

Actividad lipasa intracelular en bivalvos (*Argopecten purpuratus*) mediante cromatografía de capa fina-densitometría

A thin-layer chromatography-densitometry assay for intracellular lipase activity in bivalves (*Argopecten purpuratus*)

MJ Fernández-Reiriz^{1*}, U Labarta¹, JM Navarro²

¹ Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto de Investigaciones Marinas, Eduardo Cabello 6, 36208, España.

* E-mail: mjreiriz@iim.csic.es

² Instituto de Biología Marina “Dr. Jürgen Winter”, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

Resumen

Este estudio proporciona un método para la determinación de la actividad lipasa en bivalvos. Usando este método se estudió la actividad de la enzima lipasa en extractos de glándulas digestivas de *Argopecten purpuratus* alimentados con una dieta que refleja los cambios que se producen en el alimento disponible en ecosistemas naturales. El experimento se realizó durante 24–72 h. Los pectínidos fueron aclimatados a condiciones estándar siete días previos al inicio de los análisis enzimáticos. La dieta fue una mezcla de *Isochrysis galbana* y sedimento natural. La dieta de aclimatación (dieta control) tuvo 3.9 mg L⁻¹ de material particulado total y 42.5% de contenido orgánico (28% lípidos). La dieta experimental tuvo una concentración de materia particulada total de 20.8 mg L⁻¹ con un contenido orgánico del 26%, 20% de los cuales fueron lípidos. Se estudió el efecto de la dieta y el tiempo de experimentación sobre el comportamiento de la actividad lipasa. La respuesta de la lipasa intracelular a cambios en el alimento ofrecido fue importante, observándose las menores inversiones enzimáticas con la dieta experimental. El factor tiempo y la interacción entre dieta y tiempo no mostraron un efecto significativo.

Palabras clave: bivalvos, actividad lipasa, cromatografía capa fina-densitometría, ácidos grasos libres, glándula digestiva.

Abstract

This study provides a method for the determination of lipase activity in bivalves. Using this method, lipase activities were studied in extracts of digestive gland of *Argopecten purpuratus* fed a diet that mimics the food available in natural ecosystems over a short-term experiment (24–72 h). The scallops were acclimated to standard conditions seven days prior to initiating the enzymatic analysis. The diet consisted of a mixture of laboratory-cultured *Isochrysis galbana* and natural sediment. For the acclimation diet (control diet), a total particulate concentration of 3.9 mg L⁻¹ was used with an organic content of 1.7 mg L⁻¹ (42.5%), of which 28% were lipids. The experimental diet had a total particulate concentration of 20.8 mg L⁻¹ with 26% of organic content, of which 20% were lipids. The effect of diet and experimental time on lipase activity was analyzed. The response of the intracellular lipases to changes in the food offered was abrupt and lower investment in enzymatic activity was observed with the experimental diet. No significant effects were observed either for the time or for the combined diet and time interaction.

Key words: bivalves, lipase activity, thin-layer chromatography-densitometry, free fatty acids, digestive gland.

Introducción

Desde que Young (1923) detectó la amilasa en el estilo cristalino de los moluscos bivalvos, se ha registrado la presencia de varios tipos de actividad enzimática tanto en el estilo cristalino como en la glándula digestiva de bivalvos (Brock y Kennedy 1992; Ibarrola *et al.* 1999; Fernández-Reiriz *et al.* 2001, 2004; Labarta *et al.* 2002).

A pesar de la abundante información que existe sobre la distribución cualitativa y cuantitativa de las enzimas digestivas en los moluscos bivalvos, ésta se refiere casi exclusivamente a las carbohidrasas (i.e., laminarinasa, celulasas, quitinasa, xilasas, amilasa) y proteasas, siendo limitada la información sobre la actividad lipasa en los órganos digestivos de estos organismos.

Introduction

Since Yonge (1923) detected amylase in the crystalline style of bivalve molluscs, the presence of enzymatic activities in both the crystalline style and digestive gland of bivalves has been shown repeatedly (Brock and Kennedy 1992; Ibarrola *et al.* 1999; Fernández-Reiriz *et al.* 2001, 2004; Labarta *et al.* 2002).

Despite abundant information concerning the qualitative and quantitative distribution of digestive enzymes in bivalve molluscs, it almost exclusively refers to carbohydrases (i.e., laminarinase, cellulases, chitinase, xylases, amylase) and proteases. Knowledge of lipase activities in the digestive organs of bivalve molluscs is lacking.

En los bivalvos las lipasas son importantes para la digestión de ceras y triglicéridos que forman parte principalmente de los compuestos de reserva (Langdon y Newell 1996). En contraste con el trabajo pionero de Yonge (1926), en el que se consideraba que la actividad lipasa en los moluscos era totalmente intracelular, George (1952) demostró, utilizando una prueba de actividad lipasa, que en los ostiones adultos *Crassostrea virginica* el estilo era considerado una fuente importante de lipasas extracelulares. Desde entonces, Reid (1966) observó actividad lipasa en los órganos digestivos del bivalvo *Mya arenaria*, mientras que Eble (1966) reportó actividad lipasa en la glándula digestiva de *C. virginica*. Además, Mathers (1973) demostró actividad lipasa y esterasa en secciones histológicas del epitelio estomacal y el saco del estilo de *Ostrea edulis* y *Crassostrea angulata*. Los únicos datos relativos a las características fisicoquímicas de las enzimas lipolíticas en moluscos fueron presentados por Patton y Quin (1973), quienes reportaron una intensa actividad lipasa en los órganos digestivos del bivalvo *Spisula solidissima*; también observaron que la lipasa del estilo mostraba especificidad sobre la posición primaria de los triglicéridos y era capaz de hidrolizar los ésteres céricos. Otros estudios recientes incluyen análisis de actividades enzimáticas (Luna-González *et al.* 2004) usando un sistema comercial (APIZYM); sin embargo, estos análisis no se realizaron específicamente en órganos digestivos sino en homogenizados de todos los tejidos de animales enteros.

Las fluctuaciones en la composición del seston pueden originar variación en el patrón enzimático, mismo que a su vez afecta los procesos de absorción de los diferentes componentes bioquímicos de la dieta como se ha descrito en varias especies (Bayne *et al.* 1993, Ibarrola *et al.* 1996, Fernández-Reiriz *et al.* 2001, Labarta *et al.* 2002, Navarro *et al.* 2003, Fernández-Reiriz *et al.* 2004).

Este estudio tuvo como objetivo determinar y cuantificar la actividad lipasa como ácidos grasos libres por medio de cromatografía de capa delgada (TLC)-densitometría, así como identificar las condiciones óptimas para la actividad lipasa en la glándula digestiva de los bivalvos. También se estudió la respuesta de la actividad lipasa en la glándula digestiva de *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) a cambios drásticos en la dieta similares a los cambios en la disponibilidad de alimento en los ecosistemas naturales. La dieta control fue representativa de las condiciones típicas de una bahía en el sur de Chile y la dieta experimental correspondió a eventos de resuspensión de sedimento.

Material y métodos

Condiciones experimentales

Se obtuvieron especímenes de *A. purpuratus* con longitudes de concha entre 50–60 mm (1.30–2.42 g de peso seco del tejido) de un cultivo en linternas en Hueihue, Chiloé, en el sur de Chile. Los pectínidos fueron transportados a la Universidad Austral de Chile, húmedos en acuarios para su aclimatación a

Lipasas in bivalves are important for the digestion of waxes and triglycerides that are mainly present as reserve compounds (Langdon and Newell 1996). In contrast to the pioneering work of Yonge (1926), which considered that lipase activity in bivalves was wholly intracellular, George (1952) showed, using a lipase activity test, that the style was considered to be a major source of extracellular lipases in the adult oyster *Crassostrea virginica*. Thereafter, Reid (1966) noted lipase activity in the digestive organs of the bivalve *Mya arenaria*, while Eble (1966) reported lipase activity in the digestive gland of *C. virginica*. Furthermore, Mathers (1973) showed lipase and esterase activity in histological sections of the epithelium of the stomach and style sack of *Ostrea edulis* and *Crassostrea angulata*. The only data relating to the physicochemical characteristics of lipolytic enzymes were presented by Patton and Quin (1973), who reported elevated lipase activity in the digestive organs of the bivalve *Spisula solidissima*. They also observed that the style lipase showed specificity for the primary position of the triglycerides and was capable of hydrolyzing wax esters. Other recent studies include semi-quantitative analyses of enzymatic activities (Luna-González *et al.* 2004) using a commercial kit (APIZYM); however, these analyses were not carried out specifically on digestive organs, but in homogenates of the whole animal.

Fluctuations in the seston composition may lead to a variation in the enzymatic pattern, which could in turn affect the absorption processes of different biochemical components of the diet, as described for various species (Bayne *et al.* 1993, Ibarrola *et al.* 1996, Fernández-Reiriz *et al.* 2001, Labarta *et al.* 2002, Navarro *et al.* 2003, Fernández-Reiriz *et al.* 2004).

This study aimed to determine and quantify the lipase activity as free fatty acids by thin-layer chromatography (TLC)-densitometry, and also to identify the optimum conditions for lipase activity in the digestive gland of bivalves. The response of the lipase activity in the digestive gland of *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) to acute changes in diet that mimic changes in the food available in natural ecosystems was also studied. The control diet was representative of the typical conditions of a bay in southern Chile and the experimental diet corresponded to sediment resuspension events.

Material and methods

Experimental conditions

Specimens of *A. purpuratus* measuring 50–60 mm in shell length (1.30–2.42 g dry tissue weight) were obtained from lantern culture in Hueihue, Chiloé, southern Chile. The scallops were transported to the Universidad Austral de Chile under moist conditions and placed in aquaria for acclimation to standard conditions with a control diet for seven days. Twenty individuals were maintained in each aquarium ($n = 3$), containing 30 L of seawater at 15°C and salinity of 30‰; the water

condiciones estándares con una dieta control por siete días. En cada acuario ($n = 3$) con 30 L de agua de mar a 15°C y salinidad de 30‰ se mantuvieron veinte individuos, con recambios de agua cada 48 h. Después de su aclimatación, se suministró a diez individuos de cada acuario la dieta experimental durante 72 h, mientras que los otros diez individuos siguieron alimentándose de la dieta control durante el mismo periodo. Después de 24 y 72 h se muestrearon *A. purpuratus* control y experimentales, diseccionando y liofilizando sus glándulas digestivas.

La dieta consistió en una mezcla de *Isochrysis galbana* cultivada en laboratorio y sedimento natural. Para la dieta de aclimatación (dieta control) se utilizó una concentración total particulada de 3.9 mg L⁻¹, con un contenido orgánico de 1.7 mg L⁻¹ (42.5%) compuesto de 54.9% (0.9 mg L⁻¹) de proteínas, 16.8% (0.3 mg L⁻¹) de carbohidratos y 28.3% (0.5 mg L⁻¹) de lípidos. La dieta experimental tuvo una concentración total de partículas de 20.8 mg L⁻¹, con un contenido orgánico de 5.4 mg L⁻¹ (26.0%) compuesto de 51.6% (2.8 mg L⁻¹) de proteína, 28.3% (1.5 mg L⁻¹) de carbohidratos y 20.0% (1.1 mg L⁻¹) de lípidos.

La composición bioquímica de la dieta fue determinada de la siguiente manera: las proteínas se determinaron por el método descrito por Lowry *et al.* (1951) tras hidrólisis alcalina con NaOH 0.5 N a 30°C; los carbohidratos se cuantificaron en términos de glucosa usando el método fenol-sulfúrico (Strickland y Parsons 1972); y los lípidos se extrajeron utilizando el método de Bligh y Dyer (1957) modificado (Fernández-Reiriz *et al.* 1989).

Ensayo de enzimas *in vitro*

Se realizaron ensayos preliminares en otro grupo de pectínicos considerando como parámetros la concentración del tejido, el pH, el tiempo de incubación y la temperatura.

Dado lo reducido del tamaño de la glándula digestiva, se realizaron estudios preliminares para determinar la concentración óptima de tejido que garantizara la correcta cuantificación de la actividad lipasa con relación a los límites de detección del método. Dicha concentración fue fijada en 1.5 mg mL⁻¹.

Para la determinación del perfil de actividad del pH se llevaron a cabo ensayos de actividad lipasa total a diferentes pH que variaron entre 4.0 y 8.5. La figura 1 muestra la gran dependencia de la actividad lipasa del pH, observándose la actividad óptima a pH de 7.2 mantenido durante los primeros 60 min (tiempo óptimo de incubación).

Para la determinación del perfil temperatura-actividad se realizaron ensayos de actividad lipasa total a temperaturas que variaron entre 0°C y 70°C, con incrementos de 10°C y a un pH constante de 7.2. Se encontró que la temperatura óptima para la actividad lipasa en la glándula digestiva de *A. purpuratus* es de 30°C (fig. 1).

Las glándulas digestivas liofilizadas fueron homogeneizadas en frío en una solución tamponada de fosfato-citrato 0.01 M

was changed every 48 h. After acclimation, ten individuals from each aquarium were offered the experimental diet during 72 h, while the other ten individuals were continued to be fed the control diet for the same period. After 24 and 72 h, control and experimental individuals of *A. purpuratus* were sampled, and their digestive glands were dissected and freeze-dried.

The diet was a mixture of laboratory-cultured *Isochrysis galbana* and natural sediment. For the acclimation diet (control diet), a total particulate concentration of 3.9 mg L⁻¹ was used with an organic content of 1.7 mg L⁻¹ (42.5%), composed of 54.9% (0.9 mg L⁻¹) protein, 16.8% (0.3 mg L⁻¹) carbohydrate and 28.3% (0.5 mg L⁻¹) lipid. The experimental diet had a total particulate concentration of 20.8 mg L⁻¹ with an organic content of 5.4 mg L⁻¹ (26.0%), composed of 51.6% (2.8 mg L⁻¹) protein, 28.3% (1.5 mg L⁻¹) carbohydrate and 20.0% (1.1 mg L⁻¹) lipid.

The biochemical composition of the diet was ascertained according to the following methodology. Proteins were determined using the method described by Lowry *et al.* (1951) after alkaline hydrolysis with NaOH 0.5 N at 30°C. Carbohydrates were quantified as glucose using the phenol-sulphur method (Strickland and Parsons 1972). Lipids were extracted according to a modified Bligh and Dyer (1957) method (Fernández-Reiriz *et al.* 1989).

In vitro enzyme assay

Preliminary assays were performed on another group of scallops, establishing the following parameters: tissue concentration, pH, incubation time and temperature.

Given the reduced size of the digestive glands, preliminary studies were carried out to establish the optimum tissue concentration, which guarantees the correct quantification of lipase activity in relation to the detection limits of the method. This concentration was fixed at 1.5 mg mL⁻¹.

For the determination of the pH-activity profile, assays for total lipase activity were carried out at various pH ranging from 4.0 to 8.5. Figure 1 shows the strong dependence of lipase activity on pH, with the optimum activity observed at a pH of 7.2 and maintained for the first 60 min (optimum incubation time).

To determine the temperature-activity profile, assays for total lipase activity were carried out at temperatures ranging from 0°C to 70°C, with increments of 10°C and a constant pH of 7.2. A temperature optimum of 30°C was found for lipase activity in the digestive gland of *A. purpuratus* (fig. 1).

The freeze-dried digestive glands were cold-homogenized in a 0.01 M phosphate-citrate buffer (containing NaCl 20 mM) at pH 6.9. The enzyme extracts were immediately centrifuged at 15,938 g for 20 min and the supernatant was used for *in vitro* enzyme assays.

The protein content of the digestive extracts was determined according to the method described in Lowry *et al.* (1951) using bovine serum albumin as standard.

(con NaCl 20 mM) a pH 6.9. Los extractos de enzimas fueron centrifugados inmediatamente a 15938 g durante 20 min y el sobrenadante resultante se utilizó para los ensayos *in vitro*.

El contenido proteico de los extractos digestivos se determinó siguiendo el método descrito por Lowry *et al.* (1951) utilizando suero de albúmina de bovino como estándar.

La actividad lipasa total se determinó de acuerdo al método de Tietz y Fiereck (1996) modificado, el cual se basa en la medición de los ácidos grasos que resultan liberados mediante la hidrólisis enzimática de los triglicéridos presentes en una solución estabilizada de aceite de oliva.

El arreglo experimental utilizado consistió en una emulsión de aceite de oliva (comercial, con 0.4 de acidez), preparada diariamente justo antes del análisis, con una mezcla de 5.25% de goma arábiga en una solución de NaCl al 0.89% en agua destilada, emulsión que fue formada al sonicarse el aceite de oliva por la acción de la goma arábiga:NaCl y que sirvió como sustrato para la actividad lipasa. A esta emulsión se agregó taurocolato de sodio 10 mM, CaCl 0.5 M y Tris-HCl 1 M.

Con el fin de seguir la reacción, se mezclaron 0.1 mL de extracto digestivo, 0.5 mL de emulsión de aceite de oliva, 0.05 mL de taurocolato de sodio, 0.022 mL de CaCl y 0.45 mL de Tris-HCl y se incubaron a 30°C en un baño de agua circulante. El tiempo de incubación fue de 60 min, después de los cuales se detuvo la reacción (1 min a 100°C) y se enfrió la mezcla, agregándole además 5 mL de cloroformo. Tras centrifugarla 10 min a 2853 g se recuperó la capa orgánica que se almacenó a -70°C para su análisis dentro de los siguientes 30 días (de acuerdo con estudios preliminares no publicados). La actividad lipasa fue determinada como ácidos grasos libres mediante TLC-densitometría.

Para el análisis cuantitativo de los ácidos grasos libres se utilizaron placas de sílica gel 60 W (Merck 16486) de 20 × 20 cm, y un espesor de capa de 0.25 mm. Las muestras fueron aplicadas con un dosificador TLC automático (Camag 27220). Las tinciones cromatográficas se hicieron de acuerdo con lo descrito por Freeman y West (1966). Las placas se tñeron con una solución de CuSO₄ al 10% en H₃PO₄ al 0.85%, calentándolas a 180°C. Para el análisis cuantitativo se utilizó como estándar ácido oléico a una concentración de 0.7 mg mL⁻¹, utilizando $y = 23494.1x - 1165.7$ ($r = 0.999$) como la función que relaciona la respuesta del detector (y) y la concentración de ácido oléico (x). Las placas se escanearon con un densitómetro Shimadzu CS900, usando un rayo monocromático de 370 nm y 0.4 × 0.4 mm en zigzag. Toda la tinción fue leída calibrando para la corrección de línea base, de acuerdo con Fernández-Reiriz *et al.* (1999).

Todos los solventes, reactivos y estándares de ácidos grasos fueron de grado analítico (E. Merck, Darmstadt, y Sigma Chemical Co.).

Los resultados de actividad lipasa se expresaron en términos de actividad específica: $Lsp = (\text{mg producto final liberado})/(\text{mg proteína h})$, donde el producto final son los ácidos grasos. La actividad lipasa total de la glándula digestiva se reportó como: $LGD = (\text{mg producto final liberado})/(\text{mg órgano})$

Total lipase activity was determined according to a modified method of Tietz and Fiereck (1966), which is based on the measurement of free fatty acids released by enzymatic hydrolysis of triglycerides present in a stabilized emulsion of olive oil.

The assay system consisted of a commercial olive oil emulsion (acidity 4.0) prepared daily right before the analysis, with a mixture of 5.25% arabic gum in a solution of 0.89% NaCl in distilled water; this emulsion was formed by sonifying the olive oil with gum arabic:NaCl and was used as substrate for the lipase activity. To this emulsion, 10 mM sodium taurocholate, 0.5 M CaCl and 1 M Tris-HCl were added.

In order to follow the reaction, 0.1 mL of digestive extract, 0.5 mL of olive oil emulsion, 0.05 mL of sodium taurocholate, 0.022 mL of CaCl and 0.45 mL of Tris-HCl were mixed together and incubated at 30°C in a circulating water bath. The incubation time was 60 min, after which the reaction was stopped (1 min at 100°C), the mixture cooled and 5 mL chloroform were added. After centrifugation (10 min at 2853 g) the organic layer was recovered and stored at -70°C for later analysis within 30 days (according to unpublished preliminary studies). Lipase activity was determined as free fatty acid by TLC-densitometry.

For the quantitative analysis of free fatty acids, silica gel 60 W plates (Merck 16486), with dimensions of 20 × 20 cm and a layer thickness of 0.25 mm, were used. Samples were applied by an automatic TLC sampler (Camag 27220). The chromatographic stain was made according to Freeman and West (1966). The plates were stained with a 10% CuSO₄ solution in 0.85% H₃PO₄ by heating to 180°C. For the quantitative analysis, oleic acid was used as a standard at a concentration of 0.7 mg mL⁻¹, utilizing $y = 23494.1x - 1165.7$ ($r = 0.999$) as the function relating the detector response (y) and the oleic acid concentration (x). The plates were scanned with a Shimadzu CS9000 densitometer, using a monochromatic beam of 370 nm and 0.4 × 0.4 mm working in zigzag mode. The whole spot was read with auto-zeroing for baseline correction according to Fernández-Reiriz *et al.* (1999).

All the solvents, reagents and fatty acid standards used were of analytical grade (E. Merck, Darmstadt, and Sigma Chemical Co.).

The results of lipase activity were expressed in terms of specific activity: $Lsp = (\text{mg end product released})/(\text{mg protein h})$, where free fatty acids correspond to the end product. Total activity of the digestive gland was reported as: $LGD = (\text{mg end product released})/(\text{mg whole digestive organ h})$. The dry weight of the digestive organs was standardized to an equivalent of 1000 mg dry weight individuals: $Ys = (1000/We)^b Ye$, where Ys is the standardized dry weight of the organ, Ye is the experimental dry weight of the organ, We is the total dry weight of the experimental scallop, and b is the weight-specific exponent relating the weight of the digestive organs to the weight of the complete specimen ($b = 0.8125$ for the digestive gland of *A. purpuratus*).

digestivo entero h). El peso seco de los órganos digestivos se estandarizó a un equivalente a 1000 mg de peso seco de organismos enteros: $Y_s = (1000/We)^b Y_e$, donde Y_s es el peso seco estandarizado del órgano, Y_e es el peso seco experimental del órgano, We es el peso seco total del organismo experimental, y b es el exponente peso-específico que relaciona el peso de los órganos digestivos con el peso del espécimen entero (para la glándula digestiva de *A. purpuratus* $b = 0.8125$).

Análisis estadístico

Se confirmó la homogeneidad de varianza mediante una prueba de Bartlett y se realizó un análisis de varianza multivariado (MANOVA) con el fin de determinar el efecto de la dieta y el tiempo de experimentación sobre la actividad enzimática. También se compararon las diferentes dietas y tiempos de experimentación mediante ANOVA, y cuando se presentaron diferencias significativas se realizaron comparaciones de medias aplicando pruebas de Tukey con un nivel de significancia de $P < 0.05$ (Snedecor y Cochran 1980, Zar 1984).

Resultados

Ni las dietas ni el tiempo de experimentación tuvieron un efecto significativo en el peso seco o la proteína soluble de la glándula digestiva de *A. purpuratus*. La dieta mostró un efecto significativo sobre las actividades lipasa específica y total, explicando en ambos casos 58% de la varianza. No se detectaron efectos significativos asociados al tiempo de experimentación o a la interacción de dieta y tiempo (tabla 1, ANOVA de dos vías)

No se detectaron diferencias significativas en la actividad lipasa en función del tiempo de experimentación (tabla 2, $P > 0.05$); sin embargo, tanto la actividad lipasa específica como la total mostraron diferencias significativas entre la dieta experimental y la control, siendo los valores significativamente menores ($P < 0.05$) cuando *A. purpuratus* se alimentó de la dieta experimental.

Discusión

Los intervalos de pH en los que se alcanza la máxima actividad enzimática son una característica química importante de cada enzima. El pH óptimo puede variar no sólo de una especie a otra sino también entre poblaciones, variabilidad que se puede explicar principalmente por la naturaleza heterogénea de las enzimas digestivas. Sin embargo, como lo explicó Koopmans (1970), parte de esta variabilidad puede ser de origen metodológico.

En este estudio, los resultados de tiempo de incubación y temperatura tuvieron una respuesta lineal cuando se trabajó a un pH óptimo (7.2) a 30°C durante los primeros 60 min. Los resultados de actividad lipasa mostraron que la actividad enzimática fue mínima entre 0°C y 20°C.

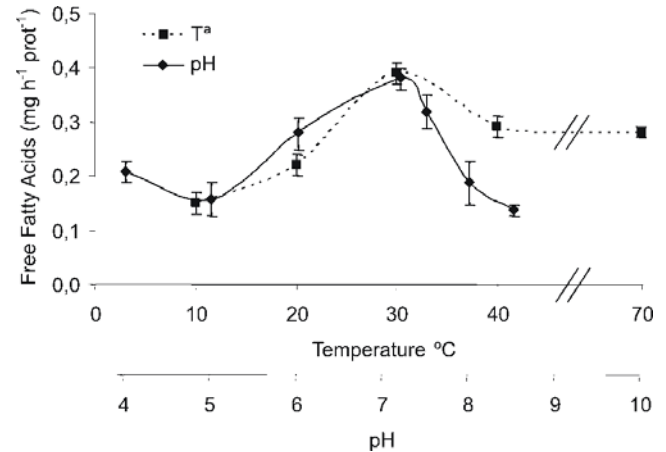


Figura 1. Actividad lipasa en la glándula digestiva de *Argopecten purpuratus* en respuesta a las variaciones en pH y temperatura. Valores expresados como promedios \pm DE.

Figure 1. Lipase activity in the digestive gland of *Argopecten purpuratus* in response to variations in pH and temperature. Values are expressed as means \pm SD.

Statistical analysis

Homogeneity of variance was confirmed by means of Bartlett's test. A multivariate analysis of variance (MANOVA) was performed to determine the effect of diet and experimental time on enzymatic activity. Comparisons between different diets and experimental time were also carried out by ANOVA, and when significant differences were found, comparisons of means were done applying a Tukey test with a significance level of $P < 0.05$ (Snedecor and Cochran 1980, Zar 1984).

Results

The diets and experimental time had no significant effect on the dry weight and soluble protein of the digestive gland of *A. purpuratus*. The diet showed a significant effect with regard to specific and total lipase activity, and explained 58% of the variance in both cases. No significant effects associated with experimental time and the combined interaction of diet and time were detected (table 1, two-way ANOVA).

No significant differences in lipase activity were detected with experimental time (table 2, $P > 0.05$); however, specific and total lipase activity showed significant differences between experimental and control diets. Values were significantly lower ($P < 0.05$) when *A. purpuratus* was fed the experimental diet.

Discussion

The pH ranges in which the maximum activities of enzymes are reached are an important chemical characteristic of each type of enzyme. The optimum pH may vary not only among different species but also among different populations, a variability that can be explained mainly by the heterogeneous

Tabla 1. Resultados del ANOVA de dos vías para probar las actividades lipasa específica y total en la glándula digestiva de *Argopecten purpuratus*.
Table 1. Results of the two-way ANOVA testing the specific and total activity in the digestive gland of *Argopecten purpuratus*.

| Source | Specific activity | | | | Total activity | | | |
|---------------------|-------------------|----|-------------|-----------|----------------|----|-------------|-----------|
| | Sum of square | df | Mean square | F ratio | Sum of square | df | Mean square | F ratio |
| Organ weight | | | | | | | | |
| Diet | 475.789 | 1 | 475.789 | 3.406 ns | | | | |
| Time | 121.190 | 1 | 121.190 | 0.867 ns | | | | |
| Diet × time | 1168.786 | 1 | 1168.786 | 8.366 ns | | | | |
| Error | 1117.605 | 11 | 139.701 | | | | | |
| Protein | | | | | | | | |
| Diet | 6.569 | 1 | 6.569 | 2.777 ns | | | | |
| Time | 23.192 | 1 | 23.192 | 9.803 ns | | | | |
| Diet × time | 1.950 | 1 | 1.950 | 0.824 ns | | | | |
| Error | 26.024 | 11 | 2.366 | | | | | |
| Lipase | | | | | | | | |
| Diet | 0.007 | 1 | 0.007 | 20.085*** | 2.674 | 1 | 2.674 | 16.363*** |
| Time | 0.001 | 1 | 0.001 | 2.134 ns | 0.023 | 1 | 0.023 | 0.143 ns |
| Diet × time | 0.000 | 1 | 0.000 | 0.492 ns | 0.094 | 1 | 0.094 | 0.575 ns |
| Error | 0.004 | 11 | 0.000 | | 1.798 | 11 | 0.163 | |

ns, not significant; *** $P < 0.001$

Tabla 2. Actividad enzimática específica (Lsp) y total en la glándula digestiva (LGD) de *Argopecten purpuratus*.
 GDW = peso seco de la glándula digestiva, GDp = proteína de la glándula digestiva y L = lipasa.

Table 2. Specific enzyme activity (Lsp) and total enzyme activity in the digestive gland (LGD) of *Argopecten purpuratus*. GDW = digestive gland dry weight, GDp = digestive gland protein and L = lipase.

| | Control diet | | Experimental diet | |
|-----|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | 24 h | 72 h | 24 h | 72 h |
| GDW | 125.59 ± 6.29 ^a | 133.01 ± 16.00 ^a | 150.68 ± 8.84 ^a | 132.05 ± 17.38 ^a |
| GDp | 0.184 ± 0.009 ^a | 0.164 ± 0.007 ^a | 0.174 ± 0.009 ^a | 0.156 ± 0.004 ^a |
| Lsp | 0.102 ± 0.020 ^a | 0.123 ± 0.025 ^a | 0.063 ± 0.011 ^b | 0.071 ± 0.021 ^b |
| LGD | 2.397 ± 0.468 ^a | 2.480 ± 0.321 ^a | 1.679 ± 0.384 ^b | 1.432 ± 0.187 ^b |

Values are given as means ± SD.

Means within the same row with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

Desde un punto de vista conceptual, el método incrementa el conocimiento del papel que juega el conjunto de enzimas (carbohidrasas, proteasas y lipasas) en los órganos digestivos de los moluscos bivalvos. Fernández-Reiriz *et al.* (2004) demostraron que el complejo celulasa es la enzima más importante en la glándula digestiva y el estilo cristalino de *A. purpuratus*. Los resultados de esta investigación revelaron que las carbohidrasas (i.e. amilasa, laminarina y celulasa) muestran mayor actividad que las lipasas, siendo estas últimas las enzimas dominantes respecto a la actividad proteasa.

Fernández-Reiriz *et al.* (2001) y Labarta *et al.* (2002) mostraron que la inversión en recursos enzimáticos en los moluscos bivalvos (*Mytilus chilensis* y *Mulinia edulis*) era un

nature of the digestive enzymes. However, as suggested by Koopmans (1970), part of this variability may be of a methodological nature.

In the present study, the results of incubation time and temperature followed a linear response when performed at the optimum pH (7.2) and maintained for the first 60 min at 30°C. The results of lipase activity showed that enzymatic activity was minimal between 0°C and 20°C.

From a conceptual standpoint, the method increases the knowledge of the role that the enzymatic pool (carbohidrasas, proteasas and lipasas) plays in the digestive organs of bivalve molluscs. Fernández-Reiriz *et al.* (2004) have shown that the cellulase complex was the most important enzyme in the

mecanismo para optimizar la obtención de energía ante variaciones en el régimen alimenticio durante la respuesta a la aclimatación. Este cambio en la actividad enzimática ocurre tanto en el estilo cristalino como en la glándula digestiva, y depende no sólo de factores endógenos (historial alimenticio) sin también de factores exógenos (régimen trófico) así como de la interacción entre ambos.

En una investigación previa y considerando el equipamiento enzimático (amilasa, laminarina, celulosa y proteasa) y el balance asimilatorio por *A. purpuratus*, se obtuvieron valores más elevados de ingestión de proteínas y lípidos con la dieta control (con valores bajos de carga de seston) (Fernández-Reiriz *et al.* 2004); sin embargo, la ingestión de carbohidratos fue significativamente más baja. Con respecto a las eficiencias en la absorción (AEs) de componentes bioquímicos por *A. purpuratus*, las diferencias estuvieron relacionadas no sólo con la dieta disponible sino también, en el caso de la AE de lípidos, con el tiempo de exposición a la dieta experimental. La estabilidad de este último parámetro fisiológico usando la dieta control (0.61) contrasta con su acusada disminución después de alimentar a *A. purpuratus* por 24 h con la dieta experimental (0.42). Después de 72 h se observó una recuperación (0.61) en este parámetro, la cual pudiera ser interpretada en términos de adaptación a la nueva dieta. Con respecto a la AE de lípidos, se han descrito pérdidas fecales endógenas asociadas con dietas con concentraciones de una elevada carga total de material particulado (TPM), tal y como Navarro *et al.* (2003) observaron en *Mytilus* y *Mulinia*. Tomando en cuenta las tasas de ingestión (IR) y AE de lípidos, las tasas de absorción (ARs) de *A. purpuratus* fueron superiores con la dieta control (1.08 mg h^{-1}) con respecto a las obtenidas con la dieta experimental (0.43 mg h^{-1}). Después de 72 h, con la dieta experimental, se observó una recuperación parcial de la AR (0.75 mg h^{-1}), aunque nunca se alcanzaron los valores obtenidos con la dieta control.

Los resultados obtenidos para AE y AR de los lípidos usando la dieta control podrían estar asociados a la actividad lipasa en la glándula digestiva. Con relación a lo observado con la dieta experimental, los resultados obtenidos para la asimilación de lípidos (AE y AR) no pueden ser explicados totalmente con base en el comportamiento de la actividad lipasa en la glándula dado que a pesar de que no se encontraron diferencias significativas en esta actividad entre ambos tiempos de experimentación, se observó una recuperación de la AE de lípidos transcurridas 72 h, así como de la AR aunque la de ésta fue de menor magnitud. Este hecho puede estar relacionado con las pérdidas fecales endógenas descritas con dietas de elevada TPM o con procesos vinculados a la actividad lipasa en el estilo cristalino, órgano en el que se ha reportado gran actividad lipasa para *Crassostrea virginica* (Langdon y Newell 1996).

Cuando *A. purpuratus* ha sido expuesta a variaciones cortas en la disponibilidad de alimento, se ha observado que altos valores de selección preingestiva han equilibrado las IRs orgánicas de pectínidos a los que se ha suministrado una dieta

digestiva y glándula cristalina de *A. purpuratus*. The results of the present survey reveal that carbohydrases (i.e., amylase, laminarinase and cellulase) show higher activity than lipases, the latter enzymes being dominant with regard to protease activity.

Fernández-Reiriz *et al.* (2001) and Labarta *et al.* (2002) showed that an investment in enzyme resources in bivalve molluscs (*Mytilus chilensis* and *Mulinia edulis*) was a mechanism for optimizing energy gain with variations in food regime during the acclimatized response. This change in enzymatic activity takes place both in the crystalline style and digestive gland, and depends not only on endogenous factors (past feeding history) but also on exogenous factors (trophic regime), as well as on their interaction.

In a previous survey and considering the enzymatic equipment (amylase, laminarinase, cellulase and protease) and assimilatory balance of *A. purpuratus*, higher values for the ingestion of protein and lipids were obtained with the control diet (low values of seston load) (Fernández-Reiriz *et al.* 2004); however, ingestion of carbohydrates was significantly lower. With regard to absorption efficiencies (AE) of biochemical components in *A. purpuratus*, differences were related not only to the available diet but also, in the case of lipid AE, to exposure time of the experimental diet. The stability of the latter physiological parameter using the control diet (0.61) contrasts with the sharp decrease after 24 h in feeding of *A. purpuratus* with the experimental diet (0.42). After 72 h, a recovery of the latter parameter (0.61) was observed that can be interpreted in terms of adaptation to the new diet. With regard to lipid AE, the endogenous faecal losses associated with high total particulate matter (TPM) concentration diets, as observed in *Mytilus* and *Mulinia*, have been described (Navarro *et al.* 2003). Taking into account ingestion rates (IR) and AE of lipids, absorption rates (AR) of *A. purpuratus* were higher with the control diet (1.08 mg h^{-1}) relative to those obtained with the experimental diet (0.43 mg h^{-1}). A partial recovery of AR was observed after 72 h with the experimental diet (0.75 mg h^{-1}), though the values obtained with the control diet were not reached.

The results obtained for the AE and AR of lipids using the control diet might be associated with lipase activity in the digestive gland. Regarding the results obtained with the experimental diet, those concerning the assimilation of lipids (AE and AR) cannot be fully explained based on the behaviour of lipase activity in the gland because, while significant differences were not found in such activity between both experimental times, we observed a recovery of AE in lipids at 72 h, as well as of AR but at a lower magnitude. The latter fact can be related to faecal endogenous losses described in diets with high TPM values or with processes linked to lipase activity in the crystalline style, organ that has been reported to present high lipase activity in *Crassostrea virginica* (Langdon and Newell 1996).

When *A. purpuratus* was exposed to short-term variations in food availability, high values of pre-ingestive selection

de bajo contenido orgánico (Navarro *et al.* 2004). Sin embargo, el comportamiento enzimático durante el tiempo experimental del presente estudio (72 h) no permite el equilibrio de procesos digestivos que afectan la incorporación de energía en esta especie, tal y como ha sido observado por Fernández-Reiriz *et al.* (2004) en el caso de las proteasas y las carbohidrasas, comportamiento que de acuerdo a los resultados del presente estudio parece ampliarse a las lipasas en la glándula digestiva.

Agradecimientos

Los autores agradecen a R Munilla y JL Garrido su ayuda con los procedimientos analíticos y sus valiosas sugerencias, y a G Urrutia (UACH-Chile), L Nieto, B González y A Ayala (CSIC-España) por la asistencia técnica en el laboratorio. Este estudio se realizó con el apoyo financiero de MYCIT REN 2001-0501/MAR (España) y FONDECYT 1000427 (Chile), y del Programa de Cooperación Científica Internacional (PCCI), CSIC/CONICYT (No. 2003 CL 0030).

Traducido al español por Manuel Gardea-Ojeda.

Referencias

- Bayne BL, Iglesias JIP, Hawkins AJS, Navarro E, Heral M, Delous-Paoli JM. 1993. Feeding behavior of the mussel *Mytilus edulis*: Responses to variations in quality and organic content of the seston. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 73: 813–829.
- Bligh EJ, Dyer WJ. 1957. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911–917.
- Brock V, Kennedy VS. 1992. Quantitative analysis of crystalline style of carbohydrases in five suspension and deposit feeding bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 159: 51–58.
- Eble AF. 1966. Some observations on the seasonal distribution of neglected enzymes in the American oyster as revealed by enzyme histochemistry. *Proc. Natl. Shellfish Assoc.* 56: 37–42.
- Fernández-Reiriz MJ, Pérez-Camacho A, Ferreiro MJ, Blanco J, Planas M, Campos MJ, Labarta U. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture* 83: 17–37.
- Fernández-Reiriz MJ, Labarta U, Albentosa M, Pérez-Camacho A. 1999. Lipid profile and growth of the clam spat, *Ruditapes decussatus* (L), fed with microalgal diets and cornstarch. *Comp. Biochem. Physiol.* 124B: 309–318.
- Fernández-Reiriz MJ, Labarta U, Navarro JM, Velasco A. 2001. Enzymatic digestive activity in *Mytilus chilensis* (Hupé, 1854) in response to food regimes and past feeding history. *J. Comp. Physiol.* 171B: 449–456.
- Fernández-Reiriz MJ, Labarta U, Navarro JM. 2004. Feeding and digestive response of *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) to short-term variation in food quality and quantity. *Aquaculture* 237: 347–364.
- Freeman CP, West D. 1966. Complete separation of lipid classes on a single thin-layer plate. *J. Lipid Res.* 7: 324–327.
- George WC. 1952. The digestion and absorption of fat in lamellibranchs. *Biol. Bull.* 102: 118–127.
- Ibarrola I, Iglesias JIP, Navarro E. 1996. Differential absorption of biochemical components in the diet of the cockle *Cerastoderma edule*: Enzymatic responses to variations in seston composition. *Can. J. Zool.* 74: 1887–1897.
- Ibarrola I, Navarro E, Iglesias JIP, Urrutia MB. 1999. Time-course of digestive-enzyme acclimation in the cockle *Cerastoderma edule*. *Mar. Biol.* 135: 47–56.
- Koopmans JJC. 1970. Cellulase in molluscs. I. The nature of cellulases in *Helix pomatia* and *Cardium edule*. *Neth. J. Zool.* 20: 445–463.
- Labarta U, Fernández-Reiriz MJ, Navarro JM, Velasco A. 2002. Enzymatic digestive activity in epifaunal (*Mytilus chilensis*) and infaunal (*Mulinia edulis*) bivalves in response to changes in food regimes in a natural environment. *Mar. Biol.* 140: 669–676.
- Langdon CJ, Newell RIE. 1996. Digestion and nutrition in larvae and adults. In: Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF (eds.), *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Book, Univ. of Maryland, College Park, pp. 231–269.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the pholin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275.
- Luna-González A, Maeda-Martínez A, Ascensio-Valle AF, Robles-Mungaray M. 2004. Ontogenetic variations of hydrolytic enzymes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 16: 287–294.
- Mathers NF. 1973. A comparative histochemical survey of enzymes associated with the process of digestion in *Ostrea edulis* and *Crassostrea angulata* (Mollusca: Bivalvia). *J. Zool.* 169: 169–179.
- Navarro JM, Labarta U, Fernández-Reiriz MJ, Velasco A. 2003. Feeding behavior and differential absorption of biochemical components by the infaunal bivalve *Mulinia edulis* and the epibenthic *Mytilus chilensis* in response to changes in food regimes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 287: 13–35.
- Navarro J, Fernández-Reiriz MJ, Labarta U. 2004. Short-term feeding response of the scallop *Argopecten purpuratus* exposed to two different diets. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 84: 775–779.
- Patton JS, Quin JG. 1973. Studies on the digestive lipase of the surf clam *Spisula solidissima*. *Mar. Biol.* 21: 59–69.
- Reid RGB. 1966. Digestive tract enzymes in the bivalves *Lima hians* Gmelin and *Mya arenaria* L. *Comp. Physiol.* 17: 417–433.

Acknowledgements

The authors thank R Munilla and JL Garrido for their help with the analytical procedures and valuable suggestions, and G Urrutia (UACH-Chile), L Nieto, B González and A Ayala (CSIC-Spain) for technical assistance in the laboratory. This study was carried out with financial support from grants MICYT REN 2001-0501/MAR (Spain) and FONDECYT 1000427 (Chile), and the International Scientific Cooperation Program (PCCI), CSIC/CONICYT (No. 2003 CL 0030).

- Snedecor GW, Cochran WG. 1980. Statistical Methods. Iowa State Univ. Press, Ames, 507 pp.
- Strickland JDH, Parsons TR. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. 2nd ed. Bull. Fish. Res. Bd. Canada 167, 310 pp.
- Tietz NW, Fiereck EA. 1966. A specific method for serum lipase determination. Clin. Chim. Acta 13: 352–355.
- Yonge CM. 1923. Studies on the comparative physiology of digestion. 1. The mechanism of feeding, digestion and assimilation in the Lamellibranch *Mya*. Br. J. Exp. Biol. 1: 15–63.
- Yonge CM. 1926. Structure and physiology of the organs of feeding and digestion in *Ostrea edulis*. J. Mar. Biol. Assoc. UK 14: 295–386.
- Zar JH. 1984. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 718 pp.

*Recibido en noviembre de 2005;
aceptado en marzo de 2006*