.

Por otra parte, Pérez-Velázquez *et al.* (2016) determinaron que *T. macdonaldi* de una talla inicial de 128.3 g, no presenta diferencias significativas en su crecimiento al ser

alimentada con una dieta con 46% de proteína y niveles de lípido dietario que variaron entre 8 y 22%. Sin embargo, no se observó acumulación de grasa como exceso de lípido dietario en músculo, que permaneció con un contenido por debajo de 2% de grasa cruda. La acumulación del exceso de lípido dietario se vio reflejada en la acumulación de grasa hepática, que varió entre 23.2 y 41.5%.

I.4.2.1. Importancia de los lípidos en peces

Los lípidos son uno de los principales macronutrientes que constituyen los alimentos balanceados utilizados en acuicultura para promover el crecimiento de los peces en cultivo (González-Félix *et al.*, 2015). Entre todos los macronutrientes dietarios, los lípidos son reconocidos por su importancia en muchos procesos fisiológicos, así como por ser constituyentes del cuerpo y fuente de energía para peces, crustáceos y moluscos cultivados (Tocher, 2003). De acuerdo con la literatura, el requerimiento de lípido de los peces marinos puede variar dependiendo de la especie, el hábitat, distribución, sexo y de la etapa del ciclo de vida en que se encuentren, por lo que es necesario tener en cuenta estos factores al momento de cultivarlos (Halver y Hardy, 2002).

Entre los lípidos, los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA, por sus siglas en inglés) de las familias n-3 y n-6 son necesarios para el buen desempeño metabólico y óptimo crecimiento de los organismos, ya que son sumamente importantes en la permeabilidad de las membranas celulares, maduración de las gónadas, la calidad del huevo, en la maduración y desarrollo del sistema nervioso y en las respuestas enzimáticas e inmunológicas (Izquierdo *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2005; Turchini *et al.*, 2009; Tocher, 2010, 2015). Sin embargo, la mayoría de las especies de peces presentan una limitada capacidad de biosintetizar de novo estos ácidos grasos; esta limitación es atribuida a la deficiencia enzimática de elongasas y desaturasas que actúan sobre los precursores de dichos ácidos grasos, el ácido linolénico (18:3 n-3) y el ácido linoleico (18:2 n-6) (Watanabe, 1993; Tocher, 2003, 2010). Esta carencia puede ser el resultado de una adaptación a un ambiente con abundancia de HUFA en sus cadenas tróficas (Turchini *et al.*, 2009).

El ácido graso DHA se encuentra en grandes cantidades en el cerebro y tejido nervioso, ayuda a prevenir enfermedades cardiovasculares y degenerativas, además de ser importante para el adecuado desempeño del sistema inmune, reproductor, respiratorio y circulatorio de vertebrados (Tocher, 2015). Se ha descrito que en larvas de *S. aurata* y otros peces marinos, la concentración de DHA es superior a la del EPA como ácido graso esencial suministrado por medio de rotíferos enriquecidos (Watanabe, 1993). Esta molécula lipídica es abundante en el aceite de peces marinos de agua fría como el salmón, el bacalao y la sardina (Turchini *et al.*, 2009), debido a que existe relación entre la temperatura y el grado de insaturación de la cadena de los lípidos, entre más baja sea la temperatura del medio en que se desarrollan los organismos, se requieren más dobles enlaces en las cadenas para poder mantener flexible la estructura del ácido graso y las membranas celulares, principalmente las neuronales, por lo que los organismos de agua fría tienen un mayor requerimiento de este ácido graso (Tocher, 2003).

Por otra parte, los ácidos grasos EPA y ARA son precursores de dos series distintas de compuestos altamente bioactivos llamados eicosanoides como las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, estas moléculas están envueltas en una gran variedad de actividades fisiológicas reguladoras, incluyendo respuestas inmunes, inflamatorias, hematológicas y cardiovasculares, en la reproducción, así como en el desarrollo del sistema nervioso durante el proceso embrionario y la eclosión y supervivencia de larvas de peces y crustáceos (Watanabe, 1993; Tocher, 2003). Un desbalance en los niveles de alguno de ellos puede ocasionar cambios en las respuestas fisiológicas de cada tipo de eicosanoide (Sargent *et al.*, 1989). Se ha reportado que el ácido araquidónico influye en el crecimiento de las larvas de *S. aurata*, además de mejorar su supervivencia después de haber sido sometidas a estrés, ya que el ácido araquidónico regula la síntesis de cortisol. En contraste, se ha asociado el incremento de ARA y el decremento de n-3 HUFA con una mala pigmentación y mala migración ocular en lenguados (Tocher, 2010).

I.4.2.2. Metabolismo energético

El comprender cómo se realiza la utilización de los lípidos dietarios en peces marinos es crucial para entender su metabolismo energético. El conocimiento sobre los mecanismos que permiten a los peces marinos el uso de este nutriente en particular es muy limitado. En peces los lípidos constituyen una importante fuente de energía, mientras que en vertebrados terrestres los carbohidratos son sumamente importantes para este mismo fin (Islam *et al.*, 2009; Harmon *et al.*, 1991; Couto *et al.*, 2012).

La mayoría de las rutas metabólicas básicas del metabolismo de lípidos, incluida la digestión, absorción, transporte de lípidos, lipogénesis y β -oxidación son esencialmente los mismos en peces como en mamíferos (Tocher, 2003). En general, los lípidos dietarios son hidrolizados por las enzimas digestivas principalmente en el intestino anterior y ciegos pilóricos, si están presentes, pero puede extenderse a las partes distales del intestino con un decremento progresivo de la actividad enzimática. La mayor parte de la digestión se produce por la acción de enzimas lipolíticas (Beisson *et al.*, 2000; Gilham y Lehner, 2005; Sovik y Rustad, 2005), principalmente por la acción de la lipasa pancreática, los productos de la hidrólisis de los lípidos son solubilizados en micelas de sales biliares, seguido por difusión hacia el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi de las células de la mucosa intestinal donde son transformados nuevamente en triglicéridos (Sargent, 1989; Mathews *et al.*, 2002). En peces, la absorción de los productos de la hidrólisis de lípidos generalmente se realiza a una velocidad menor comparada con mamíferos, debido a la baja temperatura corporal que influye fuertemente en las tasas de digestibilidad de los nutrientes (Tocher, 2003).

Los triglicéridos formados en las células de la mucosa intestinal se combinan con apoproteínas para formar las lipoproteínas denominadas quilomicrones, facilitando de esta manera el transporte de los lípidos a través de la sangre y la linfa (Sargent *et al.*, 1989). En general, las grasas que contienen cantidades considerables de ácidos grasos insaturados, como los ácidos oleico y linoleico, se absorben más fácilmente que aquellos que contienen mayoritariamente ácidos grasos saturados, como los ácidos palmítico y esteárico. Los triglicéridos que se sintetizan en el hígado se combinan con otras apoproteínas para formar lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) Y lipoproteínas de alta densidad (HDL) para su transporte (Mathews *et al.*, 2002). Así mismo, las hembras de peces también producen vitelogenina, otra lipoproteína específica para el

transporte de lípidos a los oocytos en desarrollo durante el proceso de vitelogénesis. Finalmente, los triglicéridos que llegan a las células se catabolizan para producir energía o son almacenados para utilizarse cuando son necesarios (Tocher, 2003).

En animales, los lípidos se almacenan en células especializadas conocidas como adipocitos que se encuentran en el tejido adiposo (Mathews *et al.*, 2002). La mayoría de los peces tienen tejido adiposo intraperitoneal y una capa de lípidos entre la piel y el músculo. Sin embargo, los peces grasos como el salmón también depositan lípido entre los paquetes musculares y otros como el bacalao los almacenan predominantemente en el hígado (Tocher, 2003).

La mayor fuente de energía en muchas especies de peces es obtenida mediante la degradación de las grasas producida por el catabolismo de ácidos grasos dentro de las mitocondrias, al cual comúnmente se le conoce como β -oxidación. Los ácidos grasos son previamente activados a Acil-CoA en el citosol por acción de la enzima Acil-CoA sintetasa o tioquinasa, y son transportados a la mitocondria. El proceso de β -oxidación envuelve el corte de dos unidades de carbono en forma de Acetil-CoA (Mathews *et al.*, 2002), a través de series de reacciones de oxidación, hidratación, segunda oxidación y rompimiento, catalizados por enzimas distintas para producir Acetil-CoA, $\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2 . El Acetil-CoA puede ser metabolizado en el ciclo de Krebs para producir más $\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2 , que sirven como sustratos para producir energía metabólica en forma de ATP mediante el proceso de fosforilación oxidativa. En comparación con organismos homeotermos terrestres, los peces tienen una mejor eficiencia energética debido a que no requieren energía para el mantenimiento del calor corporal, requieren menor energía para mantener una posición corporal en el agua y tienen un metabolismo de nitrógeno más eficiente (Tocher, 2003).

Por otra parte, la lipogénesis comprende las reacciones biosintéticas para la formación endógena de lípidos nuevos. Los ácidos grasos se sintetizan en el citosol y el precursor para la biosíntesis de nuevos lípidos es el Acetil-CoA sintetizado en la mitocondria por la descarboxilación oxidativa del piruvato, o bien de la oxidación degradativa de algunos aminoácidos (Mathews, 2002). La principal ruta lipogénica es catalizada por el complejo multienzimático de la ácido graso sintetasa (FAS), que produce el ácido graso saturado ácido palmítico (16:0), a partir del cual se sintetizan otros ácidos grasos. Las elongasas de ácidos

grasos producen cadenas más largas de ácidos grasos, mientras que las desaturasas introducen dobles enlaces en la cadena (Sargent, 1989). No obstante, los ácidos grasos poliinsaturados y altamente insaturados deben ser suministrados a través de la dieta debido a la limitada capacidad de biosíntesis *de novo* que generalmente se observa en los vertebrados.

I.5. Enzimas Digestivas en Peces

El proceso de digestión de los nutrientes alimenticios depende en gran medida de la presencia, cantidad y eficiencia de las enzimas digestivas (Furné *et al.*, 2005; Langeland *et al.*, 2013). En peces existe una gran variedad de enzimas que participan en la digestión del alimento a lo largo del tracto gastrointestinal, por lo que los tejidos como el intestino, páncreas, estómago, hígado y ciegos pilóricos son considerados una fuente importante de enzimas con propiedades novedosas que pueden ser utilizadas en diferentes industrias (Islam *et al.*, 2008).

El páncreas exocrino y el estómago contienen células que producen y guardan las enzimas digestivas como las lipasas, pepsinas, amilasas, tripsinas, etc. (Kurokawa y Suzuki, 1995; Kurtovic *et al.*, 2009), que son secretadas en diferentes tejidos como pro-enzimas y que son activadas posteriormente (Tocher, 2003; Ogiwara y Takahashi, 2007) para llevar a cabo la hidrólisis de proteínas, lípidos y carbohidratos dietarios en moléculas pequeñas que puedan ser absorbidas a través de la pared intestinal (Furné *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2001).

Al igual que en mamíferos, los peces secretan isoformas de las enzimas digestivas que pueden variar en peso, estructura, pH óptimo, eficiencia y estabilidad (Ogiwara y Takahashi, 2007). La mayoría de estas enzimas se producen en forma de proenzimas como la tripsina, quimiotripsina, y carboxipeptidasas A y B, pero otras enzimas se producen en sus formas activas como la lipasa, fosfolipasas, alfa-amilasa, DNAsa y RNAsa (Kurtovic *et al.*, 2009). En algunas especies de peces con estómago, se secretan diferentes formas de pepsinógeno, que muestra diferencias entre sí (Wu *et al.*, 2009); esta proenzima se transforma posteriormente a su forma activa conocida como pepsina, una proteasa que en combinación con el HCl inician la digestión química de las proteínas y la cual se ha relacionado con el aumento de la capacidad digestiva de los organismos (Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Tocher, 2003).

Existen muchas investigaciones relacionadas con las enzimas digestivas de peces, sin embargo, la gran mayoría están enfocados en el estudio de las proteasas y en menor medida amilasas y lipasas. En estudios relacionados con los patrones de distribución de las enzimas a lo largo del tracto digestivo de peces en diferentes etapas de vida, se ha observado una menor capacidad digestiva en larvas de peces que en un pez adulto debido a que el sistema digestivo es menos complejo, por lo que se generaliza que la actividad de las enzimas es influenciada fuertemente por la edad del pez (Kurokawa y Suzuki, 1996). No obstante, la presencia localizada de algunas enzimas no está muy bien establecida, ya que se ha observado que en el intestino anterior del bacalao, la dorada y el pargo existe mayor actividad lipolítica que el intestino posterior (Izquierdo *et al.*, 1997), mientras que en el lenguado *Scophthalmus maximus* la mayor actividad lipolítica ocurre en el intestino posterior, y se sugiere que esta discrepancia podría deberse a la diferencia de tamaño en los intestinos, ya que el lenguado presenta un tracto digestivo de menor longitud (Koven *et al.*, 1994; Izquierdo *et al.*, 2000).

Así mismo, se ha observado que el nivel de actividad de algunas enzimas digestivas puede ser utilizada como indicador del estado nutricional y capacidad digestiva de larvas de peces (Moyano *et al.*, 1996). Lazo *et al.* (2007) encontraron que las proteasas alcalinas aparecen antes que las proteasas ácidas en las larvas de *S. ocellatus*, ya que estas últimas se presentan cuando el estómago se ha formado. Kolkovski (2001) observó que la aparición de la actividad de la pepsina revela el momento en que el estómago está completamente desarrollado y funcional, mientras que la secreción de tripsinógenos y aminopeptidasas son indicadores de la madurez del páncreas y del intestino, respectivamente (Kurokawa y Suzuki, 1996).

Por otra parte, el estudio de las características de las enzimas que participan en el proceso digestivo de peces puede ayudar a mejorar el proceso de cultivo de especies acuícolas, en aspectos como la formulación de las dietas balanceadas y en el desarrollo de estrategias alimenticias (Namulawa *et al.*, 2013). Además, como se ha mencionado anteriormente, los subproductos originados por la industria pesquera pueden ser fuente importante de enzimas con características novedosas debido a su origen, por lo que si a estos productos se les diera una utilidad se estaría maximizando el aprovechamiento de los recursos marinos (Smichi *et al.*, 2012).

I.5.1. Factores que influyen en la actividad enzimática

Las enzimas son proteínas que funcionan en un determinado medio, donde las condiciones pueden variar, por lo tanto, su actividad puede verse modificada a través del tiempo por un gran número de factores ligados tanto a la fisiología animal, como las características del alimento o la forma en que éste es suministrado (Moyano, 2006). De manera que las enzimas dependen de muchos factores incluyendo el pH, temperatura, fuerza iónica (Rueda-López *et al.*, 2017), presencia de activadores e inhibidores y concentración del sustrato, entre otros, que nos permiten conocer los atributos funcionales específicos de cada una de ellas (Scopes, 2002).

I.5.1.1. pH

Todas las enzimas tienen una estructura primaria de aminoácidos como grupos radicales ionizables que sirven para estabilizar la conformación natural de la proteína. Cuando el pH se modifica ocurren cambios en el estado de ionización de los aminoácidos envueltos en la catálisis, por lo que también cambia el estado de ionización del sustrato y el equilibrio de la reacción, afectando la estructura de la proteína (Murray *et al.*, 1990), esto puede finalizar con la desnaturalización de las proteínas, y en el caso de las enzimas, la pérdida de su actividad.

Dependiendo del medio donde deba ejercer su actividad, cada enzima tendrá su conformación más adecuada y por lo tanto su máxima actividad alrededor de un valor específico de pH (pH óptimo) (Scopes, 2002), por lo que cualquier pequeña variación de pH provocado por factores como el tipo y concentración del sustrato, temperatura, o tiempo de reacción, provocan la disminución de la actividad (Whitaker, 1994).

El medio interno de los seres vivos se encuentra tamponado y los pH fisiológicos de las soluciones corporales varían poco. Sin embargo, en algunas especies existen enzimas con una amplia tolerancia a diferentes pH (Scopes, 2002), esta adaptación es una ventaja que garantiza la funcionalidad de la enzima durante cambios bruscos de pH. Las diferencias en los pH óptimos de las enzimas tienen que ser consideradas al tratar de darles una aplicación práctica.

I.5.1.2. Temperatura

La temperatura al igual que el pH, tiene mucha influencia sobre la actividad de las enzimas, afectando su estabilidad, afinidad con el sustrato, cofactores, activadores y el producto formado (Whitaker, 1994). Este factor presenta dos efectos, por un lado, el aumento de la temperatura puede aumentar la velocidad de cualquier reacción química, y por otra parte puede desnaturar a la enzima y producir la pérdida de la actividad catalítica (Scopes, 2002).

Las enzimas de los organismos generalmente presentan un óptimo de actividad a temperaturas mayores a las temperaturas fisiológicas de los mismos (Moyano, 2006). Esto se debe a que las enzimas requieren que su energía de activación rebase la barrera de rompimiento de las fuerzas débiles (puentes de hidrógeno y enlaces hidrófobos) de tal manera que la tasa de reacción inicial se incrementa a medida que aumenta la temperatura debido a un incremento en la energía cinética de las moléculas (Murray *et al.*, 1990). Asociado a este incremento de temperaturas es muy posible que la enzima se desnature observándose una pérdida de la actividad catalítica. Es decir, mientras más tiempo permanezca la enzima al margen de su óptimo catalítico, se hace más probable su desnaturación.

En un sistema biológico, la energía de activación más elevada corresponde a una reacción más lenta, por lo tanto, se denomina como altamente eficiente a las enzimas que tengan una energía de activación baja. De tal manera que los sistemas adaptados a bajas temperaturas tienden a reducir dicha barrera como una estrategia para ser más eficientes. De este modo, los peces que habitan aguas frías tienen enzimas con alta eficiencia de actividad catalítica a bajas temperaturas (Aryee *et al.*, 2007; Kurtovic *et al.*, 2010), esta adaptación evolutiva ha permitido que las enzimas de peces muestren una mayor actividad y afinidad por sustratos que las enzimas de homeotermos (Jellouli *et al.*, 2009). Por esta razón, este tipo de enzimas son sumamente utilizadas en aplicaciones biotecnológicas, ya que pueden producir procesos a bajas temperaturas, reduciendo los costos energéticos y protegiendo los sustratos contra el daño térmico (Kurtovic *et al.*, 2010).

I.6. Las lipasas

De acuerdo con la Comisión de Enzimas de la IUPAC, las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas E.C.3.1.1.3) son una familia grande de enzimas que catalizan de manera reversible la hidrólisis de enlaces éster de sustratos como triglicéridos, principalmente ácidos grasos de cadena larga, fosfolípidos, ésteres de colesterol y vitaminas (Kurtovic *et al.*, 2009).

Las lipasas se encuentran en prácticamente todos los seres vivos, desde microorganismos, hasta animales superiores, incluyendo peces (Smichi *et al.*, 2012), en los que desempeñan un papel muy importante en el metabolismo de lípidos, siendo imprescindibles para la asimilación, almacenamiento y posterior utilización de los triglicéridos de la fracción lipídica del alimento durante los procesos digestivos. Dentro de la familia de las lipasas, la lipasa pancreática es la principal enzima digestiva en vertebrados superiores, esta enzima presenta una fuerte preferencia por acilglicéridos sobre otros lípidos (Akanbi *et al.*, 2014; Rueda-López *et al.*, 2017).

Una de las características principales de las lipasas es que su actividad catalítica ocurre en una interface lípido-agua, fenómeno conocido como activación interfacial, mientras que presentan una escasa o nula actividad sobre sustratos disueltos (Verma *et al.*, 2012). Además, las lipasas tienen la capacidad de actuar de forma selectiva sobre diferentes sustratos, esta característica está determinada por las propiedades de la enzima a nivel molecular, la estructura del sustrato y por los factores que afectan la unión enzima-sustrato (Jensen *et al.*, 1983).

I.6.1. Estructura de las lipasas

Las lipasas pertenecen a la familia de enzimas α/β -hidrolasas que también incluye esterases, tioesterasas, algunas proteasas, peroxidasas y otras hidrolasas (Kurtovic *et al.*, 2009), esta clasificación se basa en las similitudes de la estructura terciaria, a pesar de sus diferencias de tamaño, secuencia de aminoácidos y origen. Todas están compuestas por dos dominios N-terminal y C-terminal (Winkler *et al.*, 1990). La conformación proteica del tipo α/β consiste de 8 láminas β centrales (1-8) dispuestas en forma paralela, a excepción de la segunda (2)

dispuesta en sentido antiparalelo. Las láminas 3 a 8 están flanqueadas por secuencias peptídicas α -helicoidales (Figura 5) (Ollis *et al.*, 1992; Beisson *et al.*, 2000; Gilham y Lehner, 2005).

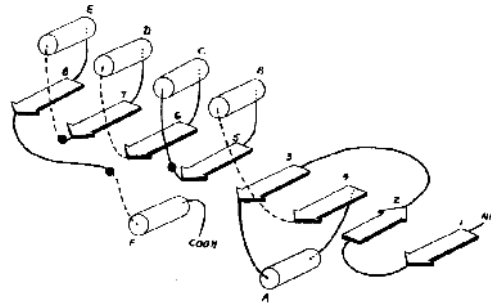


Figura 5. Conformación del tipo α/β (Ollis *et al.*, 1992).

A su vez, las lipasas pertenecen a la familia del gen de las lipasas, la cual está integrada por la lipasa pancreática, lipasa hepática y la lipoproteína lipasa, proteínas relacionadas con la lipasa pancreática 1 y 2, y lipasa endotelial (Rader y Jaye, 2000). Los miembros de esta familia exhiben muchas similitudes en la secuencia de aminoácidos no solo dentro de la misma especie, sino entre otras diferentes de ellas (Hirata *et al.*, 2000).

Se ha observado que las lipasas poseen un dominio hidrófobo que cubre el sitio activo denominado “lid”, en presencia de una interfase y un sustrato hidrófobo este dominio se abre dejando el sitio activo al descubierto permitiendo la acción entre la enzima y el sustrato (Beisson *et al.*, 2000; Gilham y Lehner, 2005). El sitio activo está constituido por la triada catalítica conservada de serina, histidina y ácido aspártico o ácido glutámico, donde el responsable del ataque nucleofílico en el grupo carbonilo del sustrato lo lleva a cabo la serina (Ollis *et al.*, 1992).

I.6.2. Mecanismo de acción

Como se describió anteriormente, las lipasas presentan un mecanismo de acción muy particular, llamado activación interfacial donde mediante el cambio de la forma inactiva a la forma activa de la enzima se permite la hidrólisis de triglicéridos y liberación de ácidos grasos

y glicerol (Aloulou *et al.*, 2006; Rueda-López *et al.*, 2017). La lipasa pancreática hidroliza ácidos grasos en el carbono 1 y 3 y genera 2-monoacilglicerol.

Las lipasas además de catalizar la hidrólisis de los enlaces éster de triglicéridos, también tienen la capacidad de catalizar otro tipo de reacciones (esterificación, interesterificación y transesterificación) en ambientes con poco contenido de agua (Rueda-López *et al.*, 2017), la presencia de agua en las reacciones catalizadas por esta enzima facilita el rompimiento de los puentes covalentes del sustrato. En una solución las lipasas pueden existir en dos formas, en una solución acuosa el centro activo de la lipasa está escondido por una cadena polipeptídica llamada lid (forma inactiva) en esta forma la enzima muestra muy baja actividad sobre el sustrato, mientras que en una interfase lípido agua, el lid se desplaza y el centro activo se expone al medio de reacción (forma activa) para hidrolizar el sustrato insoluble. Se ha observado que las lipasas pueden existir en equilibrio entre las dos formas y el cambio de una forma a otra está acompañada por cambios conformacionales (Derewenda y Derewenda, 1992; Akoh *et al.*, 2004; Kurtovic *et al.*, 2009).

I.6.3. Aplicaciones de las lipasas

Las lipasas son uno de los grupos más importantes de biocatálisis usados en las aplicaciones biotecnológicas, a pesar de que su industria se ha desarrollado más lentamente en comparación con otras enzimas como las proteasas. Las lipasas de hongos y bacterias son las más ampliamente utilizadas y comercializadas debido a su bajo costo y grandes cantidades de producción, sin embargo, las lipasas se encuentran presentes en prácticamente la totalidad de los seres vivos (Sharma *et al.*, 2001).

Las lipasas de diferentes fuentes tienen un amplio rango de propiedades en función de su origen y pueden catalizar los diversos tipos de reacciones ya mencionadas. Esta versatilidad, su gran especificidad y eficiencia a bajas temperaturas hacen a las lipasas las enzimas de elección en diferentes industrias, principalmente en la industria de alimentos, como el procesamiento de la carne, vegetales, frutas, productos de cerveza, productos lácteos, además de la industria de la grasa y aceites (Osorio *et al.*, 2001).

Su gran especificidad ha sido explotada en la modificación lipídica para brindar características específicas de olor y sabor a los alimentos (Xu, 2000). Así, por ejemplo, desde hace mucho tiempo, se ha utilizado el páncreas y glándulas de rumiantes como fuente importante de lipasas para dar sabor a quesos y productos derivados de la leche (Kurtovic *et al.*, 2009). Las reacciones de esterificación e interesterificación en bajas concentraciones de agua permiten modificar las propiedades de los lípidos alterando la localización de las cadenas de ácidos grasos en el glicerol y reemplazando uno o más de los ácidos grasos por otros nuevos. Mediante este proceso un lípido relativamente barato y menos agradable puede ser modificado a uno de mayor valor (Sharma *et al.*, 2001).

Por otra parte, otra de las principales aplicaciones de las lipasas es en la fabricación de detergentes, debido a su capacidad para hidrolizar grasas, su óptima actividad a pH alcalino y su estabilidad térmica permiten la reducción del consumo de energía, ya que muchas de estas lipasas están adaptadas a bajas temperaturas (Choudhury y Bhunia, 2015), lo que resulta benéfico para el medio ambiente. Además, las lipasas de microorganismos son utilizadas para enriquecer ácidos grasos poliinsaturados de lípidos animales y plantas, y los productos (mono y di glicéridos) son utilizados para producir una gran variedad de fármacos (Belarbi *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2001) relacionados con aterosclerosis y obesidad (Jansen *et al.*, 2002).

Otras aplicaciones importantes de las lipasas que están investigándose, son como tratamiento en ambientes contaminados con grasas y aguas residuales (Choudhury y Bhunia, 2015). Actualmente, la demanda de estas enzimas se encuentra en aumento y se están realizando muchos esfuerzos para encontrar lipasas que cumplan con los requerimientos necesarios para ser utilizadas por diferentes industrias, lamentablemente son pocas las lipasas que han sido identificadas y/o purificadas de organismos marinos.

I.7. Lipasa pancreática en peces

Los organismos marinos pueden ser fuente importante de lipasas; debido al ambiente en el que se desarrollan, el tipo de alimentación y a su evolución, podrían contener lipasas con características que complementen las utilizadas actualmente. Sin embargo, antes de que estas

lipasas sean extraídas y se desarrollen productos es necesario un buen entendimiento de sus características.

La lipasa pancreática es la de mayor importancia en mamíferos y es secretada por el páncreas a través del jugo pancreático hacia otras partes del tracto digestivo donde lleva a cabo su actividad lipolítica. En muchas ocasiones se ha observado que la actividad de esta enzima se ve incrementada por la presencia de sales biliares ya que pueden facilitar la entrada de los lípidos al sitio activo de la enzima (Lombardo, 2001). Además, en mamíferos se ha observado un complejo lipasa-colipasa, la colipasa es un cofactor que ayuda a estabilizar el sitio activo en su conformación abierta y es importante para que se lleve a cabo la actividad de esta enzima (Brockman, 2000). Este cofactor no se ha reportado en peces teleósteos (Smichi *et al.*, 2012), pero sí en algunos peces cartilagosos o elasmobranquios como la raya *Dasyatis pasticana* y el tiburón *Squalus acanthias* (Bacha *et al.*, 2011).

En peces, la lipasa pancreática ha sido localizada en páncreas, ciegos pilóricos e intestinos y se han estudiado sus propiedades fisicoquímicas en algunas especies (Kurtovic *et al.*, 2010; Nolasco *et al.*, 2011; Smichi *et al.*, 2012). Se ha observado que la mayor actividad de la lipasa se presenta en el tejido pancreático, seguido de los lugares en los que se secreta, como en el intestino anterior y en ciegos pilóricos, sin embargo, se ha observado que la actividad puede extenderse hacia partes distales del intestino con un decremento progresivo de actividad (Rust, 2002). Por ejemplo, Matus de la Parra *et al.* (2007) reportaron que en el atún *Thunnus orientalis*, la mayor actividad de la lipasa ocurre en los ciegos pilóricos (27.5 U/mg de proteína), seguida por el intestino anterior (3.9 U/mg de proteína), y en menor medida en las partes distales del intestino. Excepciones donde la actividad de las lipasas es mayor en la parte distal del intestino se reportaron para los lenguados *S. maximus* y *Pleuronectes plateas* (Koven *et al.*, 1994; Olsen y Ringo, 1997), aunque algunos autores afirman que la actividad encontrada en otras partes del tracto digestivo de los peces puede ser de origen bacteriano (Olsen y Ringo, 1997).

En el estudio de la lipasa realizado por Gjellesvik *et al.* (1992) donde se purificó y caracterizó una lipasa de los ciegos pilóricos y páncreas de *G. morhua* con peso molecular de 60 kDa, se observó que la enzima no muestra una actividad significativa a la temperatura en la que se desarrolla la especie (0- 8°C), si no a 20-30°C. En otro estudio realizado con *S. salar* se

estableció la secuencia de cDNA de la lipasa pancreática de la especie (Gjellesvik, *et al.*, 1994). Aryee *et al.* (2007) reportaron una actividad óptima de la lipasa a pH de 8.0 y a 50°C en extractos semipurificados de vísceras de *M. cephalus*. En general, se han reportado pesos moleculares que van desde 40 a 70 kDa para algunas lipasas de peces (Smichi *et al.*, 2015) con óptimos de actividad en un rango de pH de 7 a 10 (Gjellesvik *et al.*, 1992; Iijima *et al.*, 1998; Kurtovic *et al.*, 2010).

Otras investigaciones han abordado la presencia y especificidad de la lipasa, así como aspectos del desarrollo de las lipasas en larvas y juveniles de peces. Lo anterior conlleva a reconocer la necesidad de evaluar cada especie de pez en cultivo para determinar las características funcionales de sus lipasas y poder así desarrollar estrategias para mejorar su cultivo.

II. JUSTIFICACIÓN

Totoaba macdonaldi es una especie nueva en la acuicultura en México de gran interés comercial. Es de importancia investigar las propiedades de las enzimas que participan en la

digestión del lípido dietario, principalmente la lipasa pancreática. Conocer sus características contribuirá a la optimización en la formulación de lípidos incluidos en el alimento balanceado para su cultivo comercial y optimizará el uso de la proteína para crecimiento somático en beneficio de esta industria.

III. HIPÓTESIS

La lipasa pancreática de *Totoaba macdonaldi* tiene características bioquímicas similares a la de otras especies de peces marinos cultivados.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general

Caracterizar parcialmente y determinar la actividad enzimática de la lipasa pancreática de *Totoaba macdonaldi*.

IV.2. Objetivos específicos

IV.2.1. Determinar el peso molecular de la lipasa pancreática de *Totoaba macdonaldi*.

IV.2.2. Determinar la temperatura óptima de actividad enzimática de la lipasa pancreática de *Totoaba macdonaldi*.

IV.2.3. Determinar el pH óptimo de actividad enzimática de la lipasa pancreática de *Totoaba macdonaldi*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Obtención de organismos

Se obtuvieron cuarenta ejemplares de *T. macdonaldi* con un peso y longitud total promedio \pm error estándar de la media (E.E.M.) de $1,477.25 \pm 22.98$ g y 52.86 ± 0.31 cm, respectivamente, del Centro de Reproducción de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES), ubicado en Bahía de Kino, Sonora, México. Los peces se pesaron, midieron y evisceraron *in situ* y las vísceras se transportaron en hielo al Laboratorio de Nutrición Acuícola del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS) de la Universidad de Sonora.

V.2. Determinación de los índices biológicos

Se midieron algunos datos biométricos necesarios para la determinación del índice hepatosomático (IHS), índice viscerosomático (IVS) y el factor de condición (K), que se utilizan para inferir el estado fisiológico del pez en función de su estado de robustez. Posteriormente, las vísceras se almacenaron en ultra-refrigeración a -82°C hasta el momento de su análisis.

$$\text{Índice hepatosomático (IHS)} = \frac{\text{peso del hígado (g)}}{\text{peso del organismo (g)}} \times 100$$

$$\text{Índice viscerosomático (IVS)} = \frac{\text{peso de las vísceras (g)}}{\text{peso del organismo (g)}} \times 100$$

$$\text{Factor de condición (K)} = \frac{\text{peso del organismo (g)}}{(\text{Longitud total del organismo (cm)})^3} \times 100$$

V.3. Determinación del peso molecular

V.3.1. Obtención del extracto enzimático

Se dividió el tracto gastrointestinal en cuatro secciones: ciegos pilóricos, intestino anterior, intestino medio e intestino posterior. Se pesó aproximadamente 0.5 g de cada sección y se

homogenizó (Ultra Turrax, T18 basic, IKAWorks Inc., Wilmington, NC, USA) individualmente cada una de ellas en 1.3 mL buffer Tris-HCl 50mM (pH 7.5) con un coctel de inhibidores de proteasas (500 mL benzamidina HCl 2mM y 200 mL de EDTA 1mM). El extracto crudo se centrifugó (Heraeus Fresco 21, ThermoFisher Scientific, Dreieich, Germany) a 21,000 g y 4°C durante 30 minutos, hasta clarificar. El sobrenadante se concentró y semipurificó en filtros de 30 kDa (Amicon®Ultra-4, Centrifugal filter device, Millipore Corp., Billerica, MA, USA) mediante centrifugación a 1,300 g y 4°C por 30 min. Se recuperó el concentrado y se conservó a -20°C para análisis posteriores.

V.3.2. Determinación de proteína

El contenido de proteína del sobrenadante se determinó mediante combustión por el método 968.06 de la AOAC (2005). Aproximadamente 100 µl de la muestra se incineraron en un equipo Analizador Dumas (Velp® Scientifica, Modelo NDA 701, Usmate, Italy) de nitrógeno-proteínas. El contenido total de nitrógeno se determinó a través del software DUMAS Soft, utilizando el factor de conversión de 6.25 para obtener el porcentaje de proteína de las muestras.

V.3.3. Electroforesis SDS-PAGE

El peso molecular y cuantificación de la lipasa pancreática en el tracto gastrointestinal de la totoaba se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Laemmli, 1970), en un sistema electroforético vertical de cuatro geles (Mini-Protean Tetra Cell, Bio-Rad®, Hercules, CA, USA) usando geles con tamaño de poro de 10%. Las corridas electroforéticas se realizaron a un voltaje constante de 115 V bajo condiciones frías. Se utilizó un estándar de marcadores con pesos moleculares de amplio rango como referencia (Precision Plus Protein Standard, Bio-Rad®, Hercules, CA, USA) y la lipasa pancreática humana como marcador cuantitativo de referencia (BCR-693, European Community Bureau of Reference). Posteriormente los geles se fijaron con una mezcla de 40% etanol y 10% ácido acético, y las bandas se revelaron mediante inmersión del gel en la tinción QC Colloidal Commasie (Bio-Rad®, Hercules, CA, USA), manteniéndose durante toda la noche en agitación constante.

Finalmente, los geles se lavaron con agua tridestilada para eliminar el exceso de colorante y se escanearon en un densitómetro GS-900 (Bio-Rad®, Hercules, CA, USA) calibrado para la identificación y cuantificación de bandas utilizando el software Image Lab 5.0 (Bio-Rad®, Hercules, CA, USA).

V. 3.4. Zimograma

V.3.4.1. Detección de la lipasa en zimograma

Las bandas correspondientes a la lipasa pancreática en el tracto gastrointestinal de la totoaba se corroboraron mediante el método zimográfico descrito por Singh *et al.* (2006). Se realizó una electroforesis nativa en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Laemmli, 1970) utilizando geles con tamaño de poro de 10% como se describió anteriormente. Inmediatamente después de la corrida electroforética, el gel se lavó tres veces con agua tridestilada y se equilibró con buffer Tris -HCl 50 mM pH 8.0 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se vació una capa delgada del sustrato cromogénico previamente preparado sobre el gel y se dejó gelatinizar. Finalmente, el gel se incubó a 37°C durante aproximadamente 3.5 horas. Las bandas correspondientes a la lipasa se tornan de color amarillo sobre un fondo rosa (Figura 6).

V.3.4.2. Preparación del sustrato cromogénico

El sustrato cromogénico se preparó utilizando rojo de fenol 0.01%, 1% ácido oleico y 2% agar-agar en una solución de CaCl₂ anhídrido 10 mM. El pH se ajustó a 8.2 con NaOH 0.1 N. Minutos antes de utilizar, el sustrato cromogénico se calentó a 95°C hasta disolver el agar y se dejó enfriar a temperatura ambiente (Figura 6).



Figura 6. A) Condiciones de corrida del extracto enzimático nativo para detección en zimograma de la lipasa pancreática de *T.*

macdonaldi. B) Gel nativo después de la corrida electroforética sumergido en el substrato cromogénico.

V.4. Determinación de la actividad de la lipasa

V.4.1. Obtención del extracto enzimático

El tracto gastrointestinal proveniente de cuatro organismos se dividió en ciegos pilóricos, intestino anterior, medio y posterior. Cada sección se pesó y homogenizó individualmente (Ultra Turrax, T18 basic, IKAWorks Inc., Wilmington, NC, USA) en 3 volúmenes de buffer Tris-HCl 200mM (pH 7.7). El extracto crudo se centrifugó (Marathon 22KGA, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a 1,300 g y 4°C hasta clarificar. Se recuperó el sobrenadante y se procedió a determinar la actividad enzimática.

V.4.2. Determinación de la actividad de la lipasa en el tracto gastrointestinal

La actividad de la lipasa en el tracto gastrointestinal se determinó por cuadruplicado mediante titulación con NaOH 0.05 M utilizando el método de Ensayo Enzimático de la Lipasa de la Comisión Enzimática (Enzyme Commission, 1993) E.C.3.1.1.3, con pequeñas modificaciones. Se preparó una mezcla de reacción que consistió en 1 mL de buffer Tris-HCl 0.2 M (pH 7.7), 2.5 ml de agua tridestilada, 1 mL del extracto crudo enzimático de cada una de las secciones y como sustrato se utilizó 3 mL de aceite de oliva comercial. La mezcla de reacción se equilibró a 35°C y 120 rpm en un agitador horizontal y se incubó a la misma temperatura durante un tiempo de reacción de 30 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 3 mL de etanol al 95%, seguida por titulación utilizando fenolftaleína 0.1% como indicador hasta que en la muestra se observó un viraje a color rosa claro (Figura 7). Usando el mismo principio, se corrieron muestras blanco donde el extracto enzimático se agregó inmediatamente después del tiempo reacción. Las mezclas de reacción del tubo de prueba y sus respectivos blancos se prepararon por duplicado para cada organismo. Se definió la actividad de la lipasa en unidades (U) por

mL de extracto crudo, como la cantidad de enzima que hidroliza 1.0 microequivalente de ácidos grasos de triglicéridos por hora, mediante la siguiente ecuación:

$$U/mL = \frac{(ml\ NaOH\ usados)(M)(1000)(2)(Factor\ de\ dilución)}{V_{total}}$$

Donde:

U/mL = Unidad de actividad de lipasa / mL de extracto enzimático

mL NaOH usados = Volumen de NaOH utilizado en el tubo de prueba - Volumen de NaOH utilizado en el tubo blanco

M = Molaridad del NaOH

1000 = Factor de conversión de miliequivalentes a microequivalentes

2 = Factor de conversión de 0.5 a 1 hr.

Factor de dilución = dilución del buffer usado para la extracción del tejido. En este estudio se utilizó el mismo buffer para la extracción y para el ensayo, por lo que el factor de dilución es igual a 1

V_{total} = Volumen en mililitros del extracto enzimático utilizado en la reacción.



Figura 7. Mezcla de reacción antes (A) y después (B) de la determinación de la actividad enzimática.

V.4.1. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la lipasa

Debido a que la actividad enzimática de la lipasa pancreática fue superior en el intestino anterior y ciegos pilóricos, se utilizaron estas dos secciones del tracto gastrointestinal para evaluar la actividad lipolítica del extracto crudo a diferentes temperaturas, con la finalidad de determinar la temperatura óptima de actividad. Los ensayos se realizaron por triplicado. La mezcla de reacción se incubó a 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60°C durante 30 minutos. Utilizando aceite de oliva como sustrato y buffer Tris-HCl 0.2 M (pH 7.7), utilizando la misma metodología descrita anteriormente.

V.4.2. Efecto del pH sobre la actividad de la lipasa

El efecto de pH en la actividad de la enzima se evaluó en el intestino anterior y ciegos pilóricos por triplicado, en un rango de pH de 6-10 sustituyendo el buffer Tris-HCl 0.2 M (pH 7.7) usado en el ensayo descrito previamente con los siguientes buffers: 0.2 M citrato-fosfato para el pH 6.0, 0.2 M Tris-HCl para pH 7.0 – 9.0 y 0.2 M glicina-NaOH para pH 10. Las mezclas de reacción se incubaron durante 30 minutos a 45°C, siguiendo la metodología descrita anteriormente.

V.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de la caracterización de la lipasa pancreática e índices biológicos se realizó mediante estadística descriptiva, mientras que la actividad enzimática se analizó mediante un análisis de varianza de una vía de clasificación (ANOVA) para cada uno de los factores, temperatura y pH. Se aplicó la prueba de Tukey como método de separación de promedios cuando se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$), y se utilizó para ello el programa estadístico SAS (SAS Institute, 1999-2000, Software Release 8.1, Cary, NC, USA).

VI. RESULTADOS

VI.1. Índices biológicos

Peso (g)	1477.25	22.99	1150.00	1790.00
Longitud total (cm)	52.86	0.31	49.00	57.00
Peso de las vísceras (g)	72.52	1.47	49.05	90.96
Índice hepatosomático (%)	0.91	0.03	0.59	1.38
Índice viscerosomático (%)	4.92	0.08	4.03	6.14
Factor de condición (K)	1.00	0.01	0.91	1.15

Los valores que a continuación se describen en el presente trabajo representan el promedio \pm el error estándar de la media (E.E.). El peso promedio de los cuarenta organismos evaluados fue de $1,477.25 \pm 22.98$ g, registrándose un peso mínimo de 1,150.00 g y un peso máximo de 1,790.00 g. El peso promedio de las vísceras en los peces fue de 72.52 g, y comprende tanto el peso del tracto gastrointestinal (esófago, estómago, ciegos pilóricos e intestino; Figura 8) como el de órganos asociados, tales como el corazón, hígado, vesícula biliar, y vejiga natatoria, entre otros (Figura 9). La longitud varió entre 49 y 57 cm, con un promedio de 52.86 ± 0.31 cm. El valor promedio para el índice hepatosomático fue de 0.91 %, con un valor mínimo de 0.59 % y un máximo de 1.38 %. Por su parte, el índice viscerosomático osciló entre 4.03 y 6.14%. Finalmente, el valor promedio para el factor de condición K osciló entre 0.91 y 1.15, con un valor promedio de 1.00 (Tabla I).

Tabla I. Índices biológicos de *Totoaba macdonaldi*. Los valores indican el promedio de 40 organismos experimentales \pm error estándar de la media (E.E.).

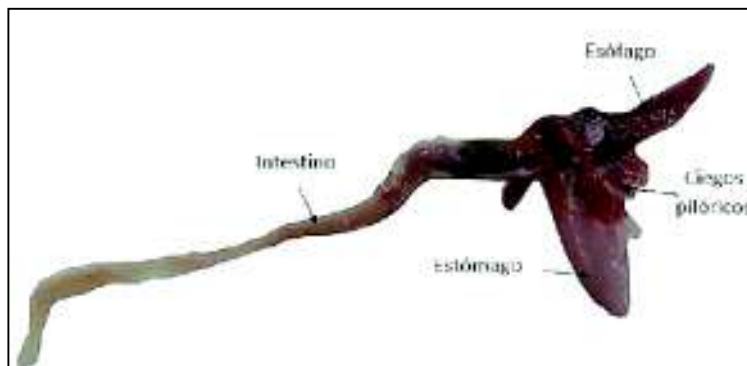


Figura 8. Tracto gastrointestinal de *Totoaba macdonaldi*

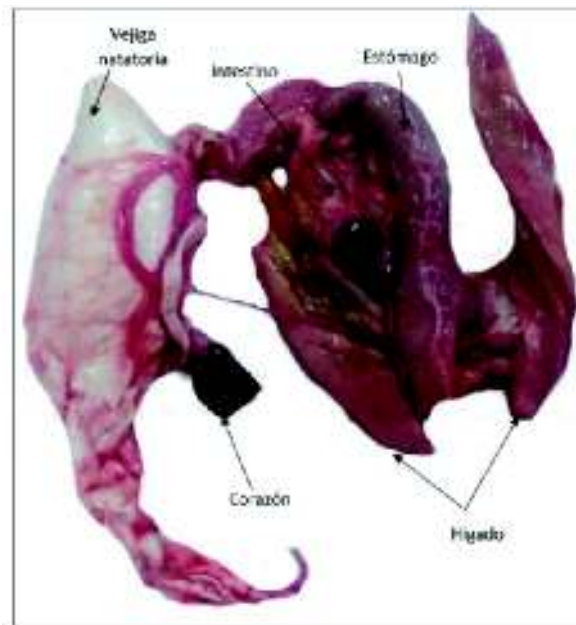


Figura 9. Visceras de *Totoaba macdonaldi*

VI.2. Peso molecular y concentración de la lipasa pancreática

El peso molecular promedio \pm E.E. para la lipasa pancreática de *Totoaba macdonaldi* estimado con el software Image Lab 5.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., 2013) en geles nativos teñidas con QC Colloidal Coomassie fue de 70.4 ± 0.26 kDa (Figura 10). La banda correspondiente a la lipasa pancreática fue posteriormente confirmada mediante la técnica zimográfica donde se observa la reacción de la lipasa con el sustrato en color amarillo sobre un fondo rosado (Figura 11).

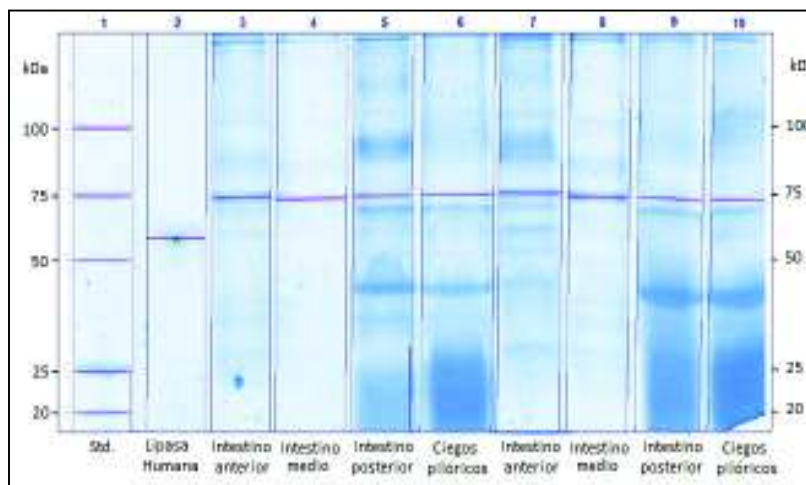


Figura 10. Gel de electroforesis en poliacrilamida para determinar el peso molecular de lipasa pancreática de *Totoaba macdonaldi*, correspondiente a 70.4 kDa.

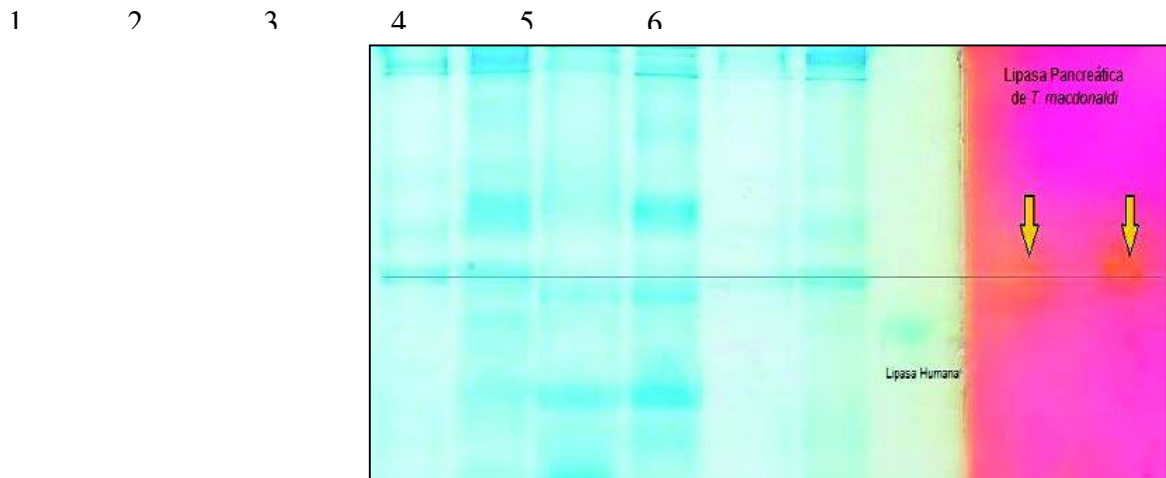


Figura 11. Lipasa pancreática de *Totoaba macdonaldi*: A) Gel nativo teñido con QC Colloidal Coomassie: Carril 1. Intestino medio, carril 2. Intestino anterior, carril 3. Ciegos pilóricos, carril 4. Intestino posterior, carril 5. Intestino medio, carril 6. Intestino anterior de *Totoaba macdonaldi*, y carril 7. Lipasa humana. B) Zimograma: Carril 1 y 2. Lipasa pancreática del intestino anterior de *Totoaba macdonaldi*.

La concentración promedio de la enzima en las diferentes secciones del tracto gastrointestinal (intestino anterior, medio y posterior, y ciegos pilóricos) fue cuantificada con el software Image Lab 5.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., 2013) en geles nativos teñidos con QC Colloidal Coomassie, usando la lipasa humana como estándar cuantitativo de referencia, y los resultados fueron ajustados para expresarse en mg por gramo de tejido (mg/g de tejido). La mayor concentración de lipasa se observó en el intestino anterior, con un promedio de 11.0 ± 2.1 mg/g, seguido por los ciegos pilóricos con una concentración de 2.7 ± 0.7 mg/g, mientras que en el intestino medio se registró una concentración de 2.5 ± 0.5 mg/g y el intestino posterior 2.4 ± 0.3 mg/g de tejido (Figura 12).

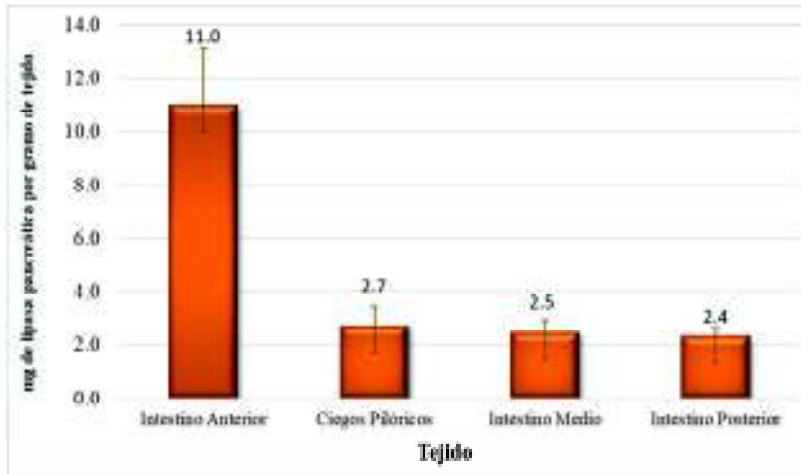
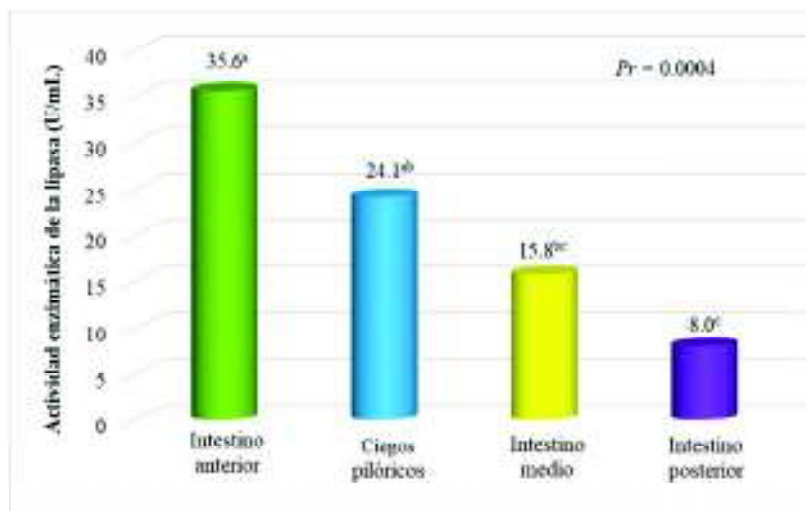


Figura 12. Concentración de lipasa pancreática (mg/g de tejido) a lo largo del tracto gastrointestinal de *Totoaba macdonaldi*.

VI.3. Actividad enzimática de la lipasa en el tracto gastrointestinal

Los valores registrados para la actividad de la lipasa pancreática de *Totoaba macdonaldi* evaluada en diferentes regiones del tracto gastrointestinal a 35°C se muestran en la Figura 13. Dichos valores son el promedio de cuatro organismos experimentales analizados por duplicado con su correspondiente blanco también por duplicado. La actividad lipolítica (promedio \pm E.E.) fue significativamente mayor ($Pr = 0.0004$) en el intestino anterior, con 35.6 ± 5.4 U/mL, seguida por los ciegos pilóricos con 24.1 ± 2.6 U/mL, la actividad de la enzima en ambas secciones del tracto gastrointestinal no fue estadísticamente significativa. En el intestino medio se observó una menor actividad enzimática, 15.8 ± 2.1 U/mL, pero esta actividad no difirió significativamente de la que se observó en los ciegos pilóricos. Sin embargo, en el intestino posterior, la actividad enzimática fue significativamente menor que en todas las demás secciones del tracto digestivo, con 8.0 ± 1.3 U/mL.

Figura 13. Actividad enzimática de la lipasa pancreática en diferentes regiones del tracto gastrointestinal de *Totoaba macdonaldi* a 35°C.



VI.3.1. Efecto de la

temperatura sobre la actividad de la lipasa

Dado que el intestino anterior y los ciegos pilóricos fueron las secciones del tracto gastrointestinal de *Totoaba macdonaldi* que mostraron mayor actividad enzimática, en ellos se evaluó la actividad de la lipasa pancreática a diferentes temperaturas y pH. La temperatura se evaluó en un rango de 20 a 60°C (Tabla II). En ambas secciones la actividad lipolítica mostró la misma tendencia observada anteriormente, que consistió en una mayor actividad en intestino anterior (Figura 14) en comparación con los ciegos pilóricos (Figura 15). Por otra parte, la mayor actividad en la hidrólisis de aceite de oliva en el intestino anterior se evidenció a una temperatura de 45°C con un valor de 70.3 U/mL de extracto que fue significativamente mayor ($Pr < 0.0001$) que, para el resto de las temperaturas evaluadas, observándose un marcado incremento en la actividad lipolítica a partir de los 35°C y una disminución a temperaturas mayores a 45°C.

Tabla II. Actividad enzimática de lipasa a diferentes temperaturas en intestino anterior y ciegos pilóricos de *Totoaba macdonaldi*.

Intestino Anterior Actividad enzimática U/mL de extracto			Ciegos pilóricos Actividad enzimática U/mL de extracto		
Temperatura	Promedio	E.E.	Temperatura	Promedio	E.E.
20°C	13.2 ^{de}	3.1	20°C	7.5 ^{ef}	1.4
25°C	14.8 ^{de}	2.6	25°C	10.0 ^{ef}	1.4
30°C	31.0 ^{bcde}	4.9	30°C	15.6 ^{d^{ef}}	1.9
35°C	35.5 ^{bcd}	4.2	35°C	24.1 ^{bcd}	2.6
40°C	39.0 ^{bc}	4.1	40°C	28.8 ^b	1.6
45°C	70.3 ^a	7.8	45°C	43.1 ^a	2.8
50°C	45.8 ^b	8.1	50°C	26.3 ^{bc}	3.0
55°C	22.5 ^{cde}	1.4	55°C	16.9 ^{cde}	2.1
60°C	9.5 ^e	4.2	60°C	5.0 ^f	1.4
<i>ANOVA Pr>F</i>	< 0.0001		<i>ANOVA Pr>F</i>	< 0.0001	

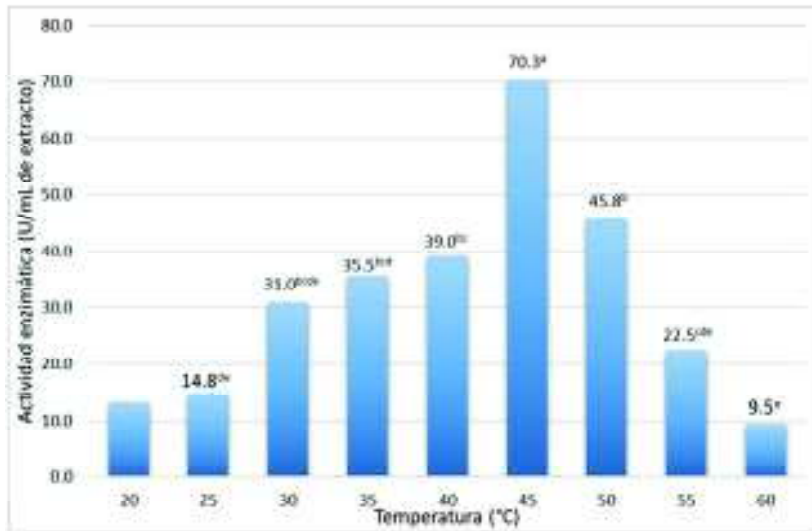


Figura 14. Actividad enzimática de la lipasa pancreática en el intestino anterior de

Totoaba macdonaldi a diferentes temperaturas.

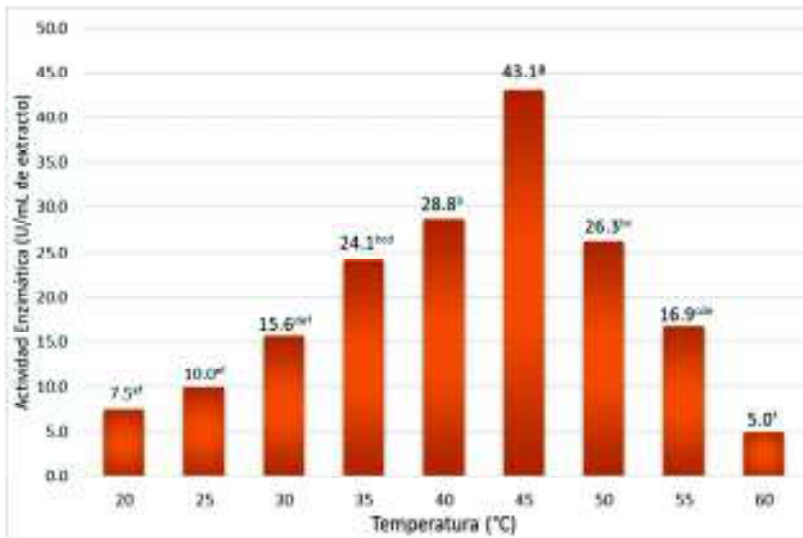


Figura 15. Actividad enzimática de la lipasa pancreática en ciegos pilóricos de *Totoaba macdonaldi* a diferentes temperaturas.

VI.3.2. Efecto del pH sobre la actividad de la lipasa

La actividad lipolítica evaluada a diferentes pH en intestino anterior (Figura 16) y ciegos pilóricos (Figura 17) de totoaba mostró el mismo comportamiento observado para temperatura, para ambas variables, la mayor actividad se presentó en intestino anterior (Tabla III). La mayor actividad lipolítica en ambas secciones se observó a un pH de 8.0, y fue significativamente mayor ($P_r < 0.0001$) que la actividad registrada a otros pH. Se observó una disminución estadísticamente significativa de la actividad a pH tanto mayores como menores.

Tabla III. Actividad enzimática de lipasa a diferentes pH en intestino anterior y ciegos pilóricos de *Totoaba macdonaldi*.

Intestino Anterior Actividad enzimática U/mL de extracto			Ciegos pilóricos Actividad enzimática U/mL de extracto		
pH	Promedio	E.E.	pH	Promedio	E.E.
6	17.5 ^e	0.7	6	8.3 ^d	1.5
7	32.1 ^c	1.1	7	24.2 ^b	2.2
8	73.8 ^a	0.7	8	36.7 ^a	2.5
9	40.4 ^b	1.8	9	18.3 ^{bc}	2.2
10	24.6 ^d	1.1	10	11.3 ^{cd}	1.9
ANOVA $Pr > F$ < 0.0001			ANOVA $Pr > F$ < 0.0001		

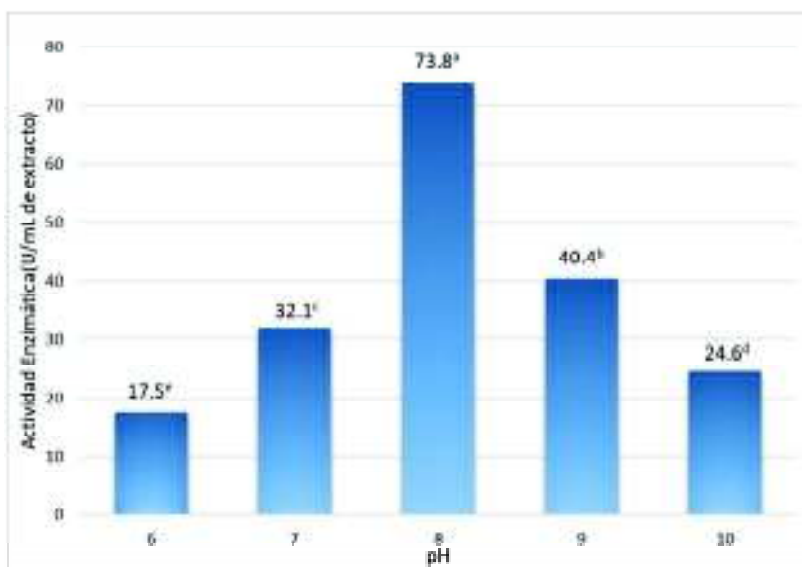


Figura 16. Actividad enzimática de la lipasa pancreática en intestino anterior de *Totoaba macdonaldi* a diferentes pH.

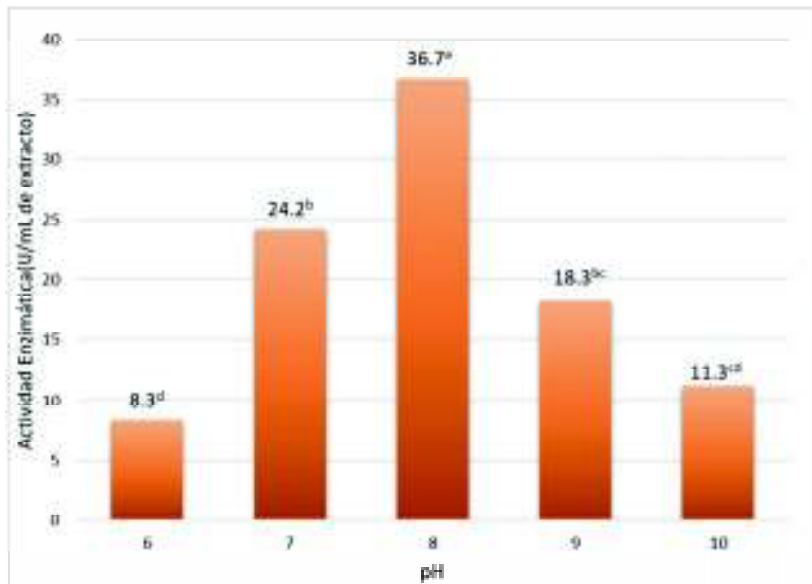


Figura 17. Actividad enzimática de la lipasa pancreática en ciegos pilóricos de *Totoaba macdonaldi* a diferentes pH.

VII. DISCUSIÓN

El cultivo de *Totoaba macdonaldi* es sumamente reciente, por ello, aún se desconocen aspectos relacionados con su fisiología digestiva, incluyendo aspectos relacionados con las

características funcionales de las enzimas que participan en la digestión del lípido dietario que se ofrece en su alimento balanceado. Se sabe que la lipasa pancreática es la principal enzima que participa en la hidrólisis de lípidos en diversas especies de peces (Kurtovic *et al.*, 2010), pero aún se desconocen las características de esta enzima que permiten a esta especie en particular el aprovechamiento de los lípidos dietarios. Esta investigación tuvo el propósito de contribuir al conocimiento de la lipasa pancreática de totoaba, con el fin de optimizar la inclusión de este macronutriente en el alimento formulado para su cultivo comercial, lo que brindará la oportunidad de contribuir a la sustentabilidad de esta industria en el noroeste de México.

VII.1. Índices biológicos

En el presente estudio, los organismos experimentales evaluados contaban con un peso promedio de 1,477.25 g, mientras que la longitud promedio fue de 52.86 cm. Los valores de estos parámetros corporales corresponden a peces de gran talla, que es una de las características de la totoaba que la hacen una especie tan atractiva para su cultivo, y es una talla mucho mayor comparada con la de organismos experimentales manejados comúnmente en las investigaciones para otras especies de peces cultivados; sin embargo, los índices biológicos suelen mantenerse relativamente constantes en peces que conservan aproximadamente la misma estructura corporal durante su crecimiento, y ciertamente los índices corporales analizados en este trabajo son similares a valores reportados en la literatura para esta especie y otras especies de peces marinos, lo que sugiere un buen estado fisiológico de los organismos utilizados en este trabajo.

El IHS es un indicador del estado nutricional del pez, su fluctuación puede ser indicativo de cambios estacionales, infecciones, etc. Un valor elevado de este índice también puede estar asociado a una alta cantidad de alimento consumido o una limitada capacidad digestiva del organismo (Heath, 1995; Chaturvedi y Saksena, 2013). Por otra parte, el factor de condición K suele estar relacionado con el efecto de las interacciones bióticas y abióticas en la condición fisiológica general de los organismos en cultivo (Lizama y Ambrosio, 2002). Los valores promedio observados en este estudio para IHS y K fueron de 0.91% y de 1.0, respectivamente,

y para el IVS fue de 4.92%, todos ellos son valores similares a valores reportados para organismos de la misma especie aunque de talla más pequeña (74.7 – 128.3 g de peso inicial), donde se observan valores de K de 1.0 -1.3, para el IHS valores de 0.7 - 1.3% y para el IVS de 2.7 - 3.8% (Minjarez- Osorio *et al.*, 2012; Perez-Velazquez *et al.*, 2016). Así mismo, para otros scianidos como la curvina roja se han reportado valores de K de 1.03 - 1.13, para el IHS de 1.2 - 1.6% (McGoogan y Gatlin, 2000), para este último índice Chatzifotis *et al.* (2010) también reportan valores de 0.88 – 0.99% en juveniles de *Argyrosomus regius*, otra especie de sciánido.

Valores para el IHS que fluctuaron entre 1.6 - 1.7% o 2.2 - 2.3% en algunas especies como *S. aurata* (Ibeas *et al.*, 2000) y *D. labrax* (Makol *et al.*, 2012) respectivamente, han demostrado que pueden ocasionar efectos adversos en la salud de los peces. El IHS observado en los peces del presente estudio, además de las características físicas de hígado observadas durante la disección, hacen suponer que dicho órgano estaba en condiciones saludables en los organismos evaluados. Pudiera asumirse por tanto que el papel del hígado en el metabolismo de lípidos transcurrió de manera adecuada durante la vida en cautiverio de la totoaba, lo se ve reflejado en el bienestar corporal general de los organismos, demostrado por K. Dichas observaciones pueden también estar relacionadas con las óptimas condiciones ambientales bajo las que se cultivan en las instalaciones del Centro de Reproducción de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES), además del alimento balanceado de alta calidad que recibieron antes de su obtención.

VII.2. Peso molecular y concentración de la lipasa pancreática en diferentes secciones del tracto gastrointestinal

La presencia de la lipasa pancreática de *Totoaba macdonaldi* en el tracto gastrointestinal fue comprobada mediante la obtención del extracto semipurificado de las diferentes secciones. La enzima evaluada mediante SDS-PAGE se detectó en una banda con un peso molecular de 70.4 kDa, que posteriormente confirmado con la ayuda de un zimograma donde fue posible observar una sola banda de actividad de la enzima mediante la huella de actividad de tono

amarillento que dejó en el gel en comparación con el fondo rosado teñido por el sustrato cromogénico (Singh *et al.*, 2006).

La presencia de esta enzima en peces carnívoros puede explicarse por el alto contenido de grasa presente en los alimentos que consumen, en comparación con peces omnívoros o herbívoros (Chakrabarti *et al.*, 1995). El peso molecular detectado para la lipasa de *T. macdonaldi* en este trabajo se encuentra dentro del rango de valores reportados para otras especies de peces marinos. Kurtovic *et al.* (2010) reportaron un peso molecular de 54.9 kDa para la lipasa pancreática en ciegos pilóricos de *O. tshawytscha*, mientras que Gjellesvik *et al.* (1992) reportaron el peso molecular de la lipasa pancreática de *G. morua* en 60 kDa. Otros autores como Iijima *et al.* (1998) reportaron una lipasa hepatopancreática para *P. major* de 64 kDa, mientras que para la lipasa de la carpa común *Cyprinus carpio* el peso molecular reportado fue de 74 kDa (Görgün y Akpınar, 2012). Es común que el peso molecular para una misma molécula o enzima sea distinto entre especies, aun cuando se trate de especies emparentadas, debido a las diferentes presiones ecológicas o ambientales en las que se han desarrollado, y que resultan en adaptaciones evolutivas incluso a nivel molecular (Jellouli *et al.*, 2009). Un ejemplo de ello pudiera ser la curvina golfina *Cynoscion othonopterus*, un sciánido cercano a la totoaba para el cual se reportó un peso molecular de 57.4 kDa (González-Félix *et al.*, 2015).

Se hizo evidente que la concentración de la lipasa pancreática de *T. macdonaldi* disminuye conforme el alimento avanza a través del tracto gastrointestinal, siendo el intestino anterior la sección con mayor concentración de la enzima con 11 mg/g de tejido, seguido por los ciegos pilóricos con 2.7 mg/g y en menor medida por el intestino medio y posterior con 2.5 y 2.4 mg/g, respectivamente, lo cual concuerda con lo reportado por algunos autores que, de manera similar, han observado que la mayor concentración de la lipasa en diferentes especies se presenta tanto en el páncreas como en intestino anterior y ciegos pilóricos, que son las secciones más anteriores del tracto gastrointestinal (Rust, 2002; Nolasco *et al.*, 2011; Deguara *et al.*, 2003; Matus de la Parra *et al.*, 2007). En general, los ciegos pilóricos son estructuras que varían en número entre las especies, y sirven como depósito de enzimas digestivas, aunque también se ha sugerido la posible función de digerir y absorber nutrientes, como es el caso del intestino anterior (Lagler, 1990).

Es importante señalar que los peces en este estudio habían sido alimentados minutos antes de su obtención, por lo que no se descarta la posibilidad de que la provisión de alimento haya ocasionado la secreción de enzimas digestivas y, por tanto, que la mayor concentración de lipasa en la parte anterior del tracto digestivo se deba al tiempo que permaneció el alimento en el tracto gastrointestinal antes de ser sacrificados. Sin embargo, dado que las enzimas digestivas del páncreas son vaciadas en la parte más anterior del intestino, es muy factible que esta sea la razón por la que se observa la mayor concentración de la enzima en las regiones anteriores del tracto gastrointestinal. Por otra parte, es sabido que la concentración de ésta y otras enzimas digestivas se modifica por efecto de diversas condiciones, tales como el estado prandial del organismo, su talla o edad, o su dieta (Morais *et al.*, 2007).

VII.3. Actividad enzimática de la lipasa en diferentes secciones del tracto gastrointestinal

La adecuada digestión y absorción de nutrientes requiere el contacto del alimento con las enzimas digestivas por cierto periodo de tiempo. Un mayor tiempo de retención del alimento en el tracto digestivo puede compensar una baja actividad enzimática (Sanz *et al.*, 1987) y lo contrario puede esperarse también, una alta actividad enzimática pudiera compensar un corto tiempo de retención del alimento en el tracto, por lo se espera que la actividad enzimática en diferentes especies de peces sea diferente en función de la longitud de su tracto digestivo y de su dieta. La actividad enzimática de lipasa evaluada en las diferentes regiones del tracto gastrointestinal a 35°C confirmó que el intestino anterior y los ciegos pilóricos son las secciones del tracto de totoaba que muestran una actividad enzimática significativamente mayor (35.6 y 24.1 U/mL de extracto, respectivamente), en contraste con el intestino medio (15.8 U/mL) e intestino posterior (8.0 U/mL). Estos resultados concuerdan con diferentes investigaciones que han reportado que el intestino anterior y los ciegos pilóricos son las regiones con la mayor actividad de enzimas lipolíticas en diferentes especies de peces como *S. aurata* (Deguara *et al.*, 2003) y *T. orientalis* (Matus de la Parra *et al.*, 2007). Generalmente, la actividad suele ser mayor en la región anterior del intestino y ciegos pilóricos si éstos se presentan, pero esta puede extenderse a las partes distales del intestino con un decremento progresivo de la actividad, como fue el comportamiento observado en este estudio. Sin embargo, excepciones como en los casos de *S. maximus* y *Pleuronectes platessa*, donde la

mayor actividad se encuentra en las partes distales del intestino (Koven *et al.*, 1994; Olsen y Ringo, 1997), aunque esto se ha asociado a factores como la longitud del tracto gastrointestinal, el bajo número de ciegos pilóricos, y a la contribución bacteriana en la hidrólisis de lípidos (Olsen y Ringo, 1997).

Este patrón de actividad enzimática de la lipasa a lo largo del tracto gastrointestinal de totoaba concuerda con los resultados observados para su concentración, determinada por SDS-PAGE, en las diferentes secciones. Sin embargo, a pesar de observar concentraciones de la enzima relativamente similares en ciegos pilóricos, intestino medio y posterior, la actividad de la lipasa registrada en ciegos pilóricos fue mayor que en las secciones media y posterior del intestino de totoaba. Dado que las enzimas digestivas como la lipasa pancreática son proteínas, está expuesta a otras enzimas proteolíticas también presentes a lo largo del tracto gastrointestinal, por lo que es posible que al alcanzar los segmentos medio y posterior la lipasa haya sido objeto de proteólisis y/o pérdida de actividad. Sin embargo, es posible que estas discrepancias sean relativas al manejo de las muestras y al método de determinación de actividad *in vitro* y no necesariamente efecto de lo que sucede en el organismo.

Finalmente, la lipasa pancreática de *T. macdonaldi* fue capaz de hidrolizar los ácidos grasos esterificados a las moléculas de triacilglicerol presentes en el aceite de oliva, que demuestra su habilidad catalítica para hidrolizar estos lípidos complejos. Ello ha sido demostrado en otros estudios para otras especies como *G. morhua* (Gjellesvik *et al.*, 1989) y *S. aurata* (Nolasco *et al.*, 2011). Esta característica de la enzima potencialmente permite sustituir el aceite de pescado por diferentes fuentes de aceite, tanto vegetales como animales, en la formulación de alimento balanceado para totoaba, al menos parcialmente.

VII.3.1. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la lipasa

El intestino anterior y los ciegos pilóricos que fueron los tejidos que mostraron mayor actividad lipolítica, en función de ello se eligieron para evaluar la actividad enzimática a diferentes temperaturas y pH. La temperatura óptima de actividad lipolítica fue a 45°C en ambos tejidos y se observó un comportamiento similar en ambos, una reducción significativa de la actividad a temperaturas mayores y menores a la óptima, que sugiere una pérdida de la

actividad o la desnaturalización de la enzima. Los ciegos pilóricos mostraron, como era de esperarse, menor actividad que el intestino anterior, pero se confirmó la temperatura óptima y la disminución de la actividad en las demás temperaturas evaluadas. Estos resultados son consistentes por lo reportado por Noriega-Rodríguez *et al.* (2009) para las vísceras de *Sardinops sagax caerulea*, en donde observaron una actividad lipolítica óptima a 40°C. Por su parte, Rueda-López *et al.* (2017) analizaron extractos del páncreas en tres especies de peces incluyendo *T. orientalis*, *Morone saxatilis*, y *T. macdonaldi*, describiendo un comportamiento similar de la enzima con temperaturas óptimas de actividad en un rango de 35-45°C. Aryee *et al.* (2007) reportaron una temperatura óptima de actividad a 50°C para *M. cephalus*, y Matus de la parra *et al.* (2007) reportaron que la lipasa de *T. orientalis* presentó su óptimo de actividad a 45°C. Kurtovic *et al.* (2010) caracterizaron dos lipasas provenientes de ciegos pilóricos de dos salmónidos, el salmón Chinook *Oncorhynchus tshawytscha* y Hoki *Macruronus novaezelandiae*, en ambos la temperatura óptima de actividad de la lipasa fue a 35°C. La lipasa de *S. aurata*, que es un pez de aguas templadas, mostró una temperatura óptima de actividad a 50° C (Nolasco *et al.*, 2011).

Se sabe que la actividad de la lipasa, al igual que otras enzimas pancreáticas, puede variar en los peces de acuerdo a factores tales como la edad, la fuente y calidad del lípido dietario y el estado prandial de los organismos, entre otros factores (Morais *et al.*, 2007). Los organismos adaptados a bajas temperaturas tienen la capacidad de reducir la energía de activación de sus enzimas, lo que se traduce en una reacción más rápida, esta estrategia los hace ser más eficientes durante el proceso digestivo (Hochachka y Somero, 2002).

En general, la temperatura óptima de actividad enzimática reportada en la literatura para otras especies de peces es generalmente mayor que su temperatura fisiológica. Este comportamiento puede presentarse por que a medida que aumenta la temperatura, también se incrementa la tasa de reacción debido a un incremento en la energía cinética de las moléculas reactivas. Y, debido al incremento de la temperatura, mientras la enzima pase más tiempo en su óptimo catalítico es más probable su desnaturalización, esta puede ser una de las razones por la que el óptimo catalítico de las enzimas no necesariamente se encuentran cerca del óptimo fisiológico de las especies (Murray *et al.*, 1990). Sin embargo, es posible que la lipasa pancreática encontrada en este estudio probablemente pueda ser utilizada en procesos

biotecnológicos donde se requieran temperaturas de activación relativamente bajas, cercanas a 45°C, como en la industria de detergentes (Kurtovic *et al.*, 2009; Choudhury y Bhunia, 2015).

VII.3.2. Efecto del pH sobre la actividad de la lipasa

La actividad lipolítica del intestino anterior y ciegos pilóricos se evaluó para valores de pH en un rango de 6-10 a una temperatura de 45°C, que fue la temperatura óptima de actividad enzimática observada en este estudio para la lipasa pancreática. La actividad lipolítica óptima se encontró en la zona alcalina a un pH de 8.0 para ambas secciones del tracto gastrointestinal analizadas, y en ambas, la actividad en este pH fue significativamente mayor que los demás valores de pH analizados. El comportamiento muestra un incremento marcado en la actividad a partir del pH 7.0 y una pérdida considerable a pH de 9.0 y mayores, lo que puede indicar una desnaturalización de la enzima. Al igual que para la temperatura, también se observó mayor actividad en el intestino anterior que en los ciegos pilóricos. Sovik y Rustad (2005) y Aryee *et al.* (2007) evaluaron la actividad de la lipasa en las vísceras de *G. morua* y *M. cephalus*, respectivamente, y observaron pH óptimos en rangos de 7-8, similares a nuestros resultados. Así mismo, Rueda-López *et al.* (2017) observaron una actividad máxima a pH de 8.0 para la misma especie, como el aquí reportado, mientras que en *P. major* se determinó un rango de actividad óptima de la lipasa entre 7.0 y 9.0 de pH utilizando 4 nitrofenil miristato como sustrato (Iijima *et al.*, 1998).

Al igual que la temperatura, el pH influye sobre la actividad dependiendo de la conformación molecular de la enzima y confiere el ambiente adecuado en el que la enzima puede unirse al sustrato, lo que hace que las actividades de las enzimas sean muy sensibles a cambios en el pH y que pueden conducir a la desnaturalización de las enzimas (Murray *et al.*, 1990). La lipasa pancreática de totoaba tiene un pH óptimo de 8.0, lo que confirma que pudiera ser utilizada en la industria de los detergentes o en procesamiento de alimentos (Kurtovic *et al.*, 2009; Choudhury y Bhunia, 2015).

Los resultados de este estudio demostraron la presencia de una lipasa pancreática en el tracto gastrointestinal de *Totoaba macdonaldi*. Se demostró que la lipasa se encuentra distribuida a lo largo del tracto gastrointestinal, y a medida que se acerca a la sección posterior

del tracto, tanto su abundancia como su actividad catalítica disminuyen. Se demostró que la enzima presenta características bioquímicas similares a la de otras especies de peces marinos cultivados a nivel mundial. Sin embargo, los datos obtenidos hasta el momento proporcionan poca información sobre la funcionalidad de la lipasa bajo las condiciones fisiológicas normales dentro del tracto digestivo de la totoaba, por lo que más investigación es requerida para conocer su potencial enzimático bajo condiciones *in vitro* y/o para determinar propiedades enzimáticas adicionales que le permitan el poder ser utilizada como una herramienta tecnológica en procesos industriales, principalmente en los relacionados con la industria de detergentes y alimentos. Los resultados descritos constituyen un avance importante en el conocimiento de la lipasa pancreática involucrada en el proceso digestivo de totoaba, y pudiera propiciar un avance aplicado a la mejora de su cultivo mediante la optimización de la formulación y de la inclusión de lípidos en su alimento balanceado.

VIII. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se realizó el presente estudio se puede concluir que:

- La presencia de lipasa pancreática en el tracto digestivo de *Totoaba macdonaldi* confirma que esta especie tiene la capacidad catalítica para utilizar los acilglicéridos dietarios.
- La presencia de lipasa pancreática no está limitada a una región particular del tracto gastrointestinal de *T. macdonaldi*. Sin embargo, la hidrólisis de lípidos se realiza

principalmente en el intestino anterior y ciegos pilóricos, mientras que su presencia y actividad decrecen hacia las partes distales o posteriores del intestino.

- La lipasa semipurificada de *T. macdonaldi* analizada mediante SDS-PAGE mostró una banda de actividad con peso molecular estimado de 70.4 kDa.
- Se detectó una actividad enzimática óptima a una temperatura de 45°C tanto en el intestino anterior como en ciegos pilóricos.
- Se detectó un pH óptimo de 8.0 en intestino anterior y ciegos pilóricos.
- Las propiedades bioquímicas observadas para la lipasa de *T. macdonaldi* son similares a lo reportado para la mayoría de las lipasas en peces cultivados a nivel mundial, pero se encuentra fuera de su óptimo fisiológico.
- Se demostró que la lipasa de *T. macdonaldi* es capaz de hidrolizar triacilglicéridos presentes en el aceite de oliva.
- Estos resultados representan un avance en la caracterización de las enzimas lipolíticas digestivas de esta especie.

IX. RECOMENDACIONES

El presente estudio contribuye en gran medida al incremento de conocimiento de las enzimas lipolíticas digestivas de *Totoaba macdonaldi*; de la misma manera, nos permite plantearnos algunos aspectos que deben ser abordados para obtener más conocimientos en investigaciones futuras con esta especie. Entre estos se encuentran:

- Purificar la lipasa pancreática de *Totoaba macdonaldi* mediante métodos cromatográficos, con el fin de conocer su estructura molecular, su potencial

bioquímico y cuáles son las características funcionales de esta enzima en su forma pura.

- Secuenciar la enzima mediante métodos moleculares.
- Analizar la presencia y actividad de la enzima a lo largo de 24 horas para establecer cómo se modifican ambas variables dependiendo del estado prandial del pez.
- Realizar estudios comparativos con diferentes especies o en diferentes etapas del ciclo de vida de *T. macdonaldi*, para establecer diferencias en la presencia y actividad catalítica de la enzima en función de la especie y la edad.
- Analizar el efecto del nivel de inclusión de lípidos dietarios y el tipo de lípido en la presencia y actividad de la enzima, así como de su expresión.

X. LITERATURA CITADA

- Akanbi, T. O., A. J. Sinclair y C. J. Barrow. 2014. Pancreatic lipase selectively hydrolyses DPA over EPA and DHA due to location of double bonds in the fatty acid rather than regioselectivity. *Food Chemistry* 160: 61- 66.
- Akoh, C. C., G. C. Lee, Y.C. Liaw, T. H. Huang y J. F. Shaw. 2004. GDSL family of serine esterases/lipases. *Progress in Lipid Research* 43: 534-552.
- Aloulou, A., J. A. Rodriguez, S. Fernandez, D. V. Oosterhout, D. Puccinelli y F. Carrière. 2006. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. *Biochimica et Biophysica Acta* 1761: 995-1013.

- AOAC. 2005. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis 18th ed.
- Aquaculture development and coordination programme (ADCP).1978. Curriculum for the training of aquaculturists in the Latin American Regional Centre for Aquaculture. Pirassununga, State of Sao Paulo, Brazil. Rome. UNDP/FAO, ADCP/REP/78/6.
- Aryee, A. N. A., B. K. Simpson y R. Villalonga. 2007. Lipase fraction from the viscera of gray mullet (*Mugil cephalus*). Isolation, partial purification and some biochemical characteristics. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 394-402.
- Bacha, A. B., A. Karray, L. Daoud, E. Bouchaala, M. B. Ali, Y. Gargouri y Y. B. Ali. 2011. Biochemical properties of pancreatic colipase from the common stingray *Dasyatis pastinaca*. *Lipids in Health and Disease* 10: 69.
- Beisson, F., A. Tiss, C. Rivière y R. Verger. 2000. Methods for lipase detection and assay; a critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology* 133-153.
- Belarbi, E. H., E. Molina y Y. Chist. 2000. A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 516-529.
- Brockman, H. L. 2000. Kinetic behavior of the pancreatic lipase-colipase-lipid systems. *Biochimie* 82: 987-995.
- Bromley, P. J. 1980. Effect of dietary protein, lipid and energy content on the growth of turbot *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* 19: 359-369.
- Cárdenas, S. 2011. Acuicultura de Curvinas (Pisces: Sciaenidae) En América y El Mundo. Tercer Congreso Nacional de Acuicultura, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima Perú, Febrero 2011.
- Cárdenas, S. 2012. Biología y acuicultura de corvinas en el mundo. *Revista AcuaTic. Revista Científica de la Sociedad Española de Acuicultura* 37: 1-13.
- Carta Nacional Acuícola. 2012. Diario Oficial de la Federación. 6/Junio/2012. <http://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/2011/06062012%20SAGARPA.pdf>.
- Chakrabarti, N., M. A. Gani, K. K. Chaki, R. Sur y K. K. Misra. 1995. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comp. Biochem. Physiol.* 112A: 167-177.
- Chaturvedi, J. y Saksena, D. N. 2013. Diet composition, feeding intensity, gastrosomatic index and hepatosomatic index of a catfish, *Mystus cavasius* from Chambal river (near, Rajghat) Morena, Madhya Pradesh. *International Journal of Recent Scientific Research* 4(9): 1350-1356.

- Chatzifotis, S., M. Panagiotidou, N. Papaioannou, M. Pavlidis, I. Nengas y C. C. Mylonas. 2010. Effect of dietary lipid levels on growth, feed utilization, body composition and serum metabolites of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles. *Aquaculture* 307: 65–70.
- Choudhury, P. y B. Bhunia. 2015. Industrial application of lipase: a review. *Biopharm Journal* 1(2): 41-47.
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA). 2012. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2012. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA). 2013. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2013. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Convention on International Trade in Endangered Species (CITES). 2005. Appendices I, II and III (12/01/2005). Convention on International Trade in Endangered species of Wild Fauna and Flora. Geneva, Switzerland. 49 pp.
- Couto, A., P. Enes, H. Peres y A. Oliva-Teles. 2012. Temperature and dietary starch level affected protein but not starch digestibility in gilthead sea bream juveniles. *Fish Physiol Biochem* 38: 595-601.
- Craig, Steven. 2009. Understanding fish nutrition, feeds, and feeding. Produced by Communications and Marketing, College of Agriculture and Life Sciences, Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Curtis, E. y N. Sue Barnes. 2001. *Biología*. Sexta edición. México, D.F.
- Deguara, S., Jauncey, K. y Agius, C. 2003. Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. *Journal of Fish Biology* 62: 1033-1043.
- Derewenda, Z. S. y U. Derewenda. 1992. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 227: 818-839.
- Edwards, P. 2000. *Aquaculture, Poverty Impacts and Livelihoods*. Natural Resource Perspectives. Londres, Inglaterra. ODI/DFID, N° 56, 4.
- Ellis, S. C. y R. C. Reigh. 1991. Effects of dietary lipid and carbohydrate levels on growth composition of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture* 97: 383-394.
- Enzyme Commission. 1993. Enzymatic Assay of Lipase (E.C.3.1.1.3). Reagent Chemicals ACS Specification, 8th ed., 95.
- Fischer, W., F. Krupp, W. Schneider, C. Soomer, K.E. Carpenter y V.H. Niem. 1995. Guía FAO para la Identificación de Especies para los Fines de la Pesca. Pacífico Centro-

- Oriental. Vol. III. Vertebrados: 1201-1813p. En N. L. Chao (eds.). Sciaenidae: 1427-1518. Roma, Italia.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2012. Estado Mundial de la Pesca y Acuicultura. Fisheries and Aquaculture Department. Roma, Italia.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2014. Estado Mundial de la pesca y Acuicultura. Fisheries and Aquaculture Department. Roma, Italia.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2016. Estado Mundial de la pesca y Acuicultura. Fisheries and Aquaculture Department. Roma, Italia.
- Furné, M., M. C. Hidalgo, A. López, M. García-Gallego, A. E. Morales, A. Domezain, J. Domezain y A. Sanz. 2005. Digestive enzyme activities in adriatic sturgeon *Acipenser naccari* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture* 250: 391-398.
- Garibaldi, L. 1996. List of animal species used in aquaculture. FAO. Fisheries circular. Rome, Italy. No. 914 FIRI/C914 38pp.
- Gatlin III, D.M. 2002. Red drum, *Sciaenops ocellatus*. In Webster, C.C., Lim, C.E. (Eds.), *Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture*. CABI Publishing, New York, N.Y, pp.147-158.
- Gilham, D. y R. Lehner. 2005. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods* 36:139-147.
- Gjellesvik, D. R., A.J. Raae, y B.T. Walther. 1989. Partial Purification and characterization of a triglyceride lipase from cod (*Godus morhua*). *Aquaculture* 79: 177-184.
- Gjellesvik, D. R., D. Lombardo y B. T. Walther. 1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): purification and properties. *Biochimica et Biophysica Acta* 1124:123-134.
- Gjellesvik, D. R., J. B. Lorens y R. Male. 1994. Pancreatic carboxylester lipase from Atlantic Salmon (*Salmo salar*) cDNA sequence and computer assisted modelling of tertiary structure. *Eur. J. Blocheni*, 226:603-612.
- González-Félix, M. L., C. Minjarez-Osorio, M. Perez-Velazquez y P. Urquidez-Bejarano. 2015. Influence of dietary lipid on growth performance and body composition of the Gulf corvina, *Cynoscion othonopterus*. *Aquaculture* 448: 401-409.
- González-Félix, M. L., C.A. Maldonado-Othón, M. Perz-Velazquez. 2016. Effect of dietary lipid level and replacement of fish oil by soybean oil in compound feeds for the shortfin corvina (*Cynoscion parvipinnis*). *Aquaculture* 454: 217-228. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.021>.

- Görgün, S. y M. A. Akpınar. 2012. Purification and characterization of lipase from the liver of carp, *Cyprinus carpio* L. (1758), living in Lake Tödürge (Sivas, Türkiye). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science 12: 207–215.
- Halver, J. E., y R. W. Hardy. 2002. Fish Nutrition. Elsevier Sciences. 3ed. Orlando, Florida, USA. 353.
- Harmon, J. S., K.G. Michelsen y M.A. Sheridan. 1991. Purification and characterization of hepatic triacylglycerol lipase isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish Physiology and Biochemistry 9 (4): 361-368.
- Heath, A. 1995. Water pollution and fish physiology. CRC Press, Boca Ratón, FL, USA. 359 pp.
- Hillestad, M. y F. Johnsen. 1994. High-energy/low-protein diets for Atlantic salmon: effects on growth, nutrient retention and slaughter quality. Aquaculture 124: 109–116.
- Hirata, K., T. Ishida, H. Matsushita, P. S. Tsao y T. Quertermous. 2000. Regulated expression of endothelial cell-derived lipase. Biochemical and Biophysical Research Communications 272(1): 90-93.
- Hixson, S. E. 2014. Fish nutrition and current issues in aquaculture: The balance in providing safe and nutritious seafood, in an environmentally sustainable manner. Journal Aquaculture Research and Development 5: 1-10.
- Hochachka P.W. y G.N. Somero, 2002. Biochemical Adaptation. Mechanism and Process in Physiological Evolution. New York. Oxford University Press. 480 pp
- Ibeas, C., C. Rodríguez, P. Badía, J. Rosa-Cejas, F.J. Santamaría y A. Lorenzo. 2000. Efficacy of dietary methyl esters of n-3 HUFA vs triacylglycerols of n-3 HUFA by gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. Aquaculture 190:273-287.
- Iijima, N., S. Tanaka y Y. Ota. 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. Fish Physiology and Biochemistry 18: 59-69.
- Islam, M. A., N. Absar y A. S. Bhuiyan. 2008. Isolation, purification and characterization of lipase from Grey mullet (*Liza parsia* Hamilton, 1822). Asian Journal of Biochemistry 3(4): 243-255.
- Islam, M. A., F. Parveen, K. Hossain, S. Khatun, M. R. Karim, G.S. Kim, N. Absar y M. S. Haque. 2009. Purification and biochemical characterization of lipase from the dorsal part of *Cirrhinus reba*. Thai Journal of Agricultural Science 42(2): 71-80.
- Izquierdo, M. S., H. J. Socorro, L. Arantzamendi y C. M. Hernandez-Cruz. 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. Fish Physiology and Biochemistry 22:97-107.

- Izquierdo, M. S., H. Fernández-Palacios, y A. G. J. Tacon. 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197:25-42.
- Jansen, H., A. J. M. Verhoeven y E. J. G. Sijbrands. 2002. Hepatic lipase: A pro- or anti-atherogenic protein? *Journal of Lipid Research* 43: 1352–1362.
- Jellouli, K., A. Bougatef, D. Daassi, R. Balti, A. Barkia y M. Nasri. 2009. New alkaline trypsin from the intestine of Grey triggerfish (*Balistes capriscus*) with high activity at low temperature: purification and characterization. *Food Chemistry* 116: 644–650.
- Jensen, R. G., F.A. DeJong y R. M Clark. 1983. Determination of lipase specificity. *Lipids* 18: 239-252.
- Ji, H., H. T. Sun y D. M. Xiong. 2011. Studies on activity, distribution, and zymogram of protease, α -amilase, and lipase in paddlefish *Polyodon spathula*. *Fish Physiology Biochemistry*. 11 p.
- Juárez, M. L. 2016. La acuicultura puede ayudar a la totoaba, especie en peligro de extinción. *Panorama Acuícola* 21(2): 32-35.
- Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200: 181-201.
- Koven, W. M., R. J. Henderson y J. R. Sargent. 1994. Lipid digestion in turbot *Scophthalmus maximus*. 1: Lipid class and fatty acid composition of digesta from different segments of the digestive tract. *Fish Physiology and Biochemistry* 13: 69-79.
- Kurokawa, T. y T. Suzuki. 1995. Structure of the exocrine pancreas of flounder (*Paralichthys olivaceus*): immunological localization of zymogen granules in the digestive tract using anti-trypsinogen antibody. *Journal of Fish Biology* 46(2):292-301.
- Kurokawa, T. y T. Suzuki. 1996. Formation of the diffuse pancreas and the development of digestive synthesis in larvae of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 141:267-276.
- Kurtovic, I., S. N. Marshall, X. Zhao y B. K. Simpson. 2009. Lipases from mammals and fishes. *Reviews in Fisheries Science* 17(1):18-40.
- Kurtovic, I., S. N. Marshall y X. Zhao. 2010. Purification and properties of digestive lipases from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and zeland hoki (*Macruronus novaezelandiae*). *Fish Physiology and Biochemistry* 36: 1041-1060.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lagler, K. F., J. E. Bardach, R. R. Miller y D. R. May-Passino. 1990. *Ictiología*. AGT Editor, S.A. México, D. F. 489 p.

- Langeland, M., J. E. Lindberg y T. Lundh. 2013. Digestive Enzyme Activity in Eurasian Perch (*Perca fluviatilis*) and arctic charr (*Salvelinus Alpinus*). Journal of Aquaculture Research and Development 5-1.
- Lazo, J. P., R. Mendoza, G. J. Holt, C. Aguilera, y C. R. Arnold. 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). Aquaculture 265: 194-205.
- Lercari D. y E.A. Chavez. 2007. Possible causes related to historic stock depletion of the totoaba, *Totoaba macdonaldi* (Perciformes: Sciaenidae), endemic to the Gulf of California. Fisheries Research 86:136-142.
- Li, Y. Y., W. Z. Chen, Z. W. Sun, J. H. Chen y K. G. Wu. 2005. Effects of n-3 HUFA content in broodstock diet on spawning performance and fatty acid composition of eggs and larvae in *Plectorhynchus cinctus*. Aquaculture 245: 263–272.
- Lizama, M.A.P. y A.M. Ambrosio. 2002. Condition factor in nine species of fish of the Characidae family in the upper Parana River Floodplain, Brazil. Brazilian Journal of Biology 62(1): 113-124.
- Lombardo, D. 2001. Bile salt-dependent lipase: its pathophysiological implications. Biochemica et Biophysica Acta 1533:1-28.
- Makol, A., S. Torrecillas, M.J. Caballero, A. Fernandez-Vaquero y M.S. Izquierdo. 2012. Effect of long term feeding with conjugated linoleic acid (CLA) in growth performance and lipid metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture 368-369:29-137.
- Mathews, C. K., K. E. Van Holde y K.G. Ahern. 2002. Bioquímica. Tercera Edición. Pearson. Madrid, España. ISBN: 84-7829-053-2.
- Matus de la Parra, A., A. Rosas, J. P. Lazo y M. T. Viana. 2007. Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. Fish Physiology and Biochemistry 33:223–231.
- McGoogan, B. B. y D. M. Gatlin III. 1999. Dietary manipulations affecting growth and nitrogenous waste production of red drum. *Sciaenops ocellatus*. I. Effects of dietary protein and energy levels. Aquaculture 178: 333–348.
- McGoogan, B. B. y D. M. Gatlin. 2000. Dietary manipulations affecting growth and nitrogenous waste production of red drum *Sciaenops ocellatus* II. Effects of energy level and nutrient density at various feeding rates. Aquaculture 182: 271–285.
- Minjarez-Osorio, C., M. L. González-Félix y M. Perez-Velazquez. 2012. Biological performance of *Totoaba macdonaldi* in response to dietary protein level. Aquaculture 362-363: 50-54.

- Minjarez-Osorio, C., M. L. González-Félix y M. Perez-Velazquez. 2014. Totoaba: Endangered fish species has aquaculture potencial in Mexico. *Global Aquaculture Advocate* 1-2.
- Morais, S., L. E. C. Conceição, I. Rønnestad, W. Koven, C. Cahu, J. L. Zambonino Infante, y M. T. Dinis. 2007. Dietary neutral lipid level and source in marine fish larvae: effects on digestive physiology and food intake. *Aquaculture* 268: 106–122.
- Moyano, L. F. J., M. Díaz, F. J. Alarcón y M.C. Sarasquete. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry* 15: 121-130.
- Moyano, L., F. J. 2006. Bioquímica Digestiva en Especies Acuicultivadas: Aplicaciones en Nutrición. *Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Almería, España.
- Murray, R. K., P. A. Mayes D. K. Granner y V. W. Rodwell. 1990. Enzyme kinetics. In: *Harpers Biochemistry* (Rodwell, V. W. Eds) 68-81.
- Namulawa, V. T., C. D. Kato, J. Rutaisire, P. J. Britz, N. Beukes, B.I. Pletschke y C. Whiteley. 2013. Enzyme activity in the Nile perch gut: Implications to Nile perch culture. *International Journal of Fisheries and Aquaculture* 5: 221-228.
- Nolasco, H., L. F. J. Moyano y F. Vega-Villasante. 2011. Partial characterization of pyloric-duodenal lipase of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol Biochem* 37:43-52.
- Noriega-Rodriguez, J.A., N. Gámez-Meza, A. Alanis- Villa, L. A. Medina-Juárez, A. Tejeda-Mansir, O. Angulo-Guerrero y H. S. García. 2009. Extraction and fractionation of lipolytic enzyme from viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). *International Journal of Food Science and Technology* 44:1223-1228.
- Ogiwara, K. y T. Takahashi. 2007. Specificity of the medaka enteropeptidase serine protease and its usefulness as biotechnological tool for fusion-protein cleavage. *PNAS* 104 (17): 7021-7026.
- Ollis, D. L., E. Cheah, M. Cyler, B. Dijkstra, F. Frolow, S.M. Franken, M. Harel, S.J. Remington, I. Silman, J. Schrag, J.L. Sussman, K.H.G. Verschuere y A. Goldman. 1992. The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering* 5: 197-211.
- Olsen, R. E. y E. Ringo. 1997. Lipid digestibility in fish: A review. *Recent Research Developments in Lipids Research* 1: 199-265.
- Osorio, N. M., S. Ferreira-Dias, J. H. Gusmao y M. M. R. da Fonseca. 2001. Response surface modeling of the production of omega-3 polyunsaturated fatty acids-enriched fats by a commercial immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11: 677-686.

- Paredes, G. A., B. Erisman, I. Macareñas Osorio, J. Cota Nieto, K. Gherard y O. A. Oropeza. 2010. La curvina mou: Biología, pesquería y su gente. CONABIO. Biodiversitas 91: 1-5.
- Pedrin-Osuna, O., J. H. Córdova-Murueta y M. Delgado-Marchena. 2001. Crecimiento y mortalidad de la totoaba, *Totoaba macdonaldi*, del alto golfo de California. Ciencia Pesquera 15: 131-140.
- Perez-Velazquez, M., P. Urquidez-Bejarano, M.L. González-Félix, C. Minjarez-Osorio. 2014. Evidence of Euryhalinity of the Gulf Corvina (*Cynoscion othonopterus*). Physiological Research 63: 659-666.
- Perez-Velazquez, M., M. L. González-Félix, M. T. Viana, J. P. Lazo-Corvera y C. A. Maldonado-Othón. 2015. Effects of dietary protein and lipid levels on growth and body composition of the Gulf corvina, *Cynoscion othonopterus*. International Journal of Aquatic Science. 6(2): 11-28.
- Perez-Velazquez, M., C. Minjarez-Osorio y M. L. González-Félix. 2016. Effect of dietary lipid level on growth performance, feed utilization, and body composition of totoaba, *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890). Aquaculture Research 1-11. doi:10.1111/are.13002.
- Rader, D. J. y M. Jaye. 2000. Endothelial lipase: A new member of triglyceride lipase gene family. Genetics and Molecular Biology 11:141-147.
- Rueda-López, S., J. P. Lazo, G. Correa-Reyes y M. T. Viana. 2011. Effect of dietary protein and energy levels on growth, survival and body composition of juvenile *Totoaba macdonaldi*. Aquaculture 319: 385–390.
- Rueda-López, S., E. Martínez-Montaña y M.T. Viana, 2017. Biochemical characterization and comparison of pancreatic lipases from the Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*; totoaba, *Totoaba macdonaldi*; and striped bass, *Morone saxatilis*. Journal of the World Aquaculture Society. doi: 10.1111/jwas.12372.
- Rust, M. B. 2002. Nutritional Physiology In: Fish Nutrition, Third edition. (Halver, J. E., Ed.). San Diego. Academic Press. 407 pp.
- Sanz, A., García-Gallego, M., Cardenete, G., de la Higuera, M., Hidalgo, F., 1987. Volumen y composición de la bilis vesicular durante el ayuno en la trucha. Cuad. Marisq. Publ. Téc. 12; 173– 178.
- Sargent, J. R., R. J. Henderson y D. R. Tocher. 1989. The lipids In Fish Nutrition, Third edition, J. E. Halver, ed. San Diego. Academic press. Pp. 154-219.
- Scopes, R. K. 2002. Enzyme Activity and assays. Encyclopedia of Life Science.
- Sharma, R., Y. Chisti y U.C. Banerjee. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnology Advances 19: 627- 662.

- Shiau, S. Y. y C. W. Lan. 1996. Optimum dietary protein level and protein to energy ratio for growth of grouper (*Epinephelus malabaricus*). *Aquaculture* 145: 259–266.
- Singh, R., V.K. Gupta y V.K. Goswami. 2006. A simple activity staining protocol for lipases and esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70: 679-682.
- doi: 10.1007/s00253-005-0138-z
- Smichi, N., A. Fendri, Z. Zaral, E. Bouchaala, S. Chérif, Y. Gargouri y N. Miled. 2012. Lipolytic activity and colipase presence in digestive glands of some marine animals. *Fish Physiology and Biochemistry* 38: 1449-1458.
- Smichi, N., A. Fendri, Y. Gargouri y N. Miled. 2015. A high salt-tolerant thermos active esterase from golden grey mullet: purification, characterization, and kinetic properties. *Journal of Food Biochemistry* 39:289-299.
- Sovik, S. L. y T. Rustad. 2005. Effect of season and fishing ground on the activity of lipase in byproducts from cod (*Gadus morhua*). *LWT* 38: 867-876.
- Thoman, E. S., D. A. Davis y C. R. Arnold. 1999. Evaluation of growout diets with varying protein and energy levels for red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 176: 343–353.
- Tocher, D. R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science* 11(2):107-184.
- Tocher, D. R. 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*. 41: 717–732.
- Tocher, D. R. 2015. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture* 449: 94–107.
- Turchini G. M., B. E. Torstensen y Ng. Wing-Keon. 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in aquaculture* 1: 10-57.
- Valenzuela-Quñones, F. 2014. Genética y dinámica poblacional de la totoaba (*Totoaba macdonaldi*, gilbert, 1891) en el Golfo de California. Tesis Doctoral (CIBNOR).
- Van der Heiden. 1985. Taxonomía, biología y evaluación de la ictiofauna demersal del Golfo de California, Cap. 4: 149-200 En: Yañez-Arancibia, A. (Ed.) Recursos pesqueros potenciales de México: La pesca acompañante del camarón. Progr. Univ. De Alimentos, Inst. Cienc. del Mar y Limnol., Inst. Nal. de Pesca UNAM, México D.F. 748 pp.
- Verma, N., S. Thakur y A.K. Bhatt. 2012. Microbial lipases: industrial applications and properties. *International Journal of Biological Sciences* 1(8):88-92.
- Watanabe, T. 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *Journal of the World Aquaculture Society* 24: 152–161.

- Whitaker, J. R. 1994. Effect of pH on rates of enzyme-catalyzed reactions. In Principles of enzymology for the food Sciences, Fennema, O. R. ed., Marcel Dekker Inc., New York, N. Y., pp. 240-329.
- Winkler, U. K., A. d'Arcy y W. Hunziker. 1990. Structure of human pancreatic lipase. *Nature* 343:771-774.
- Wu, T., L. C. Sun, C. H. Du, Q. F. Cai, Q. B. Zhang, W. J. Su y M.J. Cao. 2009. Identification of pepsinogens and pepsins from stomach of European eel (*Anguilla anguilla*). *Food Chemistry* 115: 137-142.
- Xu, X. 2000. Production of specific structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reaction. A Review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102: 287-303.
- Zambonino-Infante, J. L. y C. Cahu. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 130: 477-487.