



Facultad de Ciencias
División de Estudios de Posgrado

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA
DIGESTIVA DEL CAMARON CAFE DEL PACIFICO

Penaeus californiensis

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

EN BIOLOGIA ANIMAL

PRESENTA

FERNANDO VEGA VILLASANTE

DIRECTORES:

DR. HECTOR G. NOLASCO SORIA
DR. ROBERTO CIVERA CERECEDO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D.F.

1998

263216



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



00343
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Ciencias
División de Estudios de Posgrado

14
24.

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA
DIGESTIVA DEL CAMARON CAJE DEL PACÍFICO
*Penaeus californiensis***

**TUTORES DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS:**

***DRA. MARIA LUISA FANJUL-MOLES
DR. ALFONSO TORRE BLANCO
DR. RENE CARDENAS VAZQUEZ***

A LICHO

Madre, hermana, amiga.

"En el desierto, en mi casa, entre las piedras calentadas por el sol, entre las espinas de los cactus y entre las arenas humedecidas por el mar, se gesta la magia de los dioses. Y aunque algunos traten de acallar su futuro recuerdo, a los dioses del desierto serán dedicadas ofrendas que mi mente hoy no entendería"

Kamé (Indígena Pericú, 1600-?)

Dedico esta tesis a

LOS DIOSES DEL DESIERTO

Fernando Vega Villasante (1963-?)

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por darme las facilidades para mi desarrollo académico y humano.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México por darme cobijo en su programa de posgrado.

A mis directores y amigos: Roberto y Hector, por su dirección, paciencia y confianza.

A mis tutores Dra. Maria Luisa Fanjul, Dr. Alfonso Torre Blanco, Dr. René Cárdenas Vázquez, por su sugerencias y comentarios.

Al Dr. Alfredo Ortega por hacer posible esta Maestría.

A Margarita Collazo por hacer más fácil lo que parecía imposible.

A mi familia: Heidi, Marifer y Diego, por su apoyo y amor.

A Pedro por mostrarme la fuerza y a Beba por su ejemplo.

A Pedro padre por enseñarme a encontrar la razón dentro de la sinrazón.

A mis amigos de Biología Experimental (Ernesto, Sonia, Dariel, Guero, Tere, Teté, Sergio, Kitty, etc.) por las horas pasadas dentro y fuera del CIB.

A mis queridos amigos cubanos por su sincera amistad y por abrirme las puertas de la Universidad de La Habana.

A Elizabeta y a Dios por darme la vida.

A mi península de Baja California por adoptarme.

INDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCION.....	3
2. ANTECEDENTES.....	7
2.1 La digestión en los crustáceos decápodos.	
2.2 La diferenciación celular del hepatopáncreas y su relación con la digestión y producción de enzimas digestivas.	
2.3 El estudio de las proteasas digestivas en el camarón.	
2.4 El estudio de las amilasas digestivas en el camarón.	
2.5 Estudio del efecto de la dieta en las enzimas digestivas del camarón.	
3. JUSTIFICACION.....	21
4. HIPOTESIS.....	23
5. OBJETIVOS.....	23
6. MATERIALES Y METODOS.....	24
6.1 Materiales y métodos generales	
6.2 Determinación de la actividad proteolítica general y específica presente en el tracto digestivo del camarón café.	
6.3 Determinación de la actividad amilolítica presente en el tracto digestivo del camarón café.	
6.4 Determinación de la actividad proteolítica y amilolítica asociada al tracto digestivo de camarón café alimentado con dietas artificiales.	

7.	RESULTADOS.....	39
7.1	Actividad proteolítica asociada al tracto digestivo de <i>P. californienis</i>.	
7.2	Actividad amilolítica asociada al tracto digestivo de <i>P. californiensis</i>.	
7.3	Actividad proteolítica y amilolítica en los extractos de tracto digestivo de juveniles de camarón café sometidos a diferentes regimenes alimenticios.	
8.	DISCUSION.....	78
8.1	Actividad proteolítica en el tracto digestivo del camarón café.	
8.2	Actividad amilolítica en el tracto digestivo del camarón café.	
8.3	Actividad enzimática digestiva del camarón café alimentado con dietas experimentales.	
9.	CONCLUSIONES GENERALES.....	96
10.	REFERENCIAS.....	99

ANEXOS

Indice de Figuras

Indice de Tablas

SIMBOLOGIA

Abs/min	absorbancia por minuto
ANOVA	análisis de variancia.
BSA	albúmina de suero bóvino
BTEE	benzoil-l-tirosina etil ester
°C	grados celcius o centígrados.
D.O.	densidad óptica.
DTT	DL-ditiotreitol
EC	extracto crudo
EDTA	ácido etiléndiamin tetra-acético.
g	gramo.
h	hora.
HA	hipuril arginina
HDP	cloruro de 1-hexadecylpiridinium
HPLA	hipuril- DL- fenil lactato
IA	ácido iodoacético
LAPNA	leucina-p-nitroanilida
mg	miligramos.
min	minuto.
ml	mililitros.
mM	concentración milimolar.
µg	microgramos.
nm	nanómetros
PAGE	electroforésis en gel de poliacrilamida
PMSF	floururo de fenil metil sulfonilo
PT	1,10-fenantrolina
rpm	revoluciones por minuto.
SAPNA	succinil- p-nitroanilida

SBTI	inhibidor de tripsina de soya
SOD	superóxido dismutasa.
S100C	sustitución al 100% de harina de camarón
S33P	sustitución al 33% de harina de pescado
S66P	sustitución al 66% de harina de pescado
S100P	sustitución al 100% de harina de pescado
S33S	sustitución al 33% de harina de soya
S66S	sustitución al 66% de harina de soya
S100S	sustitución al 100% de harina de soya
TCA	ácido tricloroacético
TLCK	Na-p-tosil-l-lisina cloro metil cetona
TAME	tosil-l-arginina metil ester
TRIS	TRIS (hidroximetil aminometano).
U	unidades.
U/mg	unidades por miligramo.
U/ml	unidades por mililitro.

RESUMEN

En el presente estudio se llevó a cabo la caracterización parcial de las enzimas digestivas con actividad proteasa y amilasa de un extracto crudo obtenido de la homogenización del sistema digestivo (hepatopáncreas, estómago e intestino) de juveniles de camarón café del Pacífico *Penaeus californiensis*. Adicionalmente se estudió el efecto en la actividad de proteasas y amilasas en camarones alimentados con dietas conteniendo diferentes concentraciones de harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) en substitución de insumos comunes como harina de pescado y harina de soya. La actividad de proteasas en el extracto crudo demostró poseer las siguientes características: i) alta halotolerancia, teniendo una máxima actividad entre 0 y 0.5 M NaCl y conservando un 50% de la actividad a 2M NaCl; ii) una óptima actividad a 50°C e inactivación irreversible a 60°C y iii) actividad entre pH 6 y pH 10 con un máximo alrededor de pH 8. Se encontraron por lo menos ocho bandas de actividad proteasa utilizando PAGE y geles de agarosa. Actividades tipo tripsina, tipo quimotripsina, tipo carboxipeptidasa A y B, y tipo leucino-aminopeptidasa fueron detectadas.

La actividad amilasa detectada en el extracto crudo demostró poseer las siguientes características: i) considerable actividad de amilasa entre pH 6 y pH 8, con un óptimo en 7.5; ii) temperatura óptima entre 30 y 40°C, similar a las amilasas de otros crustáceos; iii) alta halotolerancia, con un máximo de actividad a 0.01M NaCl y conservando el 50% de su máxima actividad a 3M NaCl ; iv) inhibición parcial por iones divalentes Hg^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , y Cr^{+2} ; v) aparente incremento de la actividad con

los iones Mg^{+2} y Ca^{+2} .

El efecto de la harina de langostilla sobre la actividad enzimática digestiva fue evaluado en experimentos de alimentación de 30 días, registrando la sobrevivencia, el crecimiento y la actividad de proteasa y amilasa en el hepatopáncreas de los camarones. La dieta basal (BD) (38% de proteína, 8% lípidos) contenía 25% de harina de pescado, 25% de harina de soya, 10% de harina de camarón y 16% de harina de trigo como fuentes de proteína. Dos dietas comerciales fueron usadas también (PURINA) conteniendo 35 y 40% de proteína y utilizadas como controles. La BD se modificó sustituyendo la harina de pescado y la harina de soya con harina de langostilla en porcentajes crecientes (33, 66 y 100%). Las sustituciones se hicieron tomando en cuenta la sustitución de la proteína y no de la cantidad de harina en la formulación de los alimentos. Por lo tanto las dietas fueron siempre isoprotéicas e isocalóricas. Los camarones alimentados con dietas conteniendo harina de langostilla obtuvieron pesos finales mayores que aquellos alimentados con la dieta basal o comercial. El mayor crecimiento se consiguió con la sustitución de 66% de harina de pescado por harina de langostilla. La actividad de proteasa y amilasa en los camarones alimentados con alimentos con langostilla fue modificada significativamente en relación a la de aquellos alimentados con la dieta basal. Sin embargo no se pudo encontrar una relación entre ganancia de peso y actividad enzimática. Los camarones alimentados con dietas comerciales demostraron poseer una actividad enzimática digestiva similar o menor a la encontrada en camarones alimentados con la dieta basal.

1. INTRODUCCION

Actualmente existe una necesidad urgente de encontrar estrategias y alternativas de nutrición dirigidas a los organismos marinos que son manejados en los acuacultivos. La nutrición es uno de los factores más importantes para la acuicultura ya que conforme se intensifica el sistema de cultivo, va cobrando mayor relevancia la calidad y la cantidad del alimento suministrado. La alimentación puede llegar a representar hasta dos terceras partes de los costos variables de la producción de las granjas, por lo que un óptimo aprovechamiento de este factor permitiría elevar la eficiencia de la producción (Kong and Co, 1988; Goytortúa-Bores, 1993).

El mejoramiento de la calidad y las tasas de conversión de los alimentos utilizados, requiere necesariamente de la definición cualitativa y cuantitativa de las necesidades nutricionales de los organismos. El conocimiento de estos requerimientos puede ser obtenido a través de diferentes vías, las pruebas de crecimiento (o pruebas zootécnicas), la evaluación de la composición corporal de los animales de interés (generalmente el perfil de aminoácidos esenciales) y los estudios de digestibilidad *in vivo*. Estos son, entre otros, los métodos más comunes de acercamiento hacia el conocimiento de los requerimientos nutricionales de los organismos, y por ende casi toda la investigación en este campo está basada en este tipo de metodologías. Sin embargo, el estudio de estas puede ser reforzado por investigación de los mecanismos digestivos a escala molecular, particularmente los procesos enzimáticos de la degradación de los alimentos.

Para los crustáceos decápodos en cultivo la fracción protéica del alimento constituye una parte importante debido al alto costo que esta representa. Para el caso de los camarones Peneidos, puede representar hasta un 60 % del peso seco del alimento (Ceccaldi 1982). En este sentido la identificación de las enzimas digestivas proteolíticas presentes en el tracto digestivo y el conocimiento de su modo de acción pueden ser útiles en el perfeccionamiento de los alimentos, adaptados a la fisiología de las especies de interés. Lo anterior en base la relación que puede haber con otras enzimas digestivas asociadas o producidas por el mismo organismo.

El conjunto de enzimas proteolíticas (proteasas ó proteinasas) (EC 3.4) está constituido por dos subgrupos: las endopeptidasas (EC 3.4.21-24), las cuales rompen los enlaces peptídicos en el interior de las cadenas protéicas, y las exopeptidasas (EC 3.4.11-19), que cortan los enlaces peptídicos aminoterminal (aminopeptidasas) y carboxiterminal (carboxipeptidasas) (Lehninger 1979).

En los crustáceos, la digestión de las proteínas comienza en la cavidad cardiaca del estómago y continua dentro de los túbulos del hepatopáncreas. Es a nivel de esta glándula digestiva donde se realiza la parte más importante de la digestión ya que está supeditada a la acción de enzimas secretadas por células especializadas de la pared de los túbulos del hepatopáncreas (Gibson and Barker, 1979).

Estudios realizados con camarones demuestran la presencia de varios tipos de proteasas en el tracto digestivo (Doke and Ninjoor, 1987), aún y cuando estas pueden variar en sus propiedades y actividad de una especie a otra.

Las enzimas carbohidrolasas son participantes también del proceso digestivo del camarón, pero no han recibido una atención considerable como en el caso de las proteasas. El estudio de estas actividades ha involucrado principalmente a amilasas y quitinasas (Maugle *et al.*, 1982a, 1982b, 1983; Fox, 1993). Las amilasas o 1,4 glucano 4-glucanohidrolasas (E.C.3.2.1.1.) están muy extendidas en el reino animal, esencialmente a nivel de páncreas en vertebrados. Las amilasas han sido relativamente bien estudiadas en los mamíferos, pero en lo que se refiere a su estudio en crustáceos, este ha sido comparativamente muy pobre (Van Wormhoudt, 1974). Hoppe-Seyler (1876) (citado por Lee, 1985) fué el primero que las detectó en este grupo zoológico. En 1966 Blandamer y Beechey se interesaron en la amilasa y la purificaron parcialmente del hepatopáncreas de un cangrejo (*Carcinus maenas*).

La actividad de las carbohidrolasas en los camarones peneidos y su relación con otras enzimas digestivas como proteasas y lipasas, puede en un momento dado dar la pauta para determinar la cantidad de carbohidratos que podrían ser incluidos en la dieta. La mayoría de los estudios de carbohidrolasas en camarones se han centrado en las amilasas, quitinasas y celulasas. El estudio de estas enzimas se ha debido al tipo de insumos generalmente utilizados para la formulación de dietas y al tipo de alimentos que en un momento dado pudiera consumir el organismo en el medio silvestre.

En relación a lo anterior poco o nada se conoce acerca de las proteasas presentes en el tracto digestivo del camarón café del Pacífico *Penaeus californiensis*. De igual forma que en el caso de las amilasa, aún y cuando el estudio de las

carbohidrolasas se ha llevado a cabo en otras especies de camarones (*P. vannamei*, *P. japonicus*, *P. kerathurus*, etc. (Van Wormhoudt, 1980), en *Penaeus californiensis* no se conoce nada al respecto. Esto hace necesario realizar estudios básicos sobre este grupo de enzimas en esta especie con potencial aprovechamiento en acuicultura.

2. ANTECEDENTES

Las investigaciones referentes a la actividad enzimática digestiva en crustáceos tiene ya mas de un siglo de haber comenzado. Particularmente los investigadores alemanes y franceses tuvieron el interés de iniciar esta línea de estudio. De esta manera, autores como Fredericq (1878), Frenzel (1883), Hoppe-Seyler (1876) y Krunkenberg (1879) (citados por VanWormhoudt, 1974) entre otros, enfocaron sus investigaciones en la descripción anatómica y fisiológica de los procesos digestivos en organismos invertebrados, incluidos algunos crustáceos. Si bien es cierto que estos primeros trabajos son descriptivos, son el basamento de toda la investigación posterior en esta área.

A principios de siglo, Europa siguió teniendo el liderazgo en esta área de la investigación biológica. Entre otros investigadores destaca el trabajo de Jordan (1904) que estudiando a varias especies de cangrejos logró encontrar carbohidrolasas capaces de hidrolizar el almidón, el glucógeno, la sacarosa y la maltosa, así como una proteasa alcalina y enzimas lipolíticas. Son importantes también los trabajos de Giaja y Gompel (1907) al detectar la hidrólisis de lactosa, rafinosa, sacarosa, almidón y otros glucósidos por el fluido digestivo de acociles del género *Astacus*. Guieysse (1907) presenta los trabajos mas detallados hasta nuestros días de los órganos digestivos de varios crustáceos y los relaciona con ciertos aspectos de la fisiología de la absorción. Los trabajos descriptivos siguieron apareciendo durante las siguientes décadas,

destacando los de Yonge (1924) que trabajando con la langosta noruega *Nephrops norvegicus*, reportó los hábitos alimenticios, anatomía é histología del tracto digestivo, enzimas digestivas presentes, los procesos de asimilación y absorción, en un intento por integrar todos los mecanismos en un solo proceso digestivo.

En 1937, Yonge publica una revisión sobre la digestión en los Metazoarios, en la cual trata de establecer la idea de que existe una definitiva correlación entre la alimentación de cualquier animal y la naturaleza y relativa actividad de las enzimas digestivas. En el mismo año Vonk, publica otra revisión centrandose en la especificidad de la enzimas digestivas de algunos *phyla* de invertebrados. Entre sus conclusiones están: i.- Existen por lo menos cuatro proteasas presentes en el tracto digestivo de los crustáceos; ii. No se encontró pepsina en ningún invertebrado; iii. Se encontró catepsina intracelular en invertebrados; iv. La especificidad de la amilasa de invertebrados es igual a la de vertebrados; v. La celulasa y quitinasa son secretadas por algunos invertebrados; y vi. Las enzimas lipóliticas de invertebrados actúan generalmente como esterases.

Mansour-Bek (1954) publicó dentro de *Tabulae Biologicae*, una lista de todas las enzimas digestivas reportadas hasta ese tiempo en cada una de los *phyla* de invertebrados y protocordados. Asimismo publicó también un artículo describiendo la composición del jugo digestivo de invertebrados. Estas dos contribuciones sentaron las bases para la descripción de la digestión química en casi todos los *phyla* de invertebrados.

Durante la época de los sesentas, el estudio de las enzimas digestivas de los

crustáceos tomo un nuevo auge. El diseño y aparición de las nuevas técnicas de separación, purificación y microanálisis de enzimas, permitió que el trabajo fuera más económico y rápido. Arvy (1969) examinó la clasificación y la distribución de las enzimas digestivas de los crustáceos. En 1970, Van Weel publica un trabajo en donde reporta y extiende el número de enzimas detectadas en el divertículo digestivo de los crustáceos. Gibson y Barker (1979) estudiaron la fisiología del hepatopáncreas de crustáceos y su papel en la digestión. Estos dos investigadores dan una detallada descripción de la diferenciación celular en el hepatopáncreas y su relación con el proceso digestivo.

Actualmente la investigación referente a la bioquímica y fisiología de los sistemas digestivos de los crustáceos es muy amplia. Los trabajos de los grupos franceses en las décadas de los 70's, 80's y 90's , representados por Guillaume, Van Wormhoudt, Galgani, etc. han sido quizás los mas sólidos y continuos. Los aportes que han hecho ellos al desarrollo de la investigación de la digestión de decápodos han sido fundamentales para el futuro de esta área. De importancia básica han sido también los trabajos de Lovett y Felder (1990 a,b,c) que han desarrollado los estudios ontogénicos de la producción de enzimas digestivas del camarón y sentando de esta manera las bases para una aproximación más efectiva hacia el diseño de dietas dirigidas a estadios específicos con un equipamiento enzimático particular. Prácticamente todos los países interesados en desarrollar la acuicultura realizan investigación básica en estos tópicos, en un intento por acceder a información que permita la comprensión de los procesos digestivos de las especies en cultivo y en base

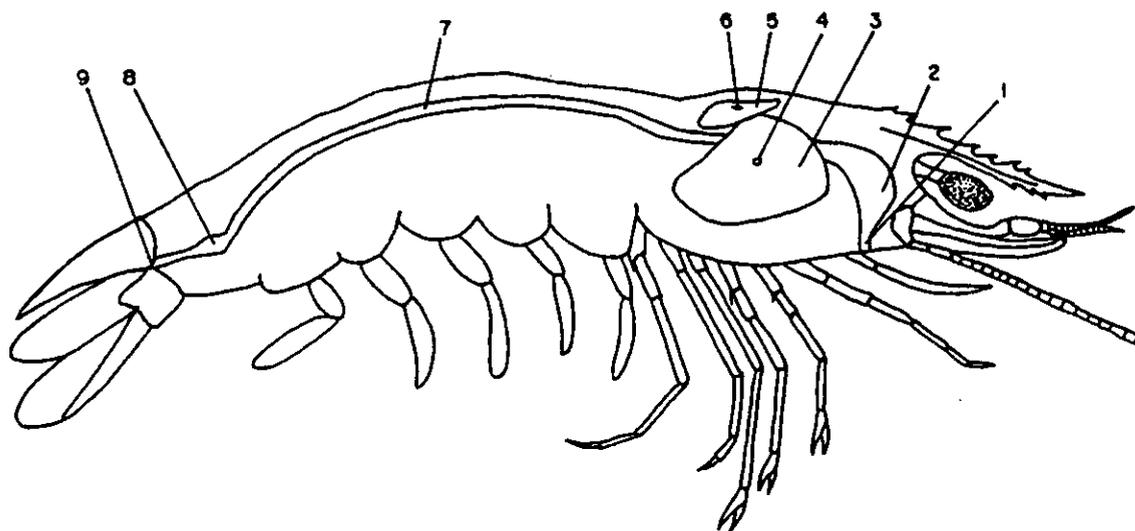
a esta, conocer las necesidades y requerimientos que permitan diseñar alimentos y regímenes alimenticios acordes a cada especie y sus estadios.

2.1 La digestión en los crustáceos decápodos.

En el esquema A se representa el tracto digestivo de los peneidos y sus estructuras asociadas (tomado de Gibson, 1981).

Los crustáceos decápodos poseen mecanismos básicos similares de alimentación y digestión. Una gran variedad de apéndices torácicos y cefálicos son utilizados para la aprehensión del alimento (Barker and Gibson, 1977). La ingestión del alimento es facilitada por secreciones mucoides de las glándulas esofágicas (Barker, 1976). Durante la digestión, tanto las enzimas como los agentes emulsificantes secretados, pasan al estómago pilórico y de ahí al estómago cardíaco en donde actúan extracelularmente en conjunción con los procesos mecánicos del molino gástrico (Gibson y Barker, 1979). El contenido estomacal es posteriormente separado por un proceso de filtración en donde los fluidos y el material microparticulado ingresan a los primeros ductos del hepatopáncreas, a través de otros sistemas filtradores localizados en la entrada de estos, para los procesos subsecuentes de digestión mientras que las sustancias y materiales residuales pasan directamente al intestino.

Esquema A. Tracto digestivo de los peneidos y sus estructuras asociadas.



EL SISTEMA DIGESTIVO

- 1 ESOFAGO
- 2 ESTOMAGO
- 3 HEPATOPANCREAS
- 4 ABERTURA DEL DUCTO HEPATICO
- 5 CORAZON
- 6 OSTIUM
- 7 INTESTINO
- 8 GLANDULA DEL INTESTINO
- 9 ANO

Dentro del hepatopáncreas, la digestión es completada por una combinación de procesos extra e intracelulares. El movimiento de material hacia afuera y hacia adentro del hepatopáncreas es efectuado por contracciones de los músculos de cada túbulo. Estas contracciones son particularmente vigorosas cuando un animal previamente ayunado es alimentado.

2.2 La diferenciación celular del hepatopáncreas y su relación con la digestión y producción de enzimas digestivas.

Los estudios llevados a cabo principalmente por Ogura (1959), Bunt (1968), Loizzi (1971), Gibson y Barker (1979) y recientemente Nakamura (1988) han establecido las bases para la comprensión de la histología y fisiología del hepatopáncreas de los crustáceos decápodos. Es claro que cualquier intento por entender las variaciones en la actividad enzimática resultantes de la modificación de la alimentación, deberá estar apoyado en el conocimiento de los procesos normales de producción y digestión enzimática.

El hepatopáncreas se encuentra conformado por varios lóbulos los cuales a su vez están formados por un complejo sistema de ductos y túbulos ciegos. Según Gibson (1981), estos túbulos están estructurados por un epitelio columnar simple, compuesto por cuatro tipos de células: células E (embrionarias ó indiferenciadas), F (fibrilares), R (absorbentes) y B (secretoras). Las células E llevan a cabo una diferenciación citoplásmica dando como resultado ya sea células F ó R. Según Loizzi (1971) las

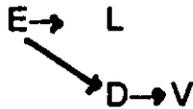
células F sintetizan enzimas digestivas encapsulándolas en vacuolas. Son entonces las células F las que se transforman en células B secretoras, las cuales son las más grandes de todos los tipos y contienen una vacuola única y enorme que ocupa del 80 al 90% del volúmen celular total (Barker y Gibson, 1977). La pérdida de esta vacuola digestiva puede ser vía secreción holócrina, merócrina y apócrina. Cuando las condiciones de alimentación así lo determinan y esta pérdida vacuolar (liberación de enzimas digestivas) es de tipo merócrino ó apócrino, se dá en las células B un proceso de regeneración a célula F.

Nakamura (1987) define a las células del epitelio del hepatopáncreas de una forma diferente: células claras (L), oscuras (D) y vacuoladas (V). La parte distal del divertículo se compone de células cuboidales indiferenciadas llamadas células Embrionarias ó células-E. Esta clasificación corresponde con la anterior (mencionada por Gibson) de la forma siguiente: células E = E, células F = D, células B = V y células R = L.

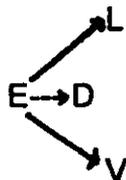
El mismo Nakamura (1988) trabajando con *Penaeus japonicus* discute el esquema anterior. El menciona que en base a sus estudios con microscopía electrónica, por lo menos para *P. japonicus* y *P. semisulcatus* no se puede considerar un patrón similar al propuesto por Loizzi (1971), proponiendo él un patrón similar al de Bunt (1968). En la esquema B se grafican las diferentes teorías de la diferenciación celular del hepatopáncreas en decápodos.

Esquema B. Representación esquemática de las diferentes hipótesis de la diferenciación celular en Crustáceos Decápodos.

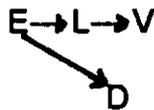
Loizzi (1971) y Hirsch y Jacobs (1930):



Ogura (1959) propone tres tipos independientes de líneas celulares:



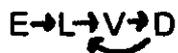
Bunt (1968):



Davis y Burnett propone una sola línea celular



En la langosta, el mismo esquema de Bunt es sugerido por Travis (1957). Y en el cangrejo van Weel (1955) observa una secreción merócrina seguida de un regeneración cíclica de las células:



Nakamura (1988) coincide en el esquema de Bunt para *P. japonicus*, y no encuentra el ciclo de regeneración propuesto por Van Weel (1955).

El epitelio del hepatopáncreas ha sido objeto de estudios extensos y de múltiples propuestas sobre su fisiología, existiendo controversia entre los diferentes grupos de investigación que han abordado estos temas. Aún así, se han llegado a determinar parámetros fisiológicos muy interesantes en relación a la liberación de enzimas a partir de las células vacuoladas. Se ha observado que las enzimas digestivas son liberadas al jugo gástrico en tres ondas durante las primeras 12 horas después de la alimentación (Barker y Gibson, 1977). Asimismo se ha visto que posterior a este período, las células V (vacuoladas), modifican su función a la de almacenamiento de materiales de desecho (Hopkin y Not, 1980). Este cambio se da cuando ya no hay necesidad de enzimas activas en el jugo digestivo pues la digestión extracelular ha sido ya completada. No se ha determinado como se lleva a cabo este cambio radical en las funciones de las células V.

Las células L (R) son aparentemente las mejor conocidas y se acepta que su función es la de absorber nutrientes y metabolizar lípidos y carbohidratos. Hay también evidencias de que las fases tardías (alcalinas) de digestión son completadas dentro de estas (Barker, 1976). Aparentemente estas mismas células sintetizan agentes emulsificantes los cuales son liberados al lumen digestivo.

2.3 El estudio de las proteasas digestivas en el camarón.

Las proteólisis digestiva y la identificación de las proteasas específicas han sido estudiadas en una amplia variedad de crustáceos decápodos. DeVillez (1965) demostró en *Orconectes viridis*, la existencia de una enzima (parecida a la tripsina)

capaz de hidrolizar un substrato sintético específico para tripsina de vertebrados. Esta enzima parece existir en todos los crustáceos (DeVillez y Buchlen, 1967; Sather, 1969), y ha sido purificada y caracterizada en diversas especies como una verdadera tripsina (Zwilling y Neurath, 1981). La secuencia de la tripsina de *Astacus fluviatilis* fue determinada por Titani *et al.* (1983) y presenta una homología de cerca del 50% con la de la tripsina bovina. En lo que se refiere a la actividad tipo quimotripsina, ha sido puesta en evidencia en diversos crustáceos por Eisen y Jeffrey (1969), Brun y Wojtowicz (1976), Trelu y Ceccaldi (1977), Van Wormhoudt (1980), Galgani *et al.* (1984), Tasai *et al.* (1986), Chen *et al.* (1991), Hernández-Cortés (1993), entre otros autores. Sin embargo la actividad de esta es al parecer mucho menor que la de la tripsina. Dentro de la clase Macrourea, casi todos los trabajos se han orientado al estudio de los *Penaeidae* y de *Homarus*.

El estudio de la presencia y actividad de proteasas específicas de los crustáceos, no ha dejado de tener interés para los grupos de investigadores a nivel mundial y todo parece indicar que esta tendencia va en aumento. El estudio de las actividades de las proteasas específicas tiene relevancia no solo a nivel de nutrición de camarón, sino que actualmente se comienza explorar la posibilidad de utilizarlas en otros procesos en tecnología de alimentos y uso industrial (García-Carreño y Haard, 1993; Jiang *et al.*, 1991).

2.4 El estudio de las amilasas digestivas en el camarón.

Las amilasas ó α 1,4 glucano 4-glucanohidrolasas (E.C. 3.2.1.1.) son enzimas distribuidas en todo el reino animal, localizandose esencialmente a nivel de páncreas de vertebrados. Aún y cuando han sido relativamente bien estudiadas en los mamíferos, su estudio en crustáceos ha sido muy pobre a pesar de que se conocen en este grupo zoológico desde 1876 con los estudios de Hoppe-Seyler. No fue sino hasta 1966 que Blandamer y Beechey se interesaron de nuevo en estas enzimas, dando continuidad a su estudio.

El desarrollo de la acuacultura y el consiguiente interés en el desarrollo de una nutrición adecuada para los organismos en cultivo, con particular atención a los crustáceos decápodos, ha originado un aumento en el estudio de las enzimas digestivas, incluyendo a las amilasas, enzimas que, junto con las proteasas y lipasas y aparentemente las quitinasas (Clark y col. 1993) conforman el equipamiento digestivo principal de la mayoría de estas especies. De esta forma se han llevado estudios en langostas (Lee *et al*, 1980; Biesiot y McDowell, 1990), en la liberación de la amilasa a través de la participación de la hormona hiperglicémica en el acocil (Sedlmeier, 1988) y en diversas especies de camarones (Van Wormhoudt, 1974; Van Wormhoudt *et al*, 1980; Maugle *et al*, 1982; Lee y Lawrence, 1985; Galgani *et al*, 1988, Toullec y col. 1991; Omondi y Stark, 1995). Otros estudios se han interesado no solo en la detección y caracterización de la amilasa, sino que incluso se ha llegado a adicionar la misma enzima en los alimentos ofrecidos a los organismos (Maugle *et al*, 1983).

Los primeros estudios llevados a cabo con *Penaeus californiensis* son precisamente los llevados a cabo dentro de la División de Biología Experimental del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

2.5 El estudio del efecto de la dieta en las enzimas digestivas del camarón.

Los estudios nutricionales de los animales domésticos se han basado generalmente en estudios de crecimiento (Maynard *et al*, 1979). A nivel de nutrición de crustáceos se ha dado este mismo énfasis a los bioensayos que analizan el crecimiento del organismo como un reflejo de la buena ó mala nutrición del mismo. No obstante, en la última década la tendencia en la nutrición de crustáceos ha sido la de incluir, complementariamente a los ensayos zootécnicos, varios métodos analíticos los cuales han sido desarrollados para investigar mecanismos específicos involucrados en la digestión y la asimilación (Lee y Lawrence, 1985). Aún y cuando los ensayos de crecimiento no podrán nunca ser desplazados como una herramienta importante en los estudios de nutrición, los métodos analíticos han permitido a los investigadores, entender los mecanismos de digestión y asimilación de los crustáceos y otros organismos.

Aparentemente existe una respuesta adaptativa de la actividad enzimática digestiva frente a las variaciones de la composición de la dieta suministrada a organismos marinos desde el zooplancton *Calanus hyperboreus* (Head y Conover, 1983), copépodos (Hasset y Blades-Eckelbarger, 1995) y camarones bajo condiciones experimentales según los han demostrado varios autores (Hoyle, 1973; Van

Wormhoudt, 1978, 1980; Maugle, 1982, Lee, 1985, Fox, 1993, Civera, 1994; Le Moullac et al. 1994; Kumlu and Jones, 1995), algunos de los cuales han reportado una correlación entre el incremento de la actividad de las enzimas digestivas (a nivel de hepatopáncreas) y el incremento de la ganancia en peso y/o crecimiento del organismo, mientras que otros han detectado un efecto en la actividad pero, no han podido llegar a esta correlación positiva, sino a una aparente adaptación.

El interés del presente estudio es el de examinar el efecto de diferentes dietas experimentales en la actividad proteolítica y amilolítica asociada al tracto digestivo del camarón café. Pretendemos con esto comenzar los estudios que permitan ayudar a entender los procesos nutricionales de esta importante especie. El camarón café del Pacífico *Penaeus californiensis* ha sido reconocido como una de las especies más viables para ser cultivado en la costa mexicana del Pacífico. Pocos estudios se han hecho en relación a su nutrición, la mayoría de ellos incluidos dentro de la metodología de ensayos de crecimiento o zootécnicos (Galicia, 1976; Rosales, 1976; Brand y Colvin, 1977; Villarreal et al, 1990).

Como insumo de interés en la formulación de dietas para camarón café, se incluyó la harina de langostilla (*Pleuoncodes planipes*) en substitución de la harina de soya, de cabeza de camarón y de pescado, las cuales son insumos muy utilizados en la elaboración de alimentos comerciales para camarón.

La langostilla *Pleuoncodes planipes* es un crustáceo muy abundante a todo lo largo de la costa del Pacífico de Baja California y se considera puede ser utilizada como una fuente de proteína y otros nutrientes para su incorporación en alimentos

para acuicultura. Estudios previos realizados en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste hacen suponer que la inclusión de la langostilla en dietas para camarones puede tener un efecto benéfico en el crecimiento del camarón café (Villarreal, H. 1995).

3.0 JUSTIFICACION

En México, la investigación en nutrición del camarón es muy pobre. La mayoría de las especies de camarones cultivados en nuestras costas han sido ya estudiados en otros países, por lo que solo se ha requerido adaptar (muchas veces adoptar) las técnicas ya desarrolladas en otros países a las condiciones imperantes en el nuestro. El caso de *Penaeus californiensis*, el camarón café del Pacífico, es muy diferente, pues esta especie ha sido solo estudiada muy someramente; esto es debido a que su distribución lo hace prácticamente endémico de nuestro país, además de no haber representado más que un recurso de interés puramente pesquero. Las condiciones actuales son otras; el auge de la acuicultura en México y la sobreexplotación de las poblaciones silvestres de camarón, han hecho que *Penaeus californiensis* cobre interés creciente como organismo factible de ser cultivado. Desafortunadamente se conoce muy poco de su fisiología y comportamiento; en la actualidad importantes estudios se llevan a cabo sobre esta especie dentro del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, todos encaminados a desarrollar el conocimiento y la tecnología necesarios para poder cultivar esta especie en aguas mexicanas. Dentro de los estudios de alimentación de esta especie se ha llegado hasta cierto punto en donde se hace indispensable conocer su fisiología digestiva, particularmente las actividades enzimáticas presentes en su sistema digestivo. Sin este conocimiento como base para el entendimiento de la fisiología de la nutrición del camarón café y por ende de su

capacidad de degradación de ciertos insumos, el diseño de dietas acordes a sus necesidades será difícilmente optimizado. Muchos de los actuales proyectos de investigación a nivel mundial relacionados con la nutrición de crustáceos en cultivo, se han limitado a estudios de crecimiento, en los cuales se cuantifica el crecimiento y sobrevivencia del organismo en función de una dieta determinada suministrada. Si bien estas metodologías han rendido frutos, lo cierto es que la tendencia actual es la de tratar de caracterizar los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que estén involucrados en este proceso, no solo a nivel de género taxonómico, sino en cada especie en particular, debido a las diferencias tan marcadas que se han encontrado. De importancia fundamental en la nutrición de lo crustáceos y relacionado con la actividad enzimática, son los estudios que determinan actividad de las enzimas digestivas en función del desarrollo de los organismos desde estadios de larvas a adultos (Biesiot and McDowell, 1990; Walford and Lam, 1993). Aparentemente la diferencias de actividad enzimática digestiva pueden ser tan marcadas entre un estadio y el siguiente que definitivamente deben ser tomadas en cuenta cuando se intente diseñar dietas artificiales para ellos (Lovett y Felder, 1990a, 1990b). He aquí toda una línea de investigación para ser desarrollada en el futuro inmediato. En base a lo anterior se puede entonces considerar que el estudio de las actividades enzimáticas digestivas del camarón café *Penaeus californiensis* debe considerarse como un paso obligado y complementario para el correcto entendimiento de los procesos digestivos de este organismo y apoyados en estos comenzar a definir los requerimientos nutricionales de esta importante especie.

4.0 HIPOTESIS

El camarón café del Pacífico *Penaeus californiensis*, tendrá enzimas proteolíticas y amilolíticas asociadas a su tracto digestivo y esta actividad puede ser influenciada por el tipo de alimento suministrado a los organismos.

5.0 OBJETIVOS.

General:

Estudiar las actividades enzimáticas presentes en el tracto digestivo de juveniles del camarón café del Pacífico *Penaeus californiensis*.

Específicos:

- a) Determinar la actividad proteolítica y amilolítica presente en el tracto digestivo de juveniles de camarón café.
- b) Determinar las actividades de proteasas específicas: Tipo-Tripsina, Tipo-Quimotripsina, Tipo-Carboxipeptidasa A y B, Tipo-Leucinoaminopeptidasa.
- c) .Determinar el efecto de la composición del alimento sobre la actividad enzimática (proteasas y amilasas) del tracto digestivo de camarones juveniles.

6.0 MATERIALES Y METODOS

6.1 Materiales y métodos generales

Organismos experimentales

Los organismos de estudio fueron juveniles de camarón café del Pacífico *Peneaus californiensis*. Se utilizaron tanto camarones silvestres mantenidos en ayuno, como camarones alimentados en el laboratorio con diferentes dietas experimentales y comerciales.

Para los análisis con camarones juveniles silvestres se capturaron cien individuos de *Penaeus californiensis* con pesos entre 0.5 y 2 g, mediante el uso de chinchorro en la bahía de La Paz, B.C.S. La captura fué realizada por los técnicos de la División de Biología Marina del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

Mantenimiento de los organismos

Los organismos fueron mantenidos en el laboratorio de cultivo de camarón del CIBNOR, dentro de tanques de plástico (100 l) durante tres días bajo condiciones controladas de salinidad (3.5 %) y temperatura (28 °C) con un recambio de agua diario del 100%. Los animales sometidos a la prueba zootécnica se mantuvieron en condiciones similares, detalladas posteriormente en la sección 6.4.

Alimentación

Los animales silvestres capturados fueron mantenidos en confinamiento durante tres días bajo condiciones de ayuno completo. Los animales sometidos al bioensayo nutricional recibieron un régimen alimenticio a base de dietas experimentales o comerciales cuyo diseño es detallado posteriormente (sección 6.4).

Preparación de los extractos enzimáticos

Los extractos crudos para los análisis de proteínas y enzimas fueron preparados a partir de los tractos digestivos completos disectados en el laboratorio siguiendo un procedimiento similar al reportado por Galgani (1982). El tracto digestivo completo de los camarones fué disectado (estómago, hepatopáncreas e intestino) e inmediatamente macerado en frío (baño de hielo) con la ayuda de un homogenizador de tejidos (Potter) en amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.0. El extracto resultante se ultracentrifugó a 15,000 x g durante 30 minutos. La película flotante de lípidos se retiró con la ayuda de una pipeta. La fracción acuosa se separó de la fracción no soluble y se filtró a través de una membrana Millipore (0.45 μ m). A esta solución se le denominó extracto crudo de camarón café (EC).

El EC utilizado en las determinaciones tenía una concentración de 21 mg de proteína por ml. El volúmen utilizado en las determinaciones fué generalmente de 10 μ l, por lo tanto en cada determinación se agregaron 210 μ g de proteína como fuente de enzimas.

Determinación de proteína

La determinación de proteína soluble se llevó a cabo por el método de MicroLowry (Lowry *et al.*, 1951), utilizando las siguientes soluciones: Sol.A: Na_2CO_3 al 3%/NaOH 0.2N, Sol.B: CuSO_4 al 2%, Sol.C: Tartrato de Na/K al 4%, Sol.D: 48ml A + 1ml B + 1ml C. Bajo el siguiente procedimiento: en un tubo de ensayo se agregaron 200ul de EC y 1ml reactivo D, se agitó con ayuda de un vortex y se dejó en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente. En seguida se agregaron 100 μl de reactivo de Folin y se agitó vigorosamente la mezcla, dejandola posteriormente en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez pasado este tiempo se leyó la absorbancia a 750 nm. Como estandard se utilizó albúmina bovina (BSA) (SIGMA CHEM. USA).

Análisis electroforético

El análisis electroforético fue llevado al cabo en geles de polyacrilamida (PAGE) según el método descrito por Laemmli (1970) en condiciones no desnaturalizantes. Los geles (10 % poliacrilamida) fueron montados en un aparato de electroforésis vertical (BIO-RAD Laboratories, Richmond, CA. USA). Las muestras (EC, tripsina bovina y amilasa purificada, 1 mg/ml, SIGMA CHEM. USA) fueron mezcladas con 0.01% de azul de bromofenol y sacarosa al 10%. Se tomaron alícuotas de 25-50 μl y fueron colocadas en el borde superior del gel. La electroforésis fué llevada al cabo con un voltaje constante (200 Volts) hasta que la banda de colorante (azul de bromofenol) llegó a 1.5 cm del borde inferior del gel. El patrón de proteínas fué obtenido tiñendo el gel con azul de Coomasie al 0.1 % (en 40% de metanol/10% de ácido acético) durante

una hora y destiñendo con una solución 40% de metanol y 10% de ácido acético durante 24 horas.

Análisis estadístico.

Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado con cinco réplicas. Los resultados fueron analizados por análisis de varianza de una vía (ANOVA). Las diferencias entre medias fueron analizadas por el método de LSD 95%.

6.2 Determinación de la actividad proteolítica general y específica en el extracto del tracto digestivo del camarón café

La determinación de la actividad de proteolítica general (utilizando un sustrato inespecífico, caseína SIGMA, CHEM.CO.) presente en el extracto crudo del tracto digestivo del camarón café, se realizó mediante la siguiente metodología: A 10 μ l de EC colocados en un tubo de ensayo se le adicionaron 490 μ l de amortiguador Tris-HCl 0.1M (pH 7.5) y se preincubaron 5 minutos a 30°C. Posteriormente, al tiempo cero, se adicionó 1ml del sustrato de caseína al 1% (en Tris 0.1M, pH 7.5) a la misma temperatura. La mezcla de reacción se incubó durante 60 a 120 minutos a 30°C. Para detener la reacción se adicionaron 5ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5%. La mezcla se agitó en un vortex y se dejó en reposo durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se clarificó por centrifugación a 15000 x g, 5 minutos y se leyó la absorbancia del sobrenadante (material no precipitable en TCA a las condiciones del ensayo) en un espectrofotómetro Spectronic 2000 (Bausch & Lomb, USA) a una longitud de onda de 280 nm.

Los blancos fueron preparados con 1ml de caseína, 490ul de Tris-HCl, 5ml de TCA y 10ul de extracto adicionados en ese orden. Para el testigo negativo se utilizó amortiguador de Tris-HCl en reemplazo de la solución enzimática.

Una unidad de proteasa fué definida arbitrariamente como la cantidad de enzima que causa un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 280 nm, por minuto, en las condiciones establecidas.

Efecto del pH en la actividad proteolítica

Siguiendo el procedimiento anterior se utilizó el siguiente sistema de amortiguadores: Mes-HCl (0.1M) para pH de 5 a 6.5, Tris-HCl (0.1M) para pH 7.1 a 9 y carbonato de sodio (0.1M) para pH 9.1 a 11.0. El substrato caseína fué preparado en el amortiguador correspondiente.

Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica

Siguiendo el procedimiento estandar se determinó el efecto de la temperatura en la actividad proteolítica incubando la mezcla de reacción en un baño de agua a 15, 25, 30, 40, 50 y 60°C.

Efecto de la salinidad sobre la actividad proteolítica

El efecto de la salinidad sobre la actividad proteolítica fué evaluado siguiendo el procedimiento estandar y ajustando la mezcla de reacción a las siguientes concentraciones de sal a 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2M de NaCl.

Efecto de cationes divalentes e inhibidores enzimáticos sobre la actividad proteolítica

El efecto cationes divalentes tales como Hg^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , Cr^{+2} , Zn^{+2} y Mg^{+2} (cloruros) sobre la actividad proteolítica, utilizando caseína como sustrato, fue determinado siguiendo el procedimiento estandar y ajustando los cationes divalentes a una concentración de 10mM. El efecto de inhibidores enzimáticos fue realizado de manera similar a una concentración final de 10mM, utilizando los siguientes inhibidores: cloruro de 1-hexadecylpiridinium (HDP), Na-p-Tosil-L-Lisina cloro metil cetona (TLCK), floururo de fenil metil sulfonilo (PMSF), 1,10-fenantrolina (PT), DL-ditiotreitol (DTT), inhibidor de tripsina de soya (SBTI) y ácido iodoacético (IA) (SIGMA CHEM.).

Termoestabilidad de las proteasas del extracto

A fin de conocer la termoestabilidad de las proteasas encontradas en el extracto de camarón café, el extracto enzimático se expuso a las siguientes temperaturas (en baño maría): 10, 20, 30, 40, 50 y 60°C durante una hora. Previo al tratamiento térmico y posterior a él, los extractos fueron mantenidos en baño de hielo hasta la determinación de la actividad remanente a las condiciones estandar. La determinación de actividad se llevó a cabo utilizando como sustrato azocaseína al 0.5% en Tris-HCl 0.1M (pH 8.0) de la siguiente manera: En el tubo de ensaye se colocaron 240 μ l de amortiguador (Tris-HCl) y 10 μ l de extracto enzimático. La mezcla se preincubó a 30°C por 5 minutos. Al tiempo cero se adicionaron 500 μ l de azocaseína al 0.5% a la misma temperatura mezclando vigorosamente. La mezcla se incubó durante 45 minutos a

30°C y se paró la reacción por adición de 500µl de TCA (al 20%). La mezcla se clarificó por centrifugación a 15,000 x g, 5 minutos. La absorbancia del sobrenadante a 440nm fué determinada en el espectrofotómetro. Los blancos fueron preparados adicionando 240µl de Tris-HCl, 10µl de extracto, 500µl de TCA y 500µl de azocaseína adicionados en este orden. El testigo negativo fué Tris-HCl en lugar de la solución enzimática.

Determinación de la actividad de proteasas específicas

Para las determinaciones de proteasas específicas generalmente se utilizan métodos espectrofotométricos que determinan la hidrólisis de sustratos sintéticos. La hidrólisis del sustrato es cuantificada mediante el aumento de la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción de uno de los productos de la reacción enzimática.

Los resultados son expresados como la variación de absorbancia por minuto y por miligramo de proteína soluble
(Abs/min * mg de Prot.) ó en µmoles de sustrato hidrolizado por minuto por miligramo de proteína soluble (µmoles/min * mg Prot.).

Actividad de tipo tripsina

La actividad de tipo tripsina se detectó por medio de la hidrólisis del sustrato sintético Tosil-L-Arginina Metil Ester (TAME) (Hummel, 1959) en amortiguador Tris-HCl 50 mM (pH 8) y la presencia de CaCl₂ 20 mM a 20°C. La concentración del sustrato fué de 10⁻³ M. La mezcla de reacción consistió en 1 ml de solución de TAME y la

adición al tiempo cero de 10 μ l de EC o de la solución correspondiente. Como control positivo se utilizó la tripsina purificada de páncreas bovino a una concentración de 1mg/ml (SIGMA CHEM.). Asimismo se utilizó el inhibidor de tripsina de soya (SBTI) a una concentración final en la mezcla de reacción de 0.1 mg/ml. Para determinar la absorbancia que pudiera poseer el TAME "*per se*", se realizó una determinación testigo adicionando únicamente agua destilada.

La cinética del incremento de absorbancia en la mezcla de reacción se midió a una longitud de onda de 247 nm, según el método estandar.

Actividad de tipo quimotripsina

Para la determinación de actividad de tipo quimotripsina en el extracto enzimático se utilizó el substrato sintético Benzoil-L-Tirosina Etil Ester (BTEE) (Hummel, 1969), en amortiguador de Tris-HCl 50 mM (pH 8), en presencia de CaCl_2 , 20 mM a 20°C. Debido a la dificultad técnica para realizar las lecturas según el método estandar, se llevó a cabo una modificación de la concentración final de BTEE de acuerdo con Asgeirsson (comunicación personal con Hernández-Cortés, 1994) de 1.0 mM a 0.05 mM. La mezcla de reacción fué constituida por 990 μ l de BTEE y 10 μ l de EC o de la solución correspondiente adicionada al tiempo cero. Como control positivo se utilizó la quimotripsina purificada de páncreas bovino (SIGMA CHEM.) a una concentración de 1 mg/ml. Se determinó la hidrólisis espontánea del BTEE, llevando a cabo una determinación con agua destilada en sustitución del EC. Se determinó el efecto del inhibidor Tosil-Lisina Clorometil Cetona (TLCK) sobre la actividad tipo quimotripsina presente en el EC. La longitud de onda a la que se leyó la cinética de la

reacción con este compuesto fue de 256 nm.

Alternativamente se utilizó el substrato succinil- p-nitroanilida (SAPNA) para detectar la actividad de esta endoproteasa bajo las siguientes condiciones: 990 µl de SAPNA 0.02 mM (en Tris-HCl 0.1 M, pH 7.8) y la presencia de CaCl₂ , 0.01M a 25°C. La cinética se llevó a cabo a 25°C, por 5 minutos y la absorbancia medida a una longitud de onda de 410nm (Hernández-Cortés, 1993). Como control positivo se utilizó la quimotripsina de páncreas bovino (SIGMA CHEM.) a una concentración de 1mg/ml. Tanto el extracto de camarón como la quimotripsina comercial fueron sometidas a la acción del inhibidor PMSF a una concentración final de 10mM en la mezcla de reacción.

Actividad de tipo carboxipeptidasa A

La determinación de carboxipeptidasa A se realizó utilizando el substrato sintético Hipuril- DL- Fenil Lactato (HPLA) a una concentración final de 10⁻³M (Folk, 1963). La determinación se efectuó a 25°C en amortiguador Tris-HCl 25mM (pH 8) y NaCl 0.5M. La mezcla de reacción fué constituida por 990 µl de HPLA y 10 µl de EC o de la solución correspondiente adicionada al tiempo cero. Se registró la absorbancia de la mezcla de reacción a 254nm. Como control positivo se utilizó la carboxipeptidasa A purificada de páncreas bovino (SIGMA CHEM.) a una concentración de 1mg/ml.

Actividad de tipo carboxipeptidasa B

Para la determinación de la actividad tipo carboxipeptidasa B se empleó el método de Folk (1963). Como substrato se utilizó el Hipuril Arginina (HA) a una

concentración 10^{-3} M. La determinación se efectuó a 25°C en amortiguador Tris-HCl 25mM (pH 8) y NaCl 0.5M. La mezcla de reacción consistió en 990 μl de solución de HA y 10 μl de EC o de la solución correspondiente. Como control positivo se utilizó la carboxipeptidasa B purificada de páncreas porcino (SIGMA CHEM.) a una concentración de 1 mg/ml y como control negativo se utilizó la tripsina de páncreas bovino (SIGMA CHEM.), 1mg/ml. Como inhibidor de la actividad tipo-carboxipeptidasa B, por quelación de iones divalentes, se utilizó la 1,10-fenantrolina, registrando la lectura a 254nm.

Actividad de tipo leucino amino peptidasa

La actividad tipo leucino amino peptidasa fué realizada utilizando el substrato sintético Leucina-p-Nitroanilida (LPNA) a una concentración final de 10^{-3} M (Tuppy *et al.*1962). La mezcla de reacción consistió en 990 μl de LPNA y 10 μl de EC o de la solución correspondiente. Como control positivo se utilizó la leucino amino peptidasa purificada de riñon porcino (Sigma Chem.) a una concentración de 1 mg/ml. La reacción se desarrolló a 25°C en amortiguador Tris 0.1 M (pH 8) y la presencia de MgCl_2 5mM. El agente quelante EDTA se utilizó para determinar el efecto del secuestro de cationes en la actividad. La lectura espectrofotométrica se llevó a cabo a 410 nm.

Actividad de tipo pepsina

Para investigar la presencia o no de actividad tipo pepsina en los extractos enzimáticos se utilizó como substrato la hemoglobina ácida según el método de Ryle

(1988). Como control se utilizó la pepsina purificada de mucosa de estómago de porcino (SIGMA CHEM.) a una concentración de 1mg/ml. La lectura espectrofotométrica se llevó a cabo a 280nm.

Revelado de actividad proteasa en geles

La detección de actividad de proteasa presente en los geles de PAGE fué realizada cortando los geles y colocándolos sobre geles de agarosa (al 1%) conteniendo 0.5% de caseína como substrato. Después de una incubación por 60 minutos a 37°C en cámara húmeda, los geles de PAGE fueron removidos y los geles de agarosa sumergidos en una solución de azul de Coomasie al 2% y TCA al 12.5% hasta el revelado. Después del desteñido (con ácido acético 10% / TCA 12.5%) las bandas con actividad de proteasa aparecen como zonas claras sobre un fondo azul.

6.3 Materiales y métodos para la determinación de la actividad amilolítica presente en el tracto digestivo del camarón café.

El análisis cualitativo de la actividad de amilasa presente en los extractos crudos de sistema digestivo de camarón café fué llevado a cabo segun el método descrito por Nolasco y Vega-Villasante (1992). Para el análisis cuantitativo de la actividad amilasa se empleó el método de Bernfeld (1951), utilizando como substrato el almidón soluble (SIGMA CHEM.) al 1% en amortiguador de acetatos (acetato de sodio y ácido acético) 50 mM (pH 6) mediante el procedimiento siguiente: En un tubo de ensayo se colocaron 900 µl de substrato de almidón y se preincubaron por 5 minutos en baño de agua a 30°C. Al tiempo cero se adicionaron 10µl de extracto crudo

(conteniendo 210 µg de proteína/ml) y se incubó durante 20 minutos a la misma temperatura (30°C). Para el testigo se llevaron a cabo los mismos pasos, con una ebullición previa del extracto crudo durante 5 minutos para inactivación de las enzimas.

La hidrólisis del substrato fué cuantificada con base en la concentración de azúcares reductores resultante de la fragmentación de la molécula de almidón y se realizó de la forma siguiente: inmediatamente después del período de incubación de la mezcla de reacción, se le adicionaron 0.2 ml de Na_2CO_3 (2 N) y 1.5 ml de ácido dinitrosalicílico (DNS). Los tubos se pusieron en ebullición en baño de agua durante 15 minutos. El volúmen fué ajustado a 10 ml con agua destilada y la solución colorida leída a 550 nm. Un control adicional fué preparado reemplazando el EC con amortiguador de acetatos.

Una unidad de amilasa fué definida arbitrariamente como la cantidad de enzima que causa un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 550 nm, por minuto, bajo las condiciones establecidas.

Efecto del pH sobre la actividad amilolítica del tracto digestivo del camarón café

Siguiendo el procedimiento descrito, se determinó el efecto del pH en la actividad de amilasa del EC, en un intervalo de pH entre 5 y 10. El sistema amortiguadores utilizado fué: MES para pH de 5.5. a 6.5, Tris-HCl para pH de 7.1 a 9 y carbonato de sodio para pH de 9.1 a 10

Efecto de la temperatura sobre la actividad amilolítica del extracto del tracto digestivo del camarón café

El efecto de la temperatura sobre la actividad de amilasa del EC fué determinado incubando la mezcla de reacción, siguiendo el procedimiento estandar a 20, 30, 40, 50 y 60°C.

Efecto de la salinidad sobre la actividad amilolítica del extracto del tracto digestivo del camarón café

El efecto de la concentración de sal en la actividad de amilasa en EC fué evaluado, siguiendo el método estandar, ajustando la mezcla de reacción a diferentes concentraciones de NaCl (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 M).

Efecto del EDTA y iones divalentes sobre la actividad amilolítica del extracto del tracto digestivo del camarón café

El efecto de cationes (cloruros de Hg^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , Cr^{+2} , Zn^{+2} y Mg^{+2}) y de agentes quelantes como el EDTA sobre la actividad de amilasa del EC fué determinado ajustando la concentración del cation correspondiente o EDTA a 10 mM (excepto para Hg^{+2} , ajustado a 5 mM) en la mezcla de reacción.

Revelado de actividad de amilasa los geles

La detección de la actividad de amilasa presente en los geles de PAGE fué realizada cortando los geles utilizados en el corrimiento de extracto crudo y colocándolos sobre geles de agarosa (al 1%) conteniendo almidón al 1%. Después de incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, en cámara húmeda, los geles de

PAGE fueron removidos y los geles de agarosa sumergidos en una solución de lugol (I/KI al 0.025%) durante 5 minutos. Las bandas de actividad de amilasa aparecen como bandas claras sobre un fondo azul oscuro.

6.4 Determinación de la actividad proteolítica y amilolítica asociada al tracto digestivo de camarón café alimentado con dietas artificiales.

Las dietas suministradas en el bioensayo nutricional, fuerin diseñadas y elaboradas por el personal del Laboratorio de Nutrición Acuicola del CIBNOR, según el método de fabricación descrito por Civera (1989). Las dietas experimentales (8) y comerciales (2) evaluadas consistieron en:

- a). Dieta base o control (DB) (38% de proteína): 25% de harina de pescado, 25% de harina de soya, 10% de harina de cabeza de camarón y 16% de harina de trigo como principales fuentes de proteína.
- b). Dieta base modificada: se hicieron modificaciones de la dieta base, substituyendo la harina de pescado por harina de langostilla (*Pleuoncodes planipes*), en un 33% (S33P), 66% (S66P) y 100%(S100P) respectivamente; harina de cabezas camarón en un 100% (S100C). De la misma forma la harina de soya fué substituída (33%, 66% y 100%) por harina de langostilla, denominando a las dietas S33S, S66S y S100S respectivamente. Las substituciones fueron hechas en base a la proteína de los insumos, no tratandose de una substitución de harina vs. harina (1:1).
- c). Dietas comerciales (PURINA 35 y PURINA 40): se utilizaron como controles externos, conteniendo 35 y 40% de proteína respectivamente.

Condiciones de cultivo.

Las postlarvas de camarón fueron mantenidas en tarjas de 60 litros, a razón de 10 organismos por tarja (3 tarjas por dieta), con un recambio de agua del 80% cada 24 horas y alimentados "*ad libitum*". El bioensayo tuvo una duración de 30 días, bajo las condiciones de cultivo descritas por Civera et al (1994).

La obtención de los extractos crudos del tracto digestivo de los organismos fué realizado de manera similar al método previamente descrito. Para este ensayo se tomaron al azar 10 camarones de cada tratamiento (con un ayuno previo de 48 h) y se disectaron los tractos digestivos. Los 10 tractos digestivos fueron procesados en conjunto para obtener el extracto enzimático para los análisis posteriores. Para la preparación del extracto se mantuvo una relación de 1 ml de amortiguador por tracto digestivo. De esta forma se obtuvieron 10 extractos, correspondientes a cada una de las dietas probadas. Los análisis de los extractos fueron realizados con 5 réplicas. Las determinaciones realizadas fueron la concentración de proteína en los extractos crudos y la actividad proteolítica y amilolítica según los métodos descritos previamente.

7.0 RESULTADOS.

7.1 Actividad proteolítica asociada al tracto digestivo de *P. californiensis*.

Las condiciones óptimas de actividad proteolítica global, utilizando caseína como sustrato, del EC de *P. californiensis* fueron establecidas. El efecto de la salinidad en la actividad proteolítica fué determinada entre un intervalo de salinidad entre 0 y 2 M de NaCl (Fig. 1). La actividad de proteasa fue mayor a concentraciones entre 0 y 0.5 M de NaCl, mientras que concentraciones superiores produjeron un decremento gradual de la actividad, bajo las condiciones experimentales establecidas. Aún a concentraciones de 2 M de NaCl se pudo detectar una actividad proteolítica, pudiendo considerar un comportamiento halotolerante de las proteasas del tracto digestivo de *P. californiensis*.

El efecto de la temperatura en la actividad proteolítica fué determinado a temperaturas de 15 hasta 60°C. El extracto crudo mostró un máximo de actividad a 50°C seguido de una disminución a 60°C (Fig.2a). En lo que corresponde a la termo-estabilidad de las proteasas del extracto, se observó una pérdida de actividad a medida que la temperatura incrementa (Fig. 2b).

El pH del extracto crudo del tracto digestivo preparado en agua destilada fue de 6.8. La actividad proteolítica de EC se determinó entre valores de pH de 5 a 11 (Fig.3). Muy poca actividad se conservó a valores extremos de pH (5 y 11); un solo pico de actividad se observó entre 6 y 10 con un valor óptimo cercano al 8.0. Los resultados anteriores demuestran que las enzimas que sustentan la actividad

proteolítica son activas a las condiciones probadas en un considerable rango de temperatura, salinidad y pH.

La actividad proteolítica de E.C. de *P. californiensis* fue inhibida por los cationes divalentes metálicos en el siguiente orden decreciente Hg^{+2} , Zn^{+2} , Cr^{+2} y Cu^{+2} , mientras que no se observó efecto alguno con Mg^{+2} y Ca^{+2} . Como se puede observar en la tabla 1, todos los inhibidores específicos de proteasas causaron una disminución en la actividad proteolítica, en el siguiente orden decreciente EDTA > DTT > PMSF > SBTI > IA > TLCK > PT.

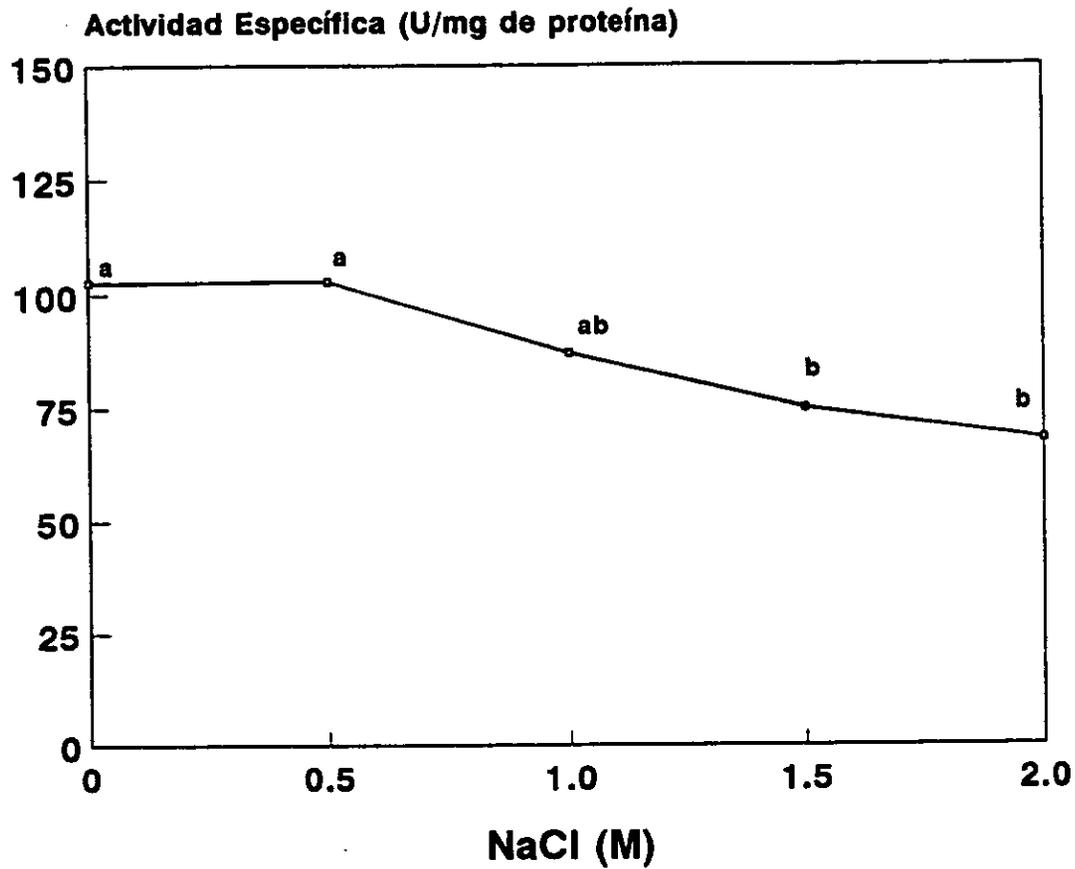


FIG.1 EFECTO DE LA SALINIDAD SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA ASOCIADA AL TRACTO DIGESTIVO DEL CAMARON CAFE, UTILIZANDO CASEINA COMO SUBSTRATO (Las letras diferentes indican diferencias significativas).

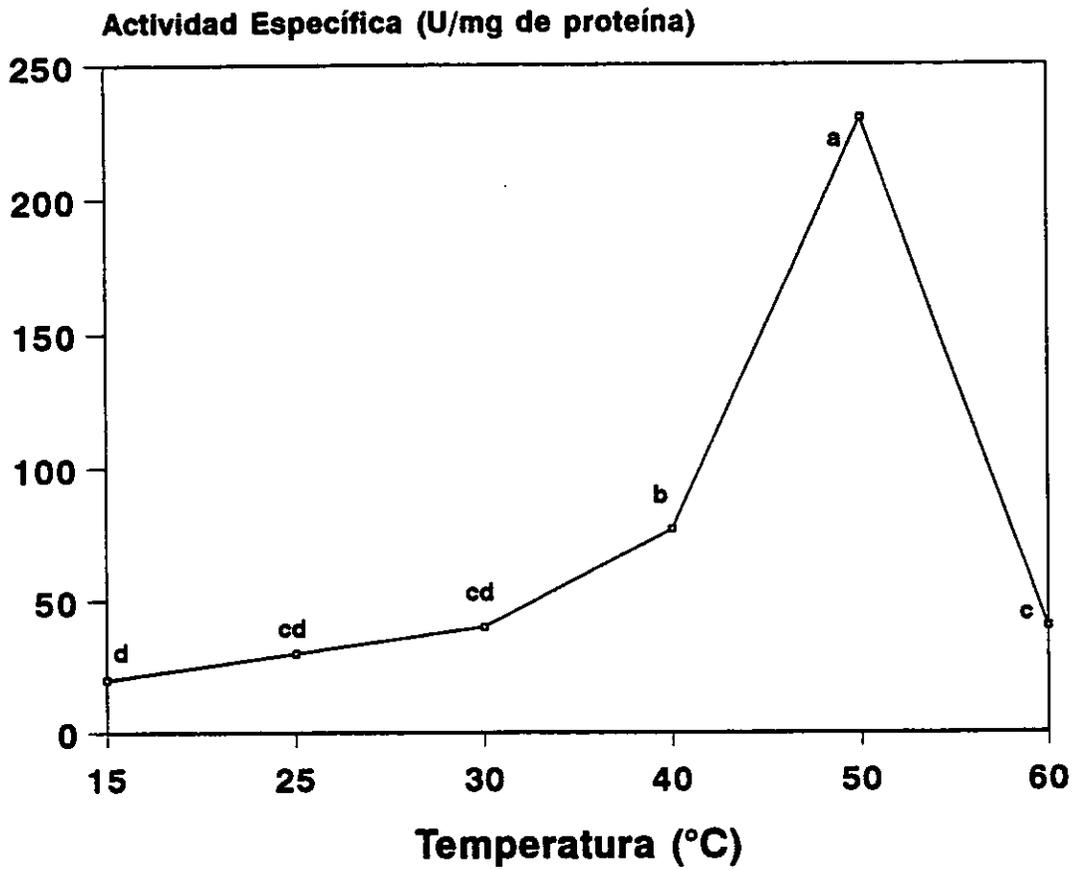


FIG.2a. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA ASOCIADA AL TRACTO DIGESTIVO DEL CAMARON CAFE. (Las letras diferentes indican diferencias significativas)

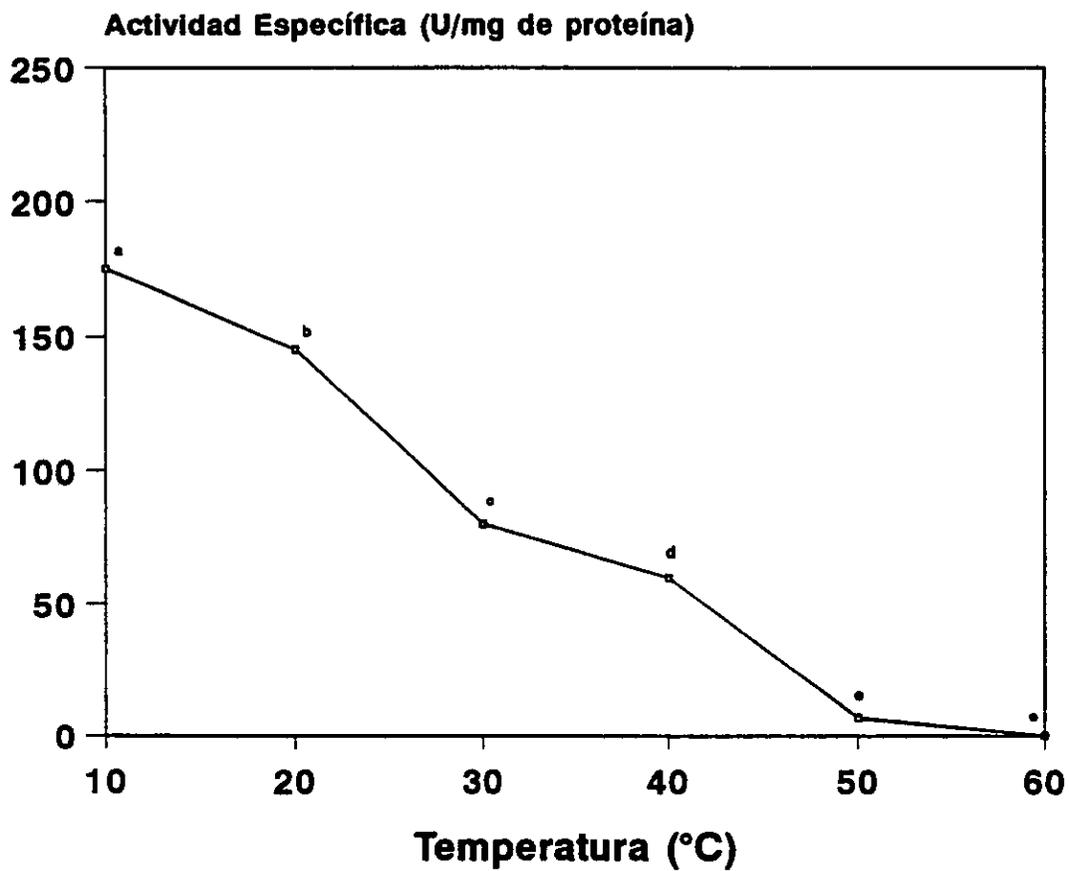


FIG.2b. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ESTABILIDAD DE LAS PROTEASAS ASOCIADAS AL TRACTO DIGESTIVO DEL CAMARON CAFE. (Las letras diferentes indican diferencias significativas)

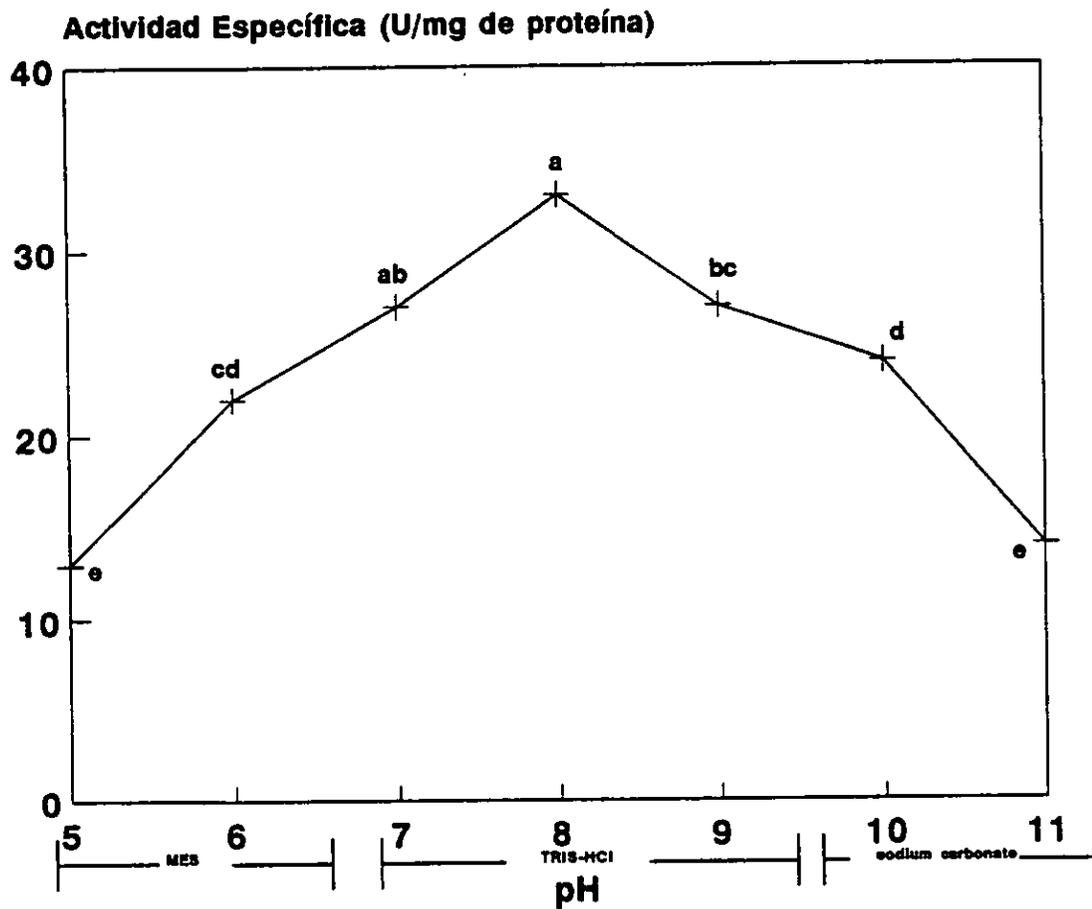


FIG.3. EFECTO DEL pH SOBRE LAS PROTEASAS ASOCIADAS AL TRACTO DIGESTIVO DEL CAMARON CAFE (Las letras diferentes indican diferencias significativas).

TABLA 1. EFECTO DE IONES DIVALENTES E INHIBIDORES ENZIMATICOS SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA ASOCIADA AL TRACTO DIGESTIVO DE *Penaeus californiensis*.

ION DIVALENTE	ACTIVIDAD RELATIVA
O	(%)
INHIBIDOR	
CONTROL	100
Hg ⁺²	24
Ca ⁺²	100
Cu ⁺²	57
Cr ⁺²	54
Zn ⁺²	49
Mg ⁺²	100
EDTA	87
PT	25
TLCK	42
PMSF	66
SBTI	53
DTT	76
IA	49

La concentración final de los iones divalentes e inhibidores se ajustó a 10mM . La actividad específica del Control fue de 50 U/mg de proteína.

Patrón electroforético y revelado de la actividad de proteasa global.

El estudio electroforético del extracto crudo de tracto digestivo de camarón café demostró la presencia de al menos ocho bandas con actividad de proteasa (Figs. 4a y 4b).

Identificación de las principales actividades proteolíticas presentes en el tracto digestivo de *Penaeus californiensis*.

Las curvas de concentración de proteína del EC contra una concentración dada de sustrato, confirmaron el hecho de que a la concentración utilizada (0.2 mg/ml) no se efectuaba la saturación de la enzima en ninguno de los casos, por lo tanto los resultados obtenidos en los ensayos pueden considerarse como confiables en este aspecto (Figs. 5, 6, 7, 8, 9).



FIG. 4. (a) ANALISIS ELECTROFORETICO (PAGE) DEL EXTRACTO CRUDO DE SISTEMA DIGESTIVO DE CAMARON CAFE (las flechas indican las bandas de proteína teñidas). (b) GELES DE AGAROSA-CASEINA MOSTRANDO LAS BANDAS CON ACTIVIDAD DE PROTEASA EN EL EXTRACTO CRUDO DE SISTEMA DIGESTIVO DE CAMARON CAFE.

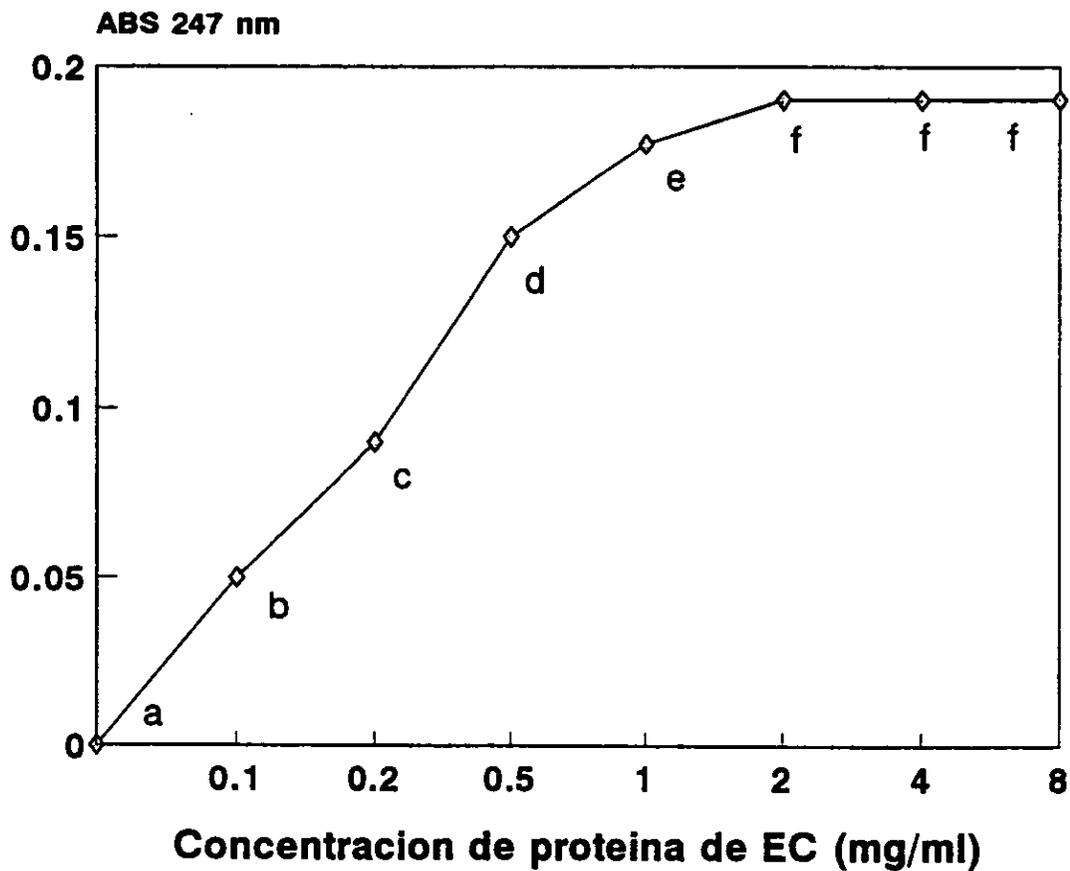


FIG. 5. ACTIVIDAD DE TIPO TRIPSINA DETECTADA USANDO TAME COMO SUBSTRATO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO CRUDO (PROTEINA) DE TRACTO DIGESTIVO DE CAMARON CAFE (Las letras diferentes indican diferencias significativas).

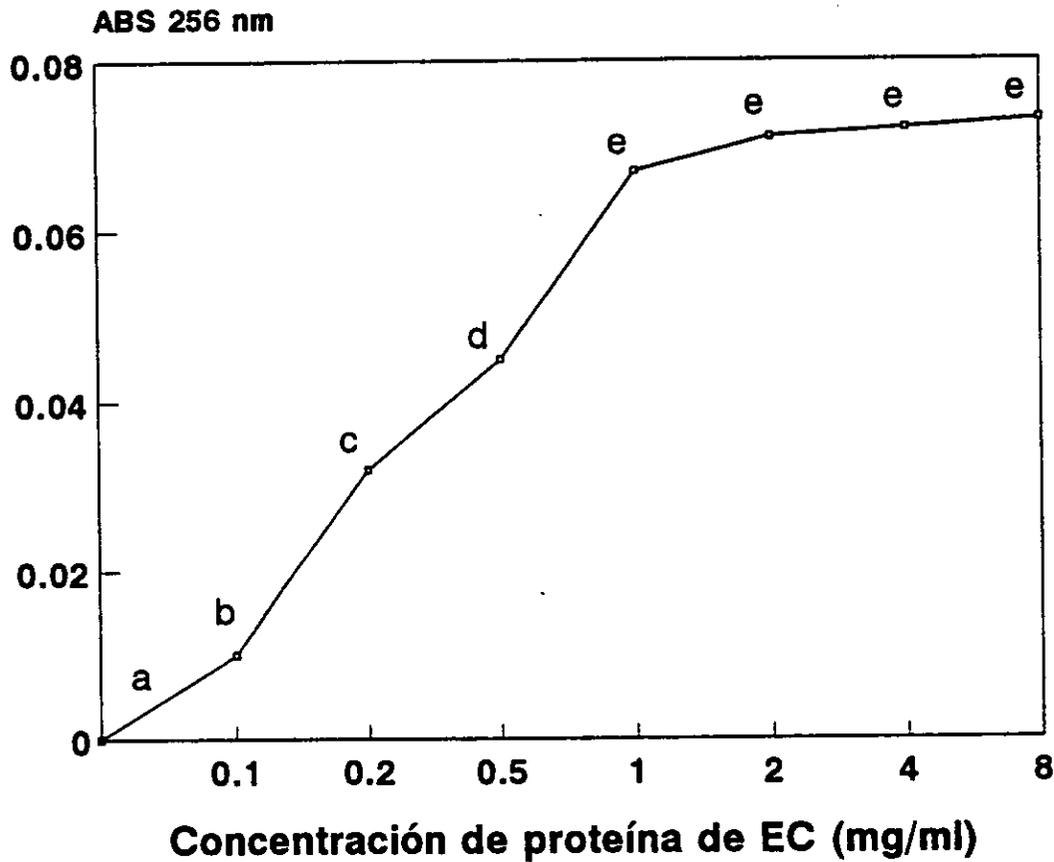


FIG. 6. ACTIVIDAD DE TIPO QUIMOTRIPSINA USANDO BTEE COMO SUBSTRATO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO CRUDO (PROTEINA) DE TRACTO DIGESTIVO DE CAMARON CAFE (Las letras diferentes indican diferencias significativas).

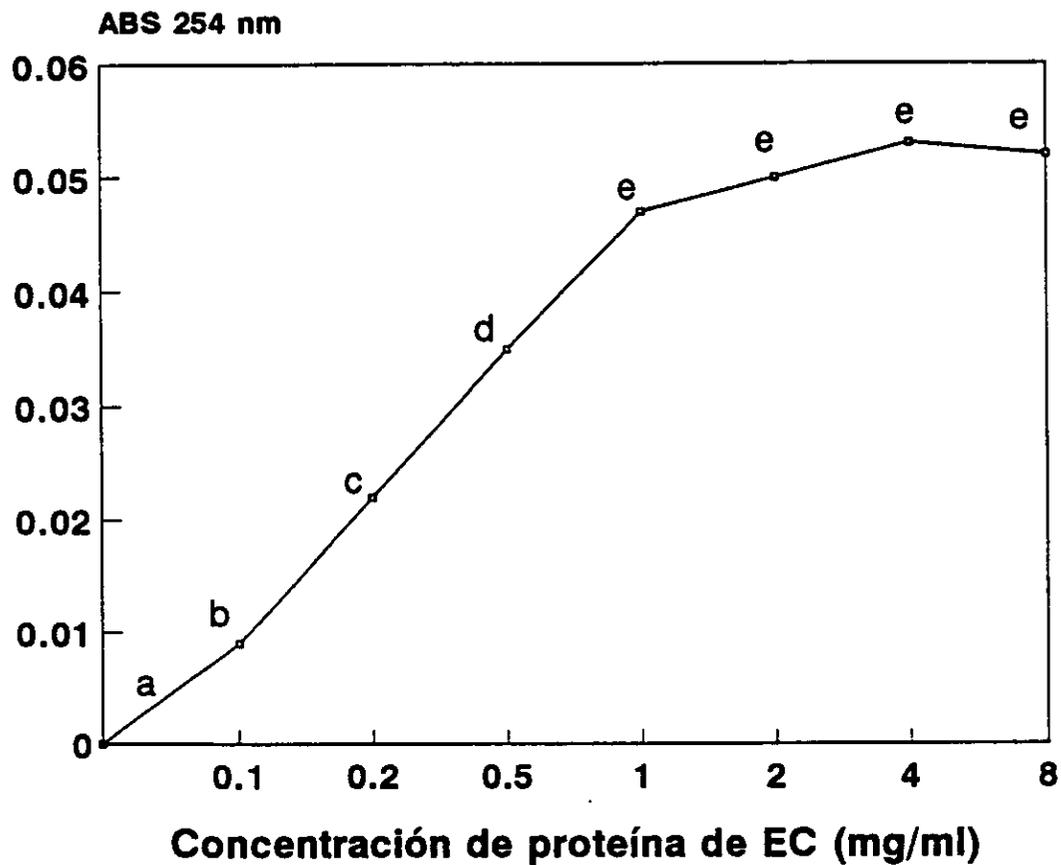


FIG. 7. ACTIVIDAD DE TIPO CARBOXIPEPTIDASA USANDO HPLA COMO SUBSTRATO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO CRUDO (PROTEINA) DE TRACTO DIGESTIVO DE CAMARON CAFE (Las letras diferentes indican diferencias significativas).

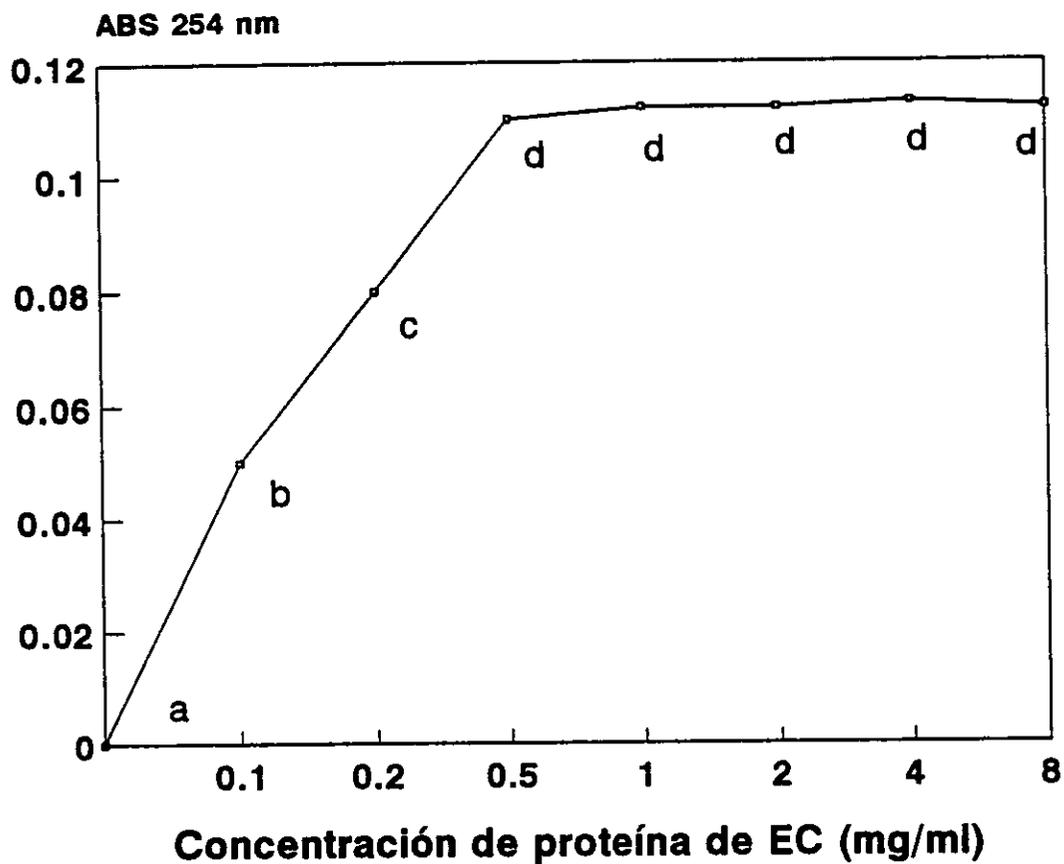


FIG. 8. ACTIVIDAD DE TIPO CARBOXIPEPTIDASA B USANDO HA COMO SUBSTRATO, A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO CRUDO (PROTEINA) DE TRACTO DIGESTIVO DE CAMARON CAFE.

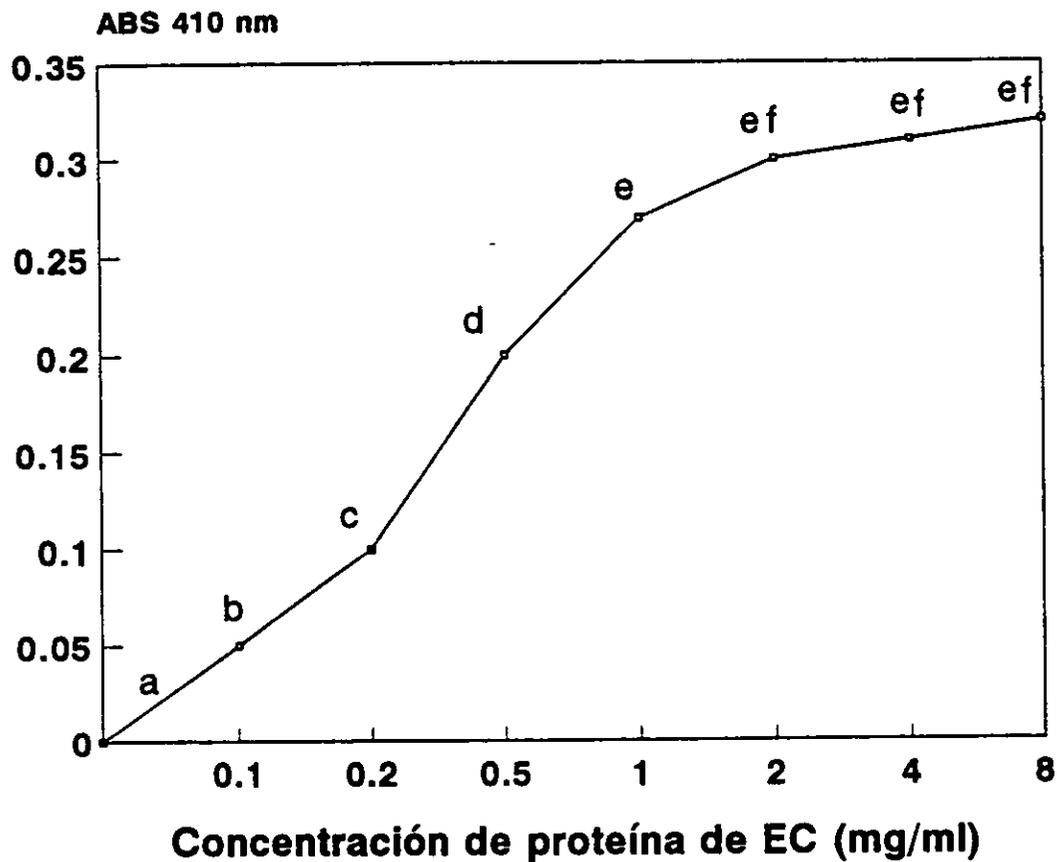


FIG. 9. ACTIVIDAD DE TIPO LEUCINO AMINOPEPTIDASA USANDO LAPNA COMO SUBSTRATO, A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO CRUDO (PROTEINA) DE TRACTO DIGESTIVO DE CAMARON CAFE.

7.1.1 Endoproteasas.

Actividad de tipo tripsina.

La actividad de tipo-tripsina (Fig.10) fue detectada utilizando el sustrato sintético específico TAME y registrando el cambio de absorbancia a una longitud de onda de 247 nm. En los extractos de tracto digestivo de *P. californiensis* se pudo detectar una mayor actividad de tipo tripsina en relación a la actividad encontrada con la actividad de tripsina purificada de páncreas bovino (1 mg/ml) , utilizada como control positivo. Se pudo demostrar una efectiva inhibición (100 %) al utilizar el inhibidor SBTI (inhibidor de tripsina de frijól de soya). No se pudo detectar una hidrólisis espontánea de importancia en el TAME.

Actividad de tipo quimotripsina.

La actividad de tipo quimotripsina (Fig.11) fue detectada utilizando BTEE como sustrato y registrando el cambio de absorbancia 256 nm. La utilización del BTEE conllevó algunas complicaciones debidas a las altas lecturas que presenta el sustrato "per se". Hubo necesidad de modificar la técnica para poder llevar a cabo la detección y registrar de una manera clara el cambio de absorbancia. Tal como se esperaba, no se encontró inhibición de la actividad utilizando TLCK; lo anterior debido a que aunque el TLCK es un inhibidor específico de serin-proteasas, únicamente afecta a la tripsina y no a la quimotripsina, cuyo inhibidor específico es el Tosil-fenilalanina Clorometil Cetona (TPCK), el cual lamentablemente no fue posible tenerlo disponible para este estudio. Se determinó inhibición con PMSF (inhibidor de proteasas serínicas incluida la quimotripsina). Se observó asimismo una evidente hidrólisis espontánea del

substrato, pero no fué lo suficientemente alta como para enmascarar la actividad presente en EC y de la enzima purificada.

Adicionalmente se detectó actividad de tipo-quimotripsina utilizando el substrato SAPNA. La actividad del extracto de tracto digestivo de camarón fué de 2.2 unidades por mg de proteína (incremento de absorbancia a 410 nm por minuto por mg de proteína). Una solución de quimotripsina bovina (1 mg/ml) dió 87.2 unidades/mg de proteína. La adición de PMSF resultó en el abatimiento de las actividades a 0.0 y 6.3 para el extracto y la quimotripsina bovina respectivamente (resultados no graficados).

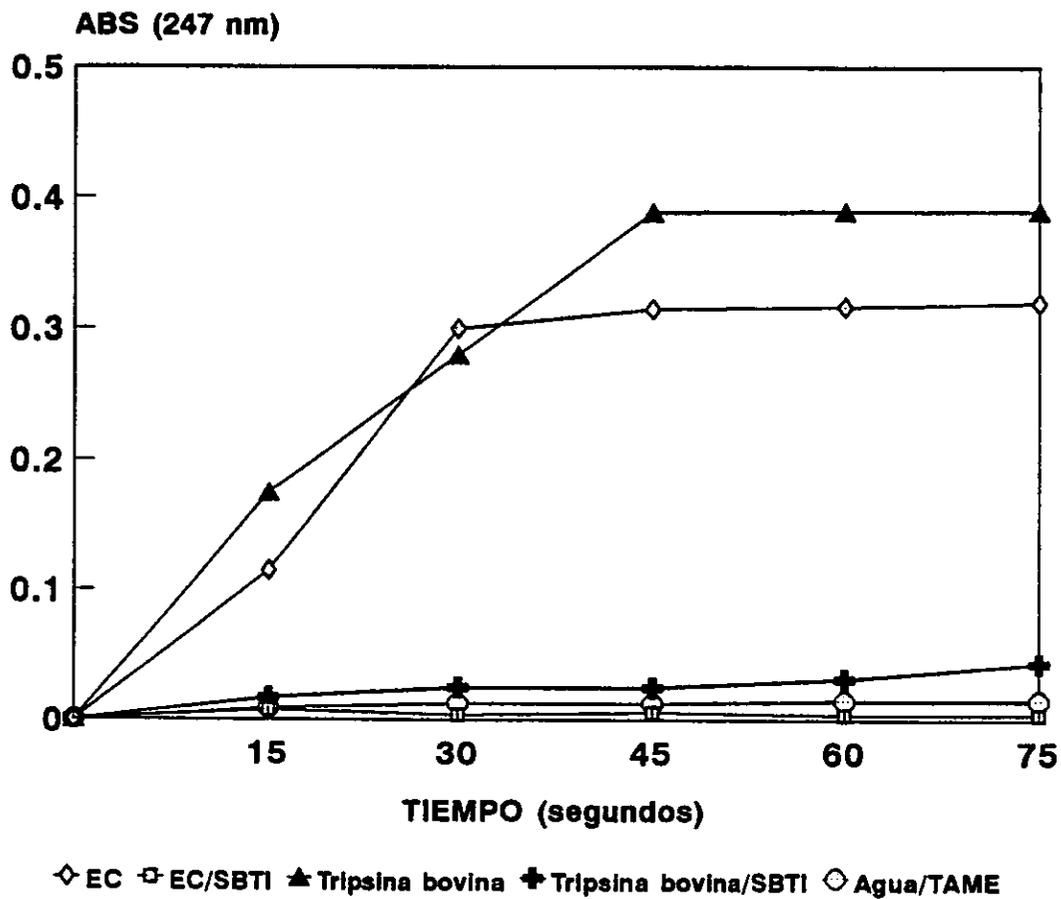


FIG. 10. ACTIVIDAD DE TIPO TRIPSINA DETECTADA EN EL EXTRACTO DEL TRACTO DIGESTIVO DEL CAMARON CAFE.

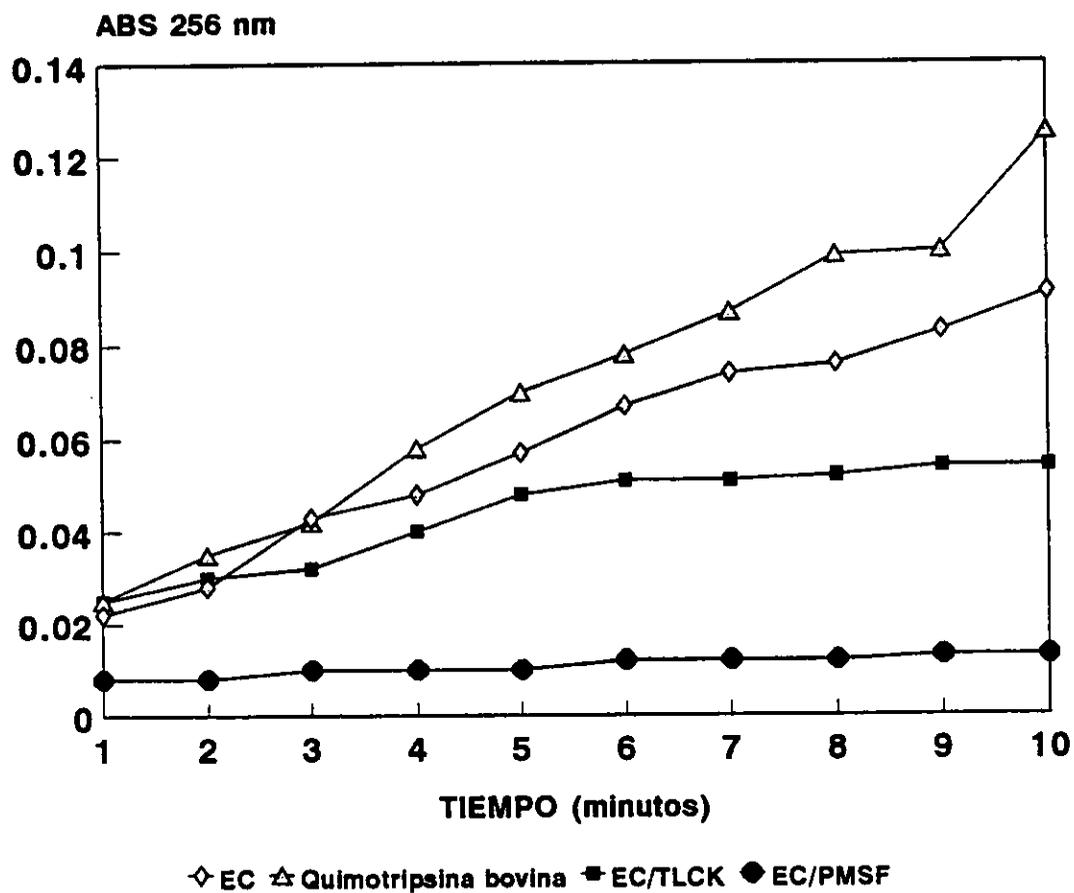


FIG. 11. ACTIVIDAD DE TIPO QUIMOTRIPSINA DETECTADA EN EL EXTRACTO DEL TRACTO DIGESTIVO DEL CAMARON CAFE.

7.1.2 Exoproteasas.

Actividad de tipo carboxipeptidasa A .

La actividad de tipo carboxipeptidasa A (Fig.12) se realizó utilizando el sustrato sintético HPLA. La actividad del EC fue inhibida (aprox. 60%) con el agente quelante 1,10 fenantrolina. Lo anterior sugiere que la actividad enzimática que hidroliza el sustrato HPLA es dependiente de cationes divalentes. Como se esperaba, la tripsina bovina no demostró capacidad de degradar el HPLA.

Actividad de tipo carboxipeptidasa B

La presencia de actividad de tipo carboxipeptidasa B (Fig.13) se demostró utilizando el sustrato específico hipuril arginina (HA), registrando el cambio de absorbancia a una longitud de onda de 254 nm. Utilizando HA como sustrato se pudo evidenciar actividad de tipo carboxipeptidasa B, misma que fué parcialmente inhibida con el quelante 1,10-fenantrolina. Lo anterior sugiere que la actividad enzimática que hidroliza al sustrato HA es dependiente de iones divalentes. Como se esperaba, la tripsina bovina no demostró poseer capacidad de degradar el HA.

Actividad de tipo leucino-aminopeptidasa.

La actividad de tipo leucino-aminopeptidasa (Fig.14) se evidenció utilizando el sustrato específico LPNA. A través de la utilización del LPNA se pudo constatar la presencia de actividad de tipo leucino-aminopeptidasa en el extracto crudo del tracto digestivo, misma que se vió disminuida por la adición del quelante EDTA, dando como

resultado el abatimiento total de la actividad en estas condiciones experimentales. Esto confirma el requerimiento de iones divalentes como activadores de la actividad de tipo leucino aminopeptidasa del EC de camarón café.

Actividad de tipo-pepsina.

No se detectó actividad de tipo pepsina en el extracto de tracto digestivo de camarón café. La Tabla 2 muestra la actividad de proteasas específicas y la actividad remanente después de su exposición a inhibidores específicos.

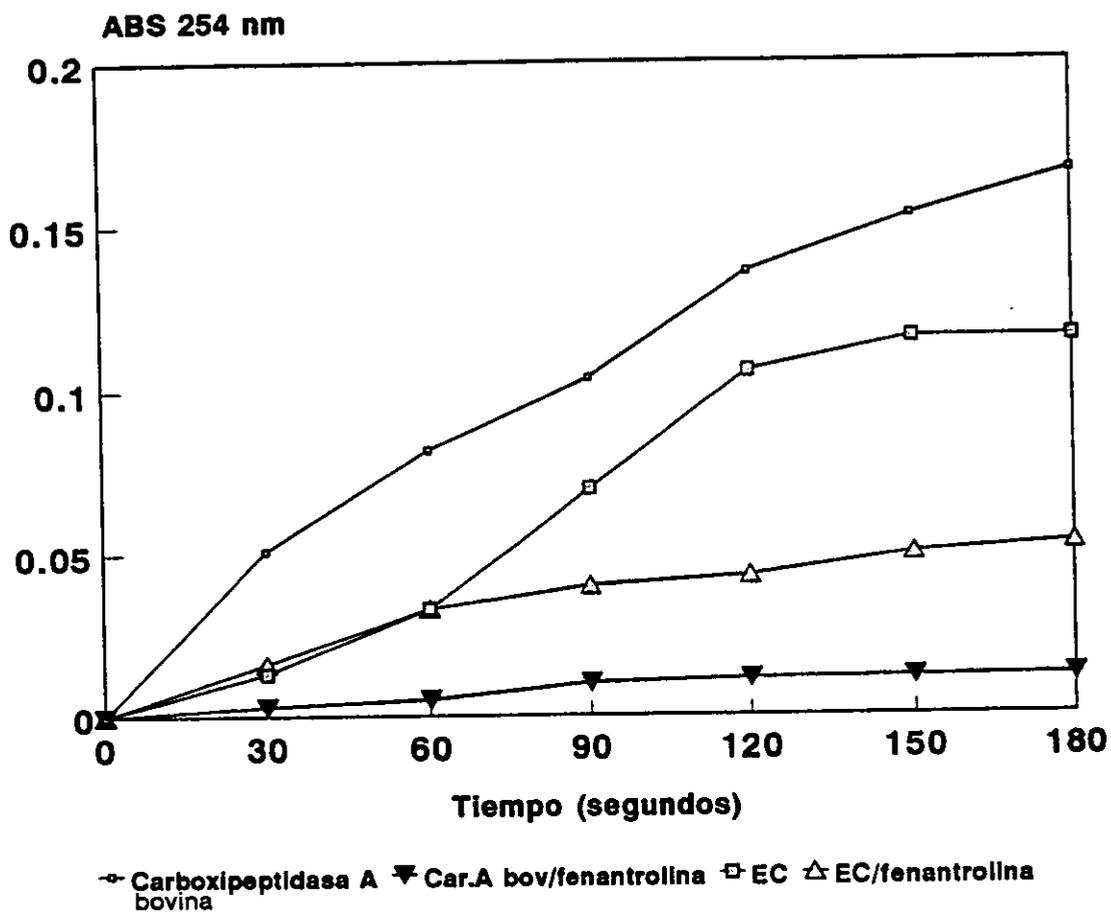


FIG. 12. ACTIVIDAD DE TIPO CARBOXIPEPTIDASA "A" DETECTADA EN EL EXTRACTO DEL TRACTO DIGESTIVO DEL CAMARON CAFE.

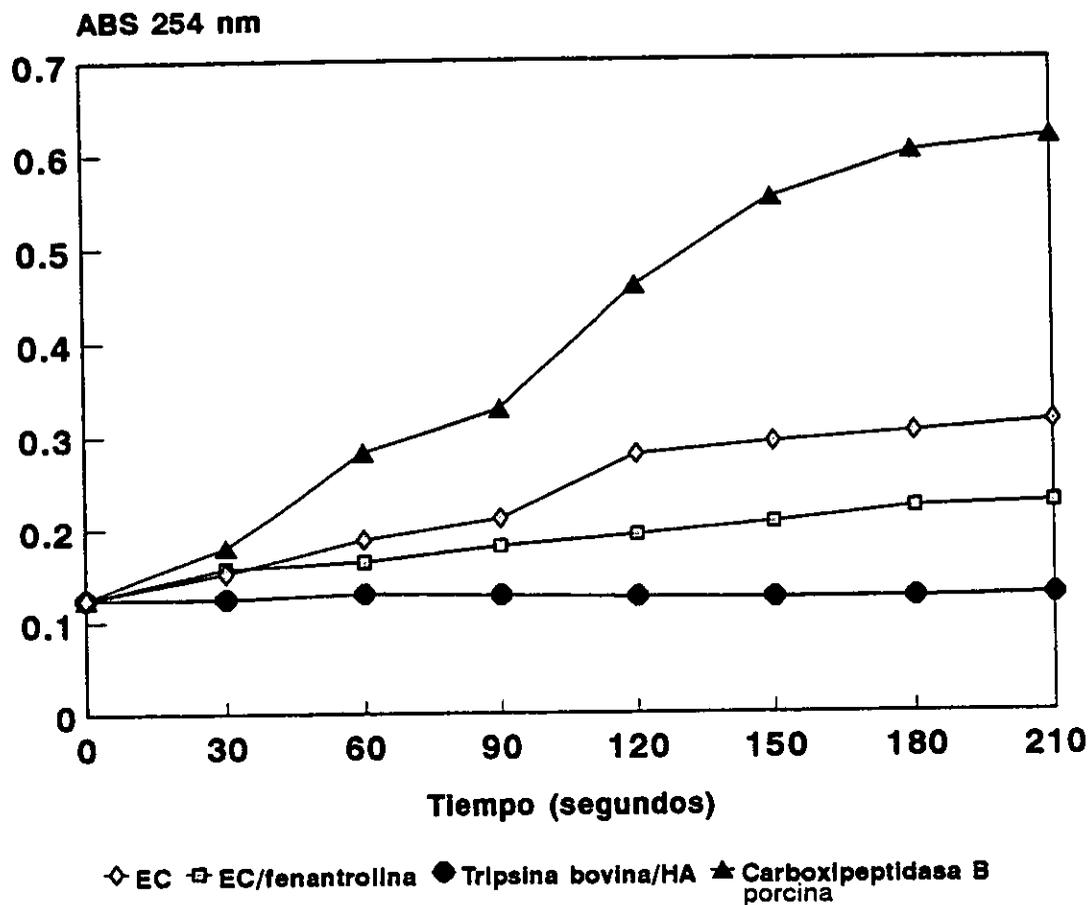


FIG. 13. ACTIVIDAD DE TIPO CARBOXIPEPTIDASA "B" DETECTADA EN EL EXTRACTO DEL TRACTO DIGESTIVO DEL CAMARON CAFE.

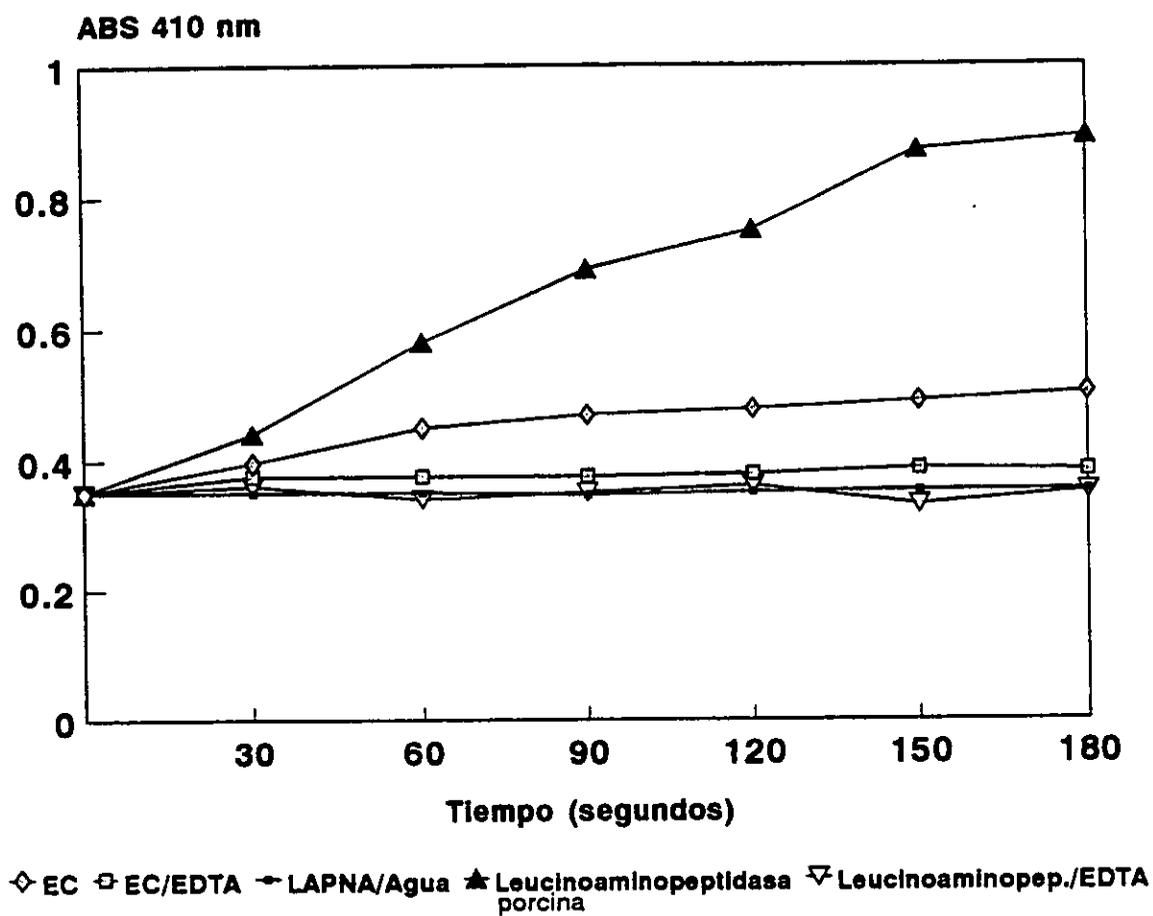


FIG. 14. ACTIVIDAD DE TIPO LEUCINO-AMINOPEPTIDASA DETECTADA EN EL EXTRACTO DEL TRACTO DIGESTIVO DEL CAMARON CAFE.

TABLA 2. ACTIVIDAD (*) DE LAS DIFERENTES PROTEASAS DETECTADAS EN EL TRACTO DIGESTIVO DE *Penaeus californiensis*.

Proteasa	Actividad específica	Actividad relativa
	$\mu\text{g/ml}$	(%)
Tripsina	0.6	100
Tripsina + SBTI	0.2	1.8
Quimotripsina	0.68	100
Quimotripsina + TPCK	0.20	29.4
Carboxipeptidase A	2.81	100
Carboxipeptidasa A + 1,10 fenantrolina	1.06	37
Carboxipeptidasa B	3.6	100
Carboxipeptidasa B + 1, 10 fenantrolina	1.76	48
Leucinoaminopeptidasa	11.4	100
Leucinoaminopeptidasa + EDTA	3.0	26

*Actividad bajo las condiciones experimentales descritas.

Una unidad de enzima fue definida como la cantidad de enzima requerida para incrementar la densidad óptica en 0.001 (por degradación del sustrato correspondiente) por minuto y por mg de proteína soluble.

7.2 Actividad amilolítica asociada al tracto digestivo de *Penaeus californiensis*.

Las condiciones óptimas para la actividad de amilasa total fueron establecidas dentro de los parámetros considerados en este estudio. Utilizando como sustrato el almidón al 1%, se encontró la mayor actividad a valores de pH de entre 6.5 y 8 (habiéndose estudiado en un rango de 5.5. a 10) con un valor de pH óptimo de 7.5 (Fig. 15).

El efecto de la temperatura en la actividad de amilasa fue determinado en un rango de 20 a 60°C; el extracto crudo de camarón café demostró poseer actividad máxima a temperaturas entre 30 y 40°C (Fig.16).

El efecto de la salinidad en la actividad de la amilasa fue evaluado a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (Fig.17). La actividad de amilasa del extracto crudo fue mayor a 0.01 M de NaCl. Mayores concentraciones de esta misma sal resultaron en un decremento gradual de la actividad, aún así, la amilasa cruda continuó mostrando actividad a concentraciones de 3M NaCl.

Como se puede ver en la Tabla 3, la actividad amilolítica fué inhibida por los siguientes cationes divalentes y quelantes (en orden decreciente):

$\text{Hg}^{+2} > \text{Zn}^{+2} > \text{Cu}^{+2} > \text{EDTA} > \text{Cr}^{+2}$. En contraste la actividad de amilasa fué incrementada por la presencia de Ca^{+2} y Mg^{+2} .

Los patrones electroforéticos de la proteínas totales del extracto crudo del tracto digestivo de *P. californiensis* son mostrados en la figura 18a. La figura 18b muestra las bandas con actividad de amilasa. Por lo menos dos bandas con actividad de amilasa pudieron ser diferenciadas con electroforésis en geles de poliacrilamida.

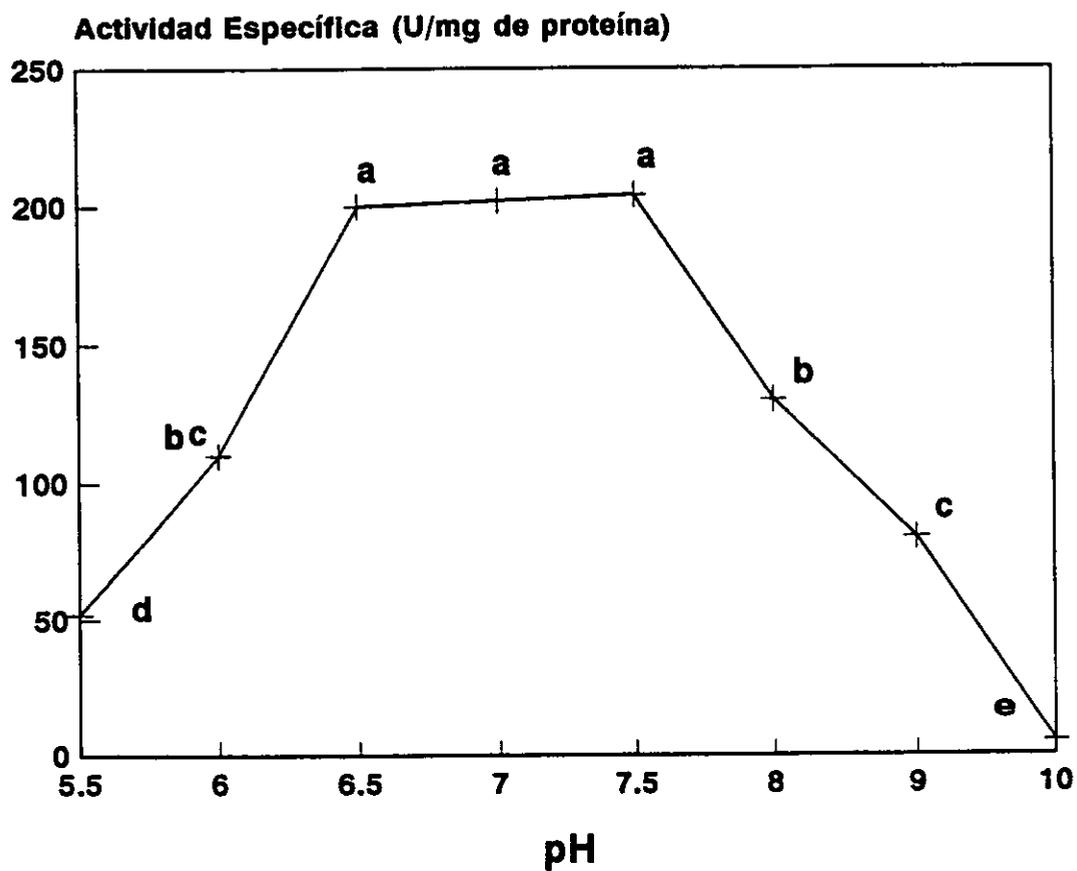


FIG. 15. EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD AMIOLITICA DEL EXTRACTO DEL TRACTO DIGESTIVO DEL CAMARON CAFE (Letras diferentes muestran diferencias significativas).

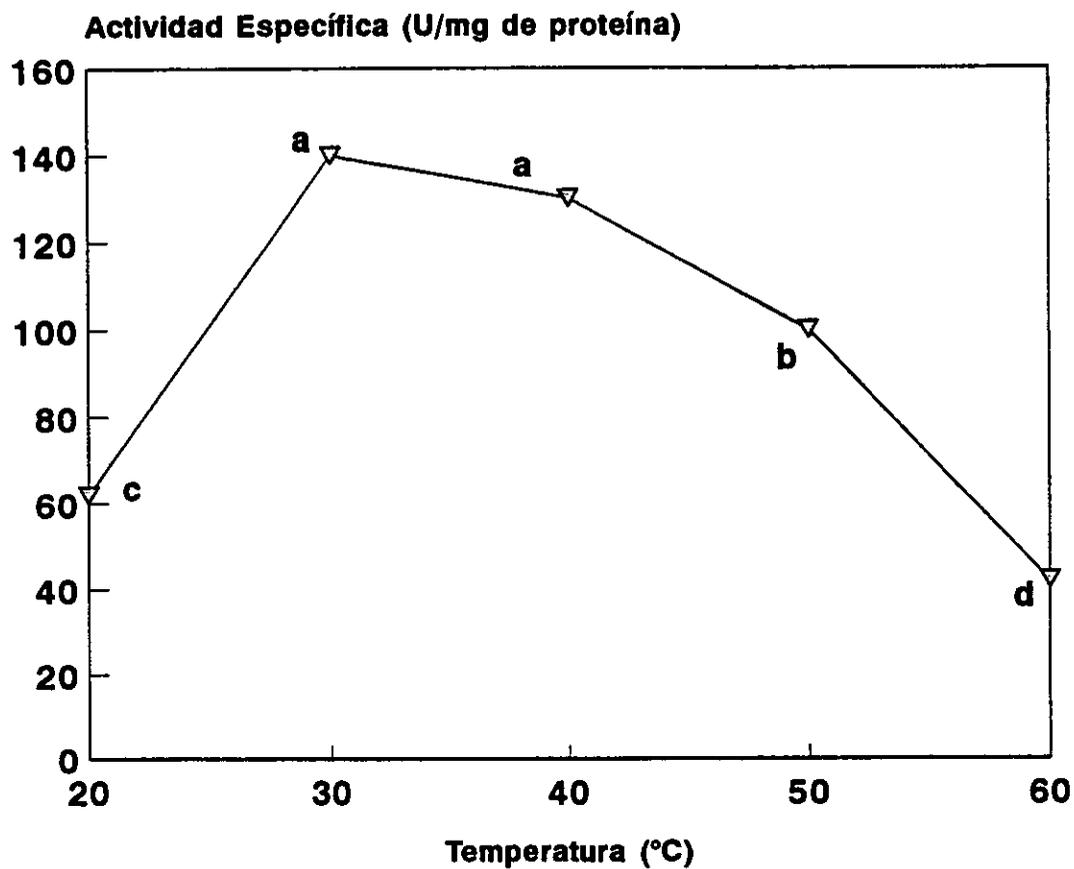


FIG. 16. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD AMIOLITICA DEL EXTRACTO CRUDO DE TRACTO DIGESTIVO DE CAMARON CAFE (Letras diferentes muestran diferencias significativas).

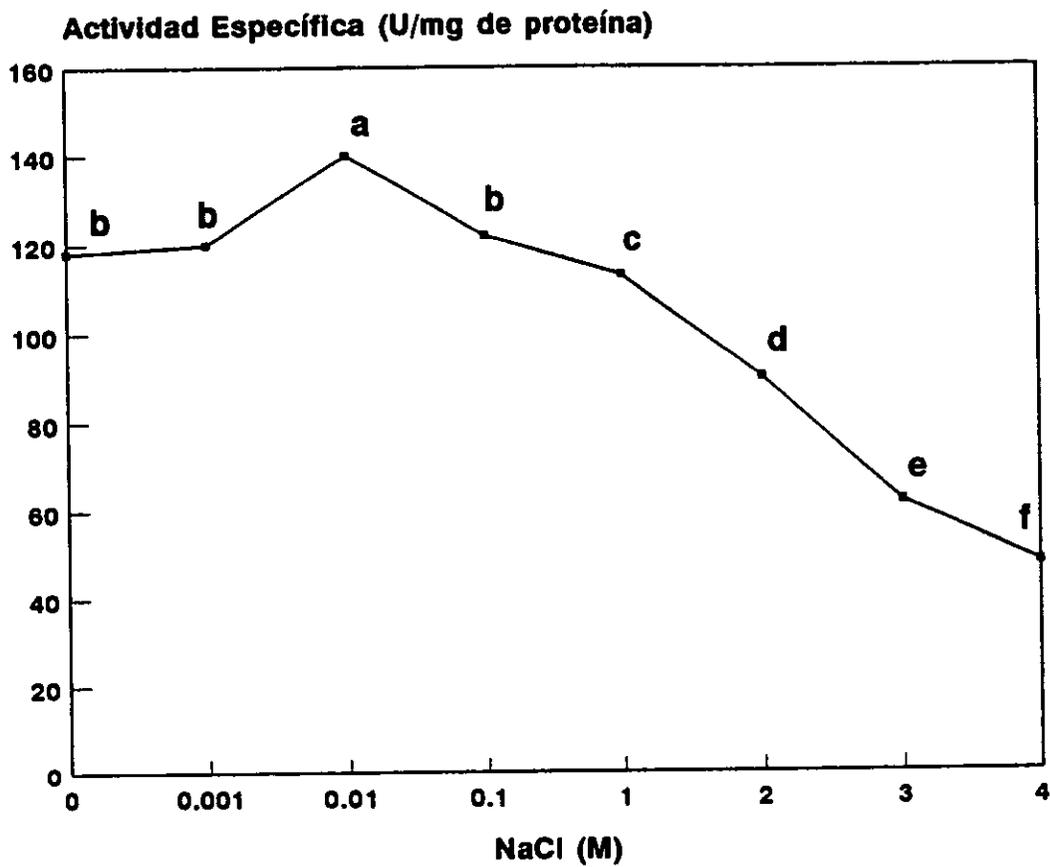


FIG. 17. EFECTO DE LA SALINDAD SOBRE LA ACTIVIDAD AMIOLITICA DEL EXTRACTO DEL TRACTO DIGESTIVO DE CAMARON CAFE (Letras diferentes muestran diferencias significativas).

TABLA 3.- EFECTO DE IONES DIVALENTES Y EDTA EN LA ACTIVIDAD DE AMILASA DEL TRACTO DIGESTIVO DE *Penaeus californiensis*.

Ión	*Actividad relativa (%)
Control	100
Hg ⁺²	4
Ca ⁺²	122
Cu ⁺²	11
Cr ⁺²	61
Zn ⁺²	6
Mg ⁺²	170
EDTA	31

*Actividad remanente tomando como referencia la actividad encontrada en el control. La actividad remanente se determinó después de la incubación del EC por 60 minutos con el catión o EDTA respectivamente. La actividad específica del Control fue de 120 U/mg de proteína.

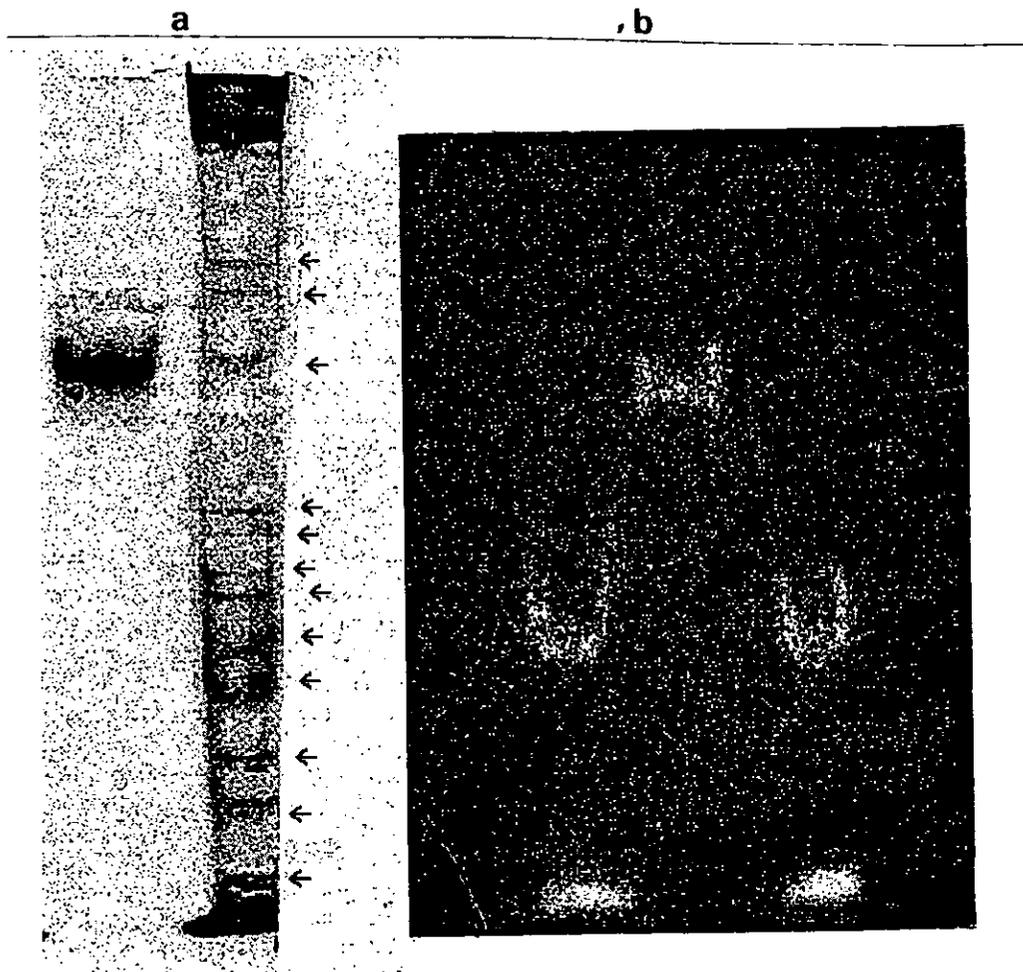


FIG. 18. (a) PAGE DEL EXTRACTO CRUDO DE SISTEMA DIGESTIVO DE CAMARON CAFE (Se presenta un carril con extracto crudo y el central con la amilasa de referencia. Las flechas indican las bandas de proteína teñidas). (b) GELES DE AGAROSA-ALMIDON MOSTRANDO LAS BANDAS CON ACTIVIDAD DE AMILASA EN EL EXTRACTO CRUDO DEL TRACTO DIGESTIVO DE CAMARON CAFE (el revelado presenta la actividad amilasa de las bandas de proteína del gel (PAGE)).

7.3 Actividad proteolítica y amilolítica en los extractos de tracto digestivo de juveniles de camarón café sometidos a diferentes regimenes alimenticios.

En relación a los resultados de ganancia de peso (Fig. 19) se pudo constatar que los camarones alimentados con dietas conteniendo harina de langostilla alcanzaron pesos finales mayores a aquellos alimentados con la dieta base y con las dietas comerciales (estos resultados correspondieron a la tesis de Licenciatura en Biología de Ma. Teresa Camarillo, en proceso de redacción). El mayor crecimiento fué obtenido con la dieta S66P, mientras que niveles mayores y menores de sustitución, con respecto a S66P, dieron un incremento de peso menor y no significativamente superior a la dieta base. Un patrón similar se observó con la sustitución de la harina de soya y de camarón. El contenido de proteína de los extractos del tracto digestivo de los camarones sometidos a diferentes dietas se presenta en la Tabla 4. En esta tabla es posible apreciar diferencias significativas entre las concentraciones de proteína de los extractos. De esta manera encontramos que las concentraciones de proteína mas altas se dieron en S33P, S66P, S100P y PURINA 35, mientras que las menores fueron encontradas en S33S, S66S y S100S.

En lo que se refiere a los valores de actividad enzimática digestiva tanto de amilasas como de proteasas, encontramos que los valores obtenidos (actividad específica) con animales obtenidos del medio silvestre fueron un 40% más altos que los encontrados en extractos de animales cultivados, estos últimos fueron con los que se trabajó en esta sección, mientras que los silvestres fueron utilizados en las dos primeras secciones.

Tabla 4. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DE LOS EXTRACTOS DEL TRACTO DIGESTIVO DE ORGANISMOS DE *Penaeus californiensis* SOMETIDOS A DIFERENTES REGÍMENES DIETÉTICOS.

Dieta suministrada	Concentración protéica de EC de camarones alimentados con las diferentes dietas (mg/ml)
DB (CONTROL)	13.2 (ab)(*)
S33P	15.6 (a)
S66P	15.7 (a)
S100P	17.1 (a)
S100C	12.2 (ab)
S33S	10.8 (b)
S66S	10.4 (b)
S100S	10.8 (b)
PURINA 35	16.0 (a)
PURINA 40	12.4 (ab)

(*) Las letras diferentes muestran diferencias significativas entre las concentraciones de proteína de los extractos.

Actividad proteolítica de los extractos del tracto digestivo

La actividad proteolítica, expresada como actividad específica, asociada a los tractos digestivos de los grupos de organismos alimentados con las diferentes dietas, fué modificada por los tratamientos. Sin embargo como se puede ver en la Fig 20, algunos valores de actividad específica de los extractos de camarones alimentados con las dietas experimentales fueron similares a los obtenidos en los organismos alimentados con la dieta base (DB). La actividad específica de los extractos de organismos alimentados con la dieta S33S fué ligeramente más alta que los resultados obtenidos al suministrar la dieta basal. Todos los tratamientos restantes dieron resultados estadísticamente similares a los obtenidos con DB, a excepción de los obtenidos al alimentar con la dietas comerciales PURINA 40 y S100 que produjeron menor actividad específica de proteasas.

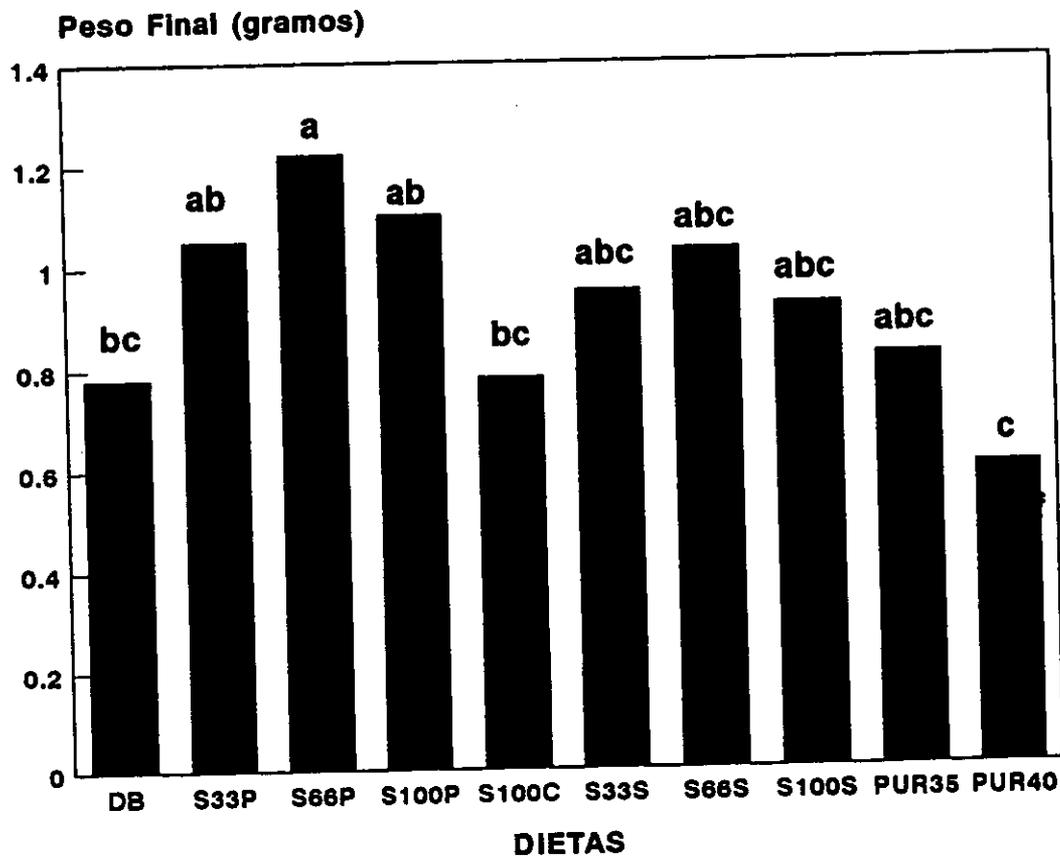


Fig. 19. PESO FINAL (EN GRAMOS) DE LOS ORGANISMOS ALIMENTADOS CON DIFERENTES DIETAS EXPERIMENTALES Y COMERCIALES (Letras diferentes muestran diferencias significativas).

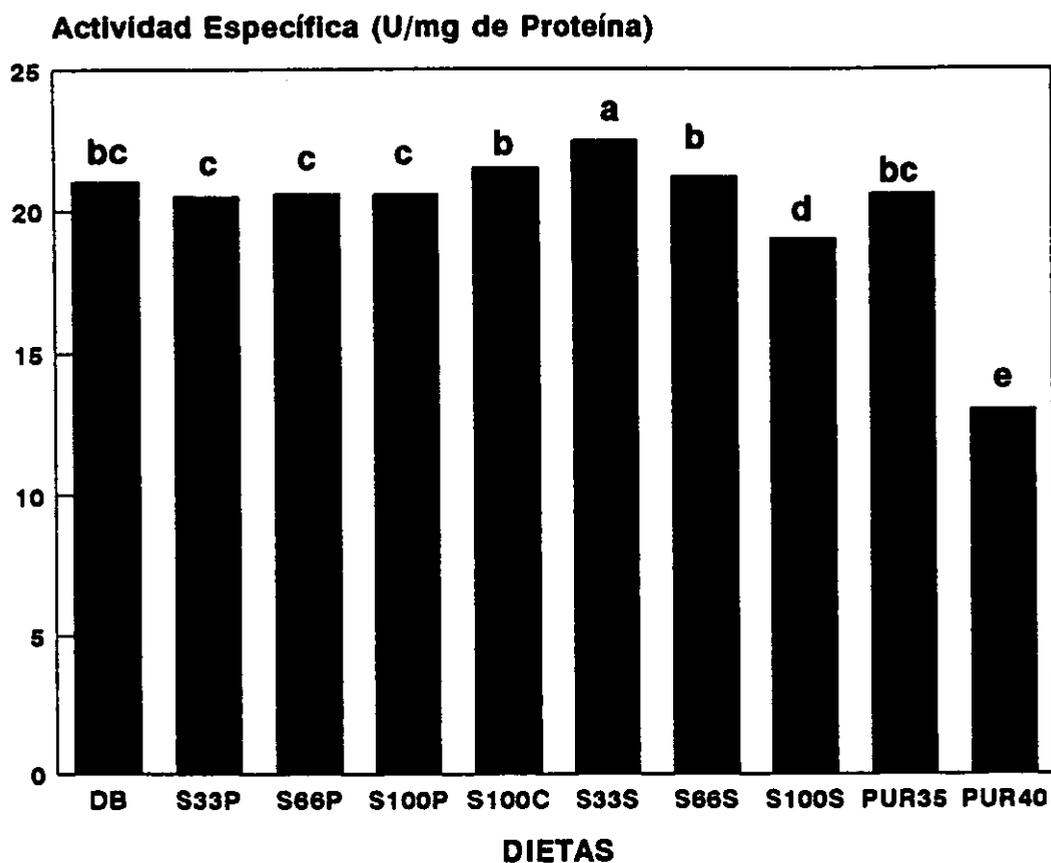


Fig. 20. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE PROTEASAS ENCONTRADA EN LOS EXTRACTOS DEL TRACTO DIGESTIVO DE ORGANISMOS ALIMENTADOS CON DIFERENTES DIETAS (Letras diferentes muestran diferencias significativas).

En las dietas donde se substituyó la harina de pescado por harina de langostilla se observó la mejor ganancia de peso, pero no hubo una correspondencia entre este resultado y el de actividad enzimática. Las tres substituciones de harina de pescado fueron estadísticamente iguales entre sí, en términos de ganancia de peso, y con respecto a la actividad proteolítica encontrada en el extracto de camarones DB ($P>0.05$).

En los extractos de tracto digestivo de camarones alimentados con las dietas donde se substituyó la harina de soya por la harina de langostilla fue la dieta S33S la que más actividad específica de proteasa produjo; sin embargo, la mejor ganancia de peso se logró con la dieta S66S, aunque las diferencias no son significativas. Los resultados demuestran una tendencia de disminución de la actividad específica de proteasas a medida que se incrementa el porcentaje de substitución de soya por langostilla.

En lo que se refiere a actividad proteolítica encontrada en los extractos del tracto digestivo de camarones alimentados con PURINA 35 y PURINA 40, los resultados muestran una tendencia inversa a la encontrada al nivel de proteína en la dieta: el alimento con un mayor porcentaje de proteína resultó en una menor actividad de proteasas a nivel de tracto digestivo del camarón café, mientras que el de menor porcentaje de proteína resultó en menor actividad proteolítica, similar a la encontrada al suministrar la DB.

Actividad amilolítica en extractos del tracto digestivo de organismos alimentados con diferentes dietas.

En lo que se refiere a la actividad amilolítica asociada al tracto digestivo de los organismos de camarón café alimentados con diferentes dietas (Fig. 21), el patrón de la actividad específica con respecto a los tratamientos fué contrastante en comparación con la actividad específica de proteasas (Fig. 15). Al incrementar los porcentajes de sustitución en las dietas (tanto de harina de pescado, camarón o de soya por harina de langostilla) se incrementó la actividad amilolítica del extracto de tracto digestivo.

En los extractos de camarones alimentados con las dietas de sustitución de harina de pescado por harina de langostilla, se observó una mayor actividad específica de amilasa en S100P, significativamente diferente a la de camarones alimentados con la DB ($P < 0.05$). Las sustituciones S33P y S66P aún y cuando fueron diferentes entre ellas no lo fueron con respecto a la DB. La sustitución de 100% de harina de camarón por harina de langostilla (S100C) incrementó la actividad enzimática amilasa con respecto a la de DB.

En los extractos de tracto digestivo alimentados con dietas donde se substituyó la harina de soya, en general se observó una mayor actividad de amilasa digestiva que en los alimentos donde se substituyó la harina de pescado. De hecho la mayor actividad de todos los tratamientos se logró con los alimentos S66S y S100S. Se puede suponer que efectivamente la sustitución de la harina de soya por harina de

langostilla, resultó en un incremento en la actividad de amilasa. Relacionando estos resultados con los de ganancia de peso, constatamos que aún y cuando con las dietas S33S, S66S y S100S se obtuvo un menor incremento de peso, con respecto a las sustituciones de pescado, en lo que respecta a las amilasas digestivas fué donde se encontró mayor actividad de amilasa. Por otro lado, los extractos de camarón alimentados con los alimentos comerciales demostraron una actividad amilasa similar a la de DB.

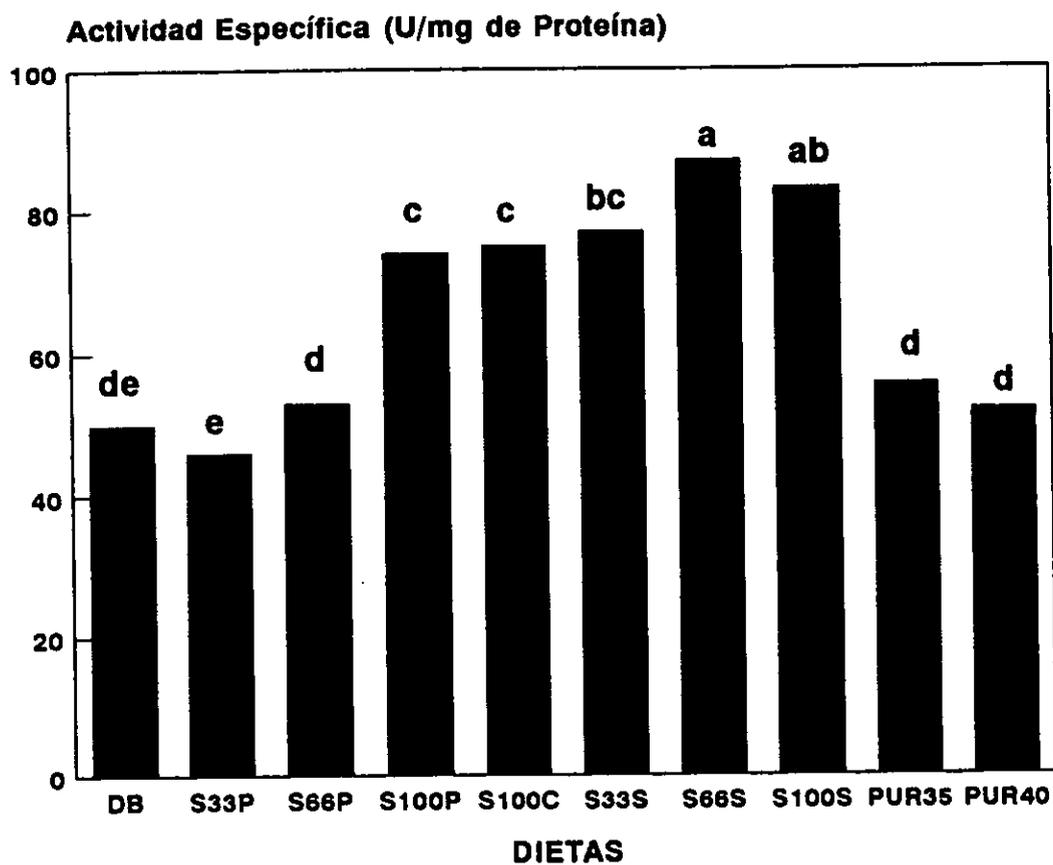


Fig. 21. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE AMILASA ENCONTRADA EN LOS EXTRACTOS DEL TRACTO DIGESTIVO DE ORGANISMOS ALIMENTADOS CON DIFERENTES DIETAS (Letras diferentes muestran diferencias significativas).

8. DISCUSION

8.1 Actividad proteolítica en el tracto digestivo del camarón café.

El extracto crudo (EC) fue obtenido a partir del tracto digestivo (estómago, hepatopáncreas e intestino) del camarón, no habiéndose realizado ningún proceso de purificación de las enzimas, debido a esto, las propiedades reportadas en este trabajo, pueden variar al compararlas con las propiedades de las enzimas purificadas.

Las propiedades generales de las proteasas de *P. californiensis* en lo que se refiere a pH, fueron muy similares a aquellas encontradas en los camarones *Penaeus kerathurus*, *P. japonicus*, *P. stylirostris*, *P. vannamei*, *P. monodon*, *P. merguensis*, *Palaemon serratus* (Van Wormhoudt, 1980; Galgani, 1983; Galgani, 1988; Jiang *et al*, 1991), la langosta *Panulirus japonicus* (Galgani y Nagayama, 1987) y la langostilla *Pleuroncodes planipes* (García-Carreño, 1992).

El pH óptimo para la actividad proteolítica en *P. californiensis* se encontró cercano al 8.0, menos alcalino que el pH óptimo reportado para los organismos antes mencionados, con excepción de *Palaemon serratus* y *Pleuroncodes planipes* cuyas proteasas mostraron también un máximo de actividad a pH 8. En contraste, las proteasas de *P. californiensis* no mostraron similitudes con las reportadas en *Homarus americanus* el cual presentó un pH óptimo más ácido (Biesot and McDowell, 1990).

La temperatura óptima para la actividad de proteasa presente en el EC fue de 50°C, seguida de una inactivación irreversible a 60°C. Esto corresponde con las temperaturas óptimas de actividad de proteasa reportadas para proteasas de *Penaeus kerathurus* (Galgani, 1983) y *Homarus americanus* (Biesot y McDowell, 1990), pero

difiere de *Palaemon serratus* (Van Wormhoudt, 1980) en el cual la máxima actividad se encontró a 40°C, *Panulirus japonicus* la cual tiene una máxima actividad a 60°C (Galgani y Nagayama, 1987), y de *Penaeus monodon* con un pico máximo de actividad entre 55°C y 65°C (Jiang *et al*, 1991). La actividad proteolítica asociada al tracto digestivo del camarón café, mostró un rango amplio de actividad en función de la temperatura. Aún y cuando estos resultados son productos de ensayos "in vitro", es probable que las propiedades encontradas de las enzimas puedan estar relacionadas con su actividad fisiológica, indicando esto que las enzimas proteolíticas del camarón son activas a las temperaturas corporales dependientes de la temperatura del agua (25-27°C).

El papel del NaCl en la actividad de proteasas generales fue asimismo evaluado. El incremento de salinidad (NaCl) no aumentó la actividad de proteasas generales del extracto crudo del tracto digestivo de *P. californiensis*. Aún así, las proteasas de *P. californiensis* parecen ser halotolerantes, con capacidad de conservar hasta un 50% de su actividad a 2 M de cloruro de sodio. Existe cierta similitud con lo encontrado por Biesiot y McDowell (1991) en *Homarus americanus* en donde concentraciones de 0.0 a 0.7 M no afectaron significativamente la actividad de la proteasas.

Según Galgani (1983), la inhibición debida a la acción de algunos cationes metálicos puede estar ligada al bloqueo del sitio catalítico o a la substitución de un cofactor metálico esencial de una o de varias proteasas. Los agentes quelantes como el EDTA y la 1-10 fenantrolina disminuyeron la actividad proteolítica lo cual sugiere la

presencia de enzimas cuya actividad es dependiente total o parcialmente de la presencia de cationes divalentes; en este grupo se pudiera incluir a las de tipo carboxipeptidasa, las cuales se han reportado como activadas por iones divalentes y presentes en otros camarones (Galgani, 1983).

A partir de los resultados anteriores se puede intentar encontrar ciertas implicaciones eco-fisiológicas de la actividad enzimática de proteasas digestivas en los camarones silvestres. Si se toma en cuenta que el sistema digestivo de los crustáceos es prácticamente un tubo abierto al medio, deberá considerarse que efectivamente la actividad enzimática digestiva deberá estar adaptada a este y a sus variaciones. De esta manera se entiende que dadas las condiciones de ligera alcalinidad del mediomarino, la actividad óptima de las proteasas se sitúe también dentro de límites ligeramente alcalinos y por otro lado se tenga una completa ausencia de actividad de tipo pepsina, tal y como se ha demostrado para todas las especies de crustáceos.

La actividad proteolítica del extracto crudo del camarón café fue en general inhibida por la adición de cationes divalentes. A la concentración utilizada en este estudio, solamente el Mg^{+2} y el Ca^{+2} no ejercieron un efecto negativo. La presencia de proteasas del grupo serina (tripsina y quimotripsina) fué determinada por la inhibición causada por TLCK, PMSF y SBTI; la existencia de proteasas cisteínicas en el extracto crudo fué revelada por la inhibición provocada por DTT y IA; finalmente el efecto negativo del EDTA y PT sobre la actividad proteolítica demostró la presencia de metalo-proteasas activadas por iones divalentes.

El análisis electroforético mostró, por lo menos ocho bandas de actividad de proteasa, esto es similar a lo encontrado por Galgani (1983) con *P. kerathurus* (ocho bandas) y cercano a lo encontrado por García-Carreño (1992) con *Pleuroncodes planipes* (nueve bandas).

En lo que se refiere a la detección de actividad específica de endoproteasas y exoproteasas, los resultados nos permiten confirmar la presencia de todas a excepción de pepsina. Lo anterior concuerda con gran parte de los trabajos realizados por otros autores en diversas especies de peneidos (Galgani, 1984; Lee *et al.* 1984; Jiang *et al.* 1991) é incluso en otras especies de crustáceos decápodos (Lee *et al.*, 1980; Galgani y Nagayama, 1987; García-Carreño y Haard, 1993). Caso particular lo representa la quimotripsina, en cuya detección se ha dado una gran controversia en las diferentes especies de crustáceos decápodos. Aparentemente algunos autores citan la actividad de la misma, mientras que otros (en la misma especie) no llegan a detectar esta actividad. Aparentemente el problema se basa en la elección del substrato para la detección de esta endoproteasa. Los substratos que reportan una detección positiva son generalmente SAPNA y BTEE mientras que otros pueden ó no demostrar esta actividad (Hernández-Cortéz, 1993). En nuestro trabajo se utilizó el BTEE y SAPNA, a través de los cuales podemos evidenciar la actividad esterásica de tipo quimotripsina en el camarón café. En el caso del substrato BTEE se modificó la concentración final del mismo de acuerdo a lo sugerido por Asgeirsson (com. pers. con Hernández-Cortéz, 1994). Lo anterior debido a que la técnica original no permite una determinación efectiva, dadas las altas lecturas de la solución de substrato.

Los resultados obtenidos en este trabajo con *P. californiensis*, nos permiten evidenciar que esta especie posee una capacidad proteolítica digestiva comparable a la descrita para especies mas evolucionadas. En efecto, la presencia de actividades de tipo tripsina, quimotripsina, de tipo carboxipeptidasa A y B y de tipo leucino aminopeptidasa sugiere un modelo de degradación que en términos generales sería comparable al de los vertebrados: fragmentación de las proteínas ingeridas por la endoproteasas y degradación de los péptidos por la exoproteasas. Sin embargo, algunas diferencias importantes con animales superiores también se dan, tal es el caso de la baja actividad de quimotripsina y la ausencia de pepsina encontrada en *P. californiensis*. Según Guillaume (comunicación personal, 1996), la pepsina se encuentra en algunos organismos marinos superiores como los peces con estómago, y por el contrario esta misma enzima no se detecta en peces que carecen de este órgano. La cantidad de agua marina que ingiere el camarón a través de su sistema digestivo abierto, no permiten la acidificación del tracto digestivo y por consecuencia la expresión activa de enzimas ácidas como la pepsina sería imposible, en el hipotético caso de que el organismo contara con ellas.

8.2 Actividad amilolítica en el tracto digestivo del camarón café.

El EC fue obtenida del tracto digestivo completo del camarón (intestino, estómago y hepatopáncreas). Debido a que no se realizaron intentos por separar estos tejidos, el origen específico de la actividad de amilasa del tracto digestivo del camarón café queda aún por determinar, sin embargo, y haciendo referencia a los trabajos de Barker

(1976), Barker y Gibson (1977), Gibson (1981) y Gibson y Barker (1987), es muy posible que sea el mismo hepatopáncreas el encargado de producir esta enzima.

Las propiedades de las amilasas digestivas de *P. californiensis* en función del pH se encontraron diferentes a aquellas referidas para *Palaemon serratus* (Van Wormhoudt, 1974), *Parapenaeopsis harwickii*, *P. stylifera* (Kulkarni et al., 1979) y *Homarus americanus* (Biesot y McDowell, 1990). El pH óptimo para la actividad de amilasa en *P. californiensis* se encontró entre 6 y 8 con una actividad máxima alrededor de 7.5 ; esto es a pH más alcalino que los organismos mencionados anteriormente donde el máximo de actividad se ha reportado a pH 6.5 .

La temperatura óptima para la actividad de amilasa se encontró entre 30 y 40°C. Esto corresponde a los óptimos de temperatura encontrados para la actividad de amilasa en *Palaemon serratus* (Van Wormhoudt, 1974), *Parapenaeopsis harwickii* y *Parapenaeopsis stylifera* (Kulkarni et al., 1979). Por otro lado nuestros resultados difieren con los óptimos de temperatura encontrados en amilasa(s) de *Homarus americanus* (Biesot y McDowell, 1990) en la cual la actividad de amilasa demostró ser más termofílica, con un óptimo a 50°C. Menores temperaturas a las registradas como óptimas (30°C) provocaron la disminución de la actividad de la amilasa de manera pronunciada, mientras que temperaturas mayores no lo causaron hasta cierto límite. Si consideramos que las poblaciones de *P. californiensis* se encuentran en una zona de temperaturas tropicales (Pacífico mexicano hasta Ecuador), se podría suponer que las enzimas del tracto digestivo de este camarón están adaptadas para trabajar en temperaturas relativamente altas, sin embargo, *Homarus americanus* a pesar de ser un

organismo adaptado a medio templado posee una actividad amilasa cuyo pico de mayor actividad se encuentra a una temperatura aún mayor que la del camarón café.

El papel del NaCl como un activador de la amilasa fue asimismo demostrado para la amilasa del camarón café. La enzima presentó una mayor actividad a concentraciones bajas de cloruro de sodio (0.01 M), lo cual es similar a lo encontrado en *P. serratus* (Van Wormhoudt, 1974) y en la amilasa de algunos cangrejos (Blandamer y Beechey, 1964). Sin embargo las amilasas de *P. californiensis* demostraron poseer propiedad de halotolerancia, siendo capaces de conservar hasta el 50% de su máxima actividad a una alta concentración (3 M) de NaCl. Considerando que el sistema digestivo de los crustáceos en general es un sistema abierto, en constante contacto con el medio ambiente y sus variaciones físicas y químicas, se sugiere que la actividad enzimática digestiva deberá estar adaptada a estas. Los resultados experimentales nos muestran una actividad óptima a un pH neutro con una ligera tendencia a la alcalinidad. En el conocimiento de que el medio marino es ligeramente alcalino, es pues evidente que la actividad óptima de las amilasas se encuentra situada también dentro de los rangos de pH encontrados en el medio natural. Aún y cuando se pudo evidenciar que la amilasa es activada por bajas concentraciones de NaCl (0.01M), así también se evidenció su actividad a la concentración salina del agua de mar (alrededor de 0.5-0.6 M NaCl). Incluso, solo se pudo percibir un descenso dramático de la actividad a concentraciones de NaCl superiores al normal encontrado en el agua marina. Lo anterior hace suponer que aún en condiciones de hipersalinidad del medio, esta actividad se mantendría. Cabe hacer

mención que en resultados experimentales no publicados, se ha observado que *Penaeus californiensis* cultivado en estanques, soporta salinidades de hasta 44 ppm, superiores a las encontradas en el medio natural (33 ppm NaCl) (Martínez-Córdova *et al.* 1998).

La amilasa de *Penaeus californiensis* se vió inhibida por los iones divalentes Hg^{+2} , Cu^{+2} , Cr^{+2} y Zn^{+2} , cual concuerda con los datos obtenidos por Van Wormhoudt (1974) con *Palaemon serratus* en donde la actividad se vió disminuida en presencia de Cu^{+2} y Zn^{+2} . El EDTA, redujo la actividad de la amilasa en *P. californiensis*; esto sugiere la posibilidad de que algunos cationes divalentes pueden tener un efecto de activación de las amilasas asociadas al tracto digestivo de este organismo. Estos cationes aparentemente son el Mg^{+2} y Ca^{+2} pues su adición a la mezcla de reacción provocó el aumento de actividad en relación al control. Van Wormhoudt (1974) encontró que en *P. serratus*, el EDTA no tuvo un efecto significativo en la actividad de amilasa misma que fué efectivamente activada por $Mn^{+2} > Mg^{+2} > Ca^{+2}$. La comparación que hacemos de la amilasa del camarón café con la de la *P. serratus* nos hace pensar que aún y cuando se traten de dos crustáceos decápodos con cierta relacion filogenética, las enzimas digestivas, en este caso la amilasa pueden presentar características diferentes.

El análisis electroforético del extracto crudo muestra que existen por lo menos dos bandas con actividad de amilasa, desafortunadamente no se llegó a realizar una purificación de estas por lo que se desconocen las características particulares de cada enzima. Es necesario recalcar que estos resultados estan basados en el análisis del

extracto crudo por lo tanto algunas de las propiedades de las amilasas reportadas aquí pueden variar de las propiedades de las enzimas purificadas.

8.3 Variación de la actividad enzimática digestiva del camarón café alimentado con dietas experimentales.

El análisis de los resultados de ganancia de peso y los de actividad enzimática en base a una determinada dieta suministrada, no permiten establecer una correspondencia clara entre unos y otros. Aún y cuando la sustitución de insumos por harina de langostilla demostraron ejercer un efecto positivo en la ganancia de peso de los camarones, este efecto no corresponde al comportamiento de la actividad enzimática digestiva global de proteasas, en donde la tendencia fué la de mantener valores muy cercanos al control (DB). En contraste, la actividad de amilasa fué en algunos casos considerablemente más alta con respecto al control aún y cuando los tratamientos que promovieron este aumento de actividad no promovieron una ganancia de peso muy superior al control.

Las causas de la mejor ganancia de peso en organismos alimentados con dietas conteniendo langostilla son al momento desconocidas. Algunas posibilidades pudieran ser el aporte de nutrimentos de mejor calidad nutritiva o de mejor asimilación por el camarón, así como el aporte de otros cofactores que pudieran promover el crecimiento. Ya ha sido demostrado en otros estudios, que hay una mejor digestibilidad *in vivo* de proteína y grasa en dietas con langostilla (Goytortúa, 1993).

En lo que se refiere a los alimentos comerciales utilizados como controles externos, los resultados variaron mucho aún y cuando se trata de alimento del mismo

proveedor (PURINA) y de que la única variante expresada por la fábrica entre uno y otro es el porcentaje de proteína agregado, sin embargo es claro que la modificación del nivel de proteína implica cambios importantes en otros ingredientes. Dependiendo de la calidad y cantidad de los ingredientes, se dan las relaciones asociativas o no asociativas, mismas que influyen en la digestibilidad del alimento. Tratándose de alimentos comerciales cuyas formulaciones no están disponibles al público, no es posible minimizar este factor que puede influir en nuestros resultados.

El comportamiento de la ganancia de peso de los camarones bajo estos tratamientos arrojó datos en donde es fácil observar que paradójicamente el alimento con un porcentaje mayor de proteína produjo un menor crecimiento, aunque es posible que en relación a esto hayan existido algunos factores fuera de nuestro control como lo es el tiempo y calidad de almacenaje del alimento comercial antes de llegar a nuestras manos .

Con los resultados anteriores se puede observar que aún y cuando la adición de la harina de langostilla causó un efecto promotor en el crecimiento de los camarones, el efecto sobre la actividad enzimática digestiva del camarón café no es evidente en el caso de las proteasas, aunque favorece el incremento de la actividad de amilasa. Considerando que las dietas experimentales suministradas son isoprotéicas, cabe la posibilidad de esperar una respuesta muy similar de la actividad de proteasa bajo los diferentes alimentos. Sin embargo, encontramos diferencias que pueden ser importantes con respecto al contenido de carbohidratos en las dietas y en especial en el contenido de almidones aportados por los insumos de granos utilizados en la

formulación de las mismas. Pudiera suponerse que bajo regímenes alimenticios con un mayor contenido de almidón se requiriera de una mayor actividad de amilasa digestiva. No obstante la disminución del contenido de carbohidratos aportado por granos en las dietas favorecieron, al parecer, la actividad amilolítica en los camarones. Si esto también lo referimos a las dietas donde se substituyó la soya, encontramos un comportamiento similar: a menor contenido de harina de soya, mayor actividad amilasa. Por otro lado, al incrementar el porcentaje de langostilla en las raciones S33S, S66S y S100S, se reduce el aporte de carbohidratos y proteínas a partir de granos (en este caso trigo y sorgo) y aumenta el aporte de carbohidratos a partir de la quitina constituyente del exoesqueleto de la langostilla. El incremento de actividad amilasa en esta substituciones pudiera en parte atribuirse a la disminución de algún inhibidor enzimático presente en los granos utilizados en la formulación de las dietas, aunque el mismo efecto debió ser observado en la actividad de proteasa por el aporte de la soya de un inhibidor específico de tripsina (SBTI).

En un estudio paralelo realizado en nuestro laboratorio con *Penaeus vannamei*, se pudo encontrar una ligera tendencia al incremento de la actividad de proteasas y amilasas digestivas a medida que se incrementaba la substitución de otros insumos por harina de langostilla (Civera *et al.* 1996); sin embargo trabajos posteriores con ésta misma especie no lograron demostrar el mismo efecto.

Hoyle (1973), utilizando actividades específicas de amilasas, proteasas y lipasas globales para estudiar la adaptación de *Homarus americanus* a diferentes niveles de almidón, no fue capaz de demostrar una adaptación significativa al regimen

dietético. De cualquier forma se reportó un incremento general en cada una de estas actividades durante el curso del estudio, sugiriendo que esta adaptación podría haber ocurrido.

El camarón *Palaemon serratus* fué estudiado por Van Wormhoudt y colaboradores (1980), reportandose aparentes variaciones de proteasas y amilasas globales, en respuesta a las diferentes dietas, pero los autores no pudieron demostrar una verdadera correlación debido a que, según ellos, las dietas suministradas variaron mucho en su composición.

Maugle *et al.* (1982) observaron por su parte que *Penaeus japonicus* alimentado con almejas frescas generaba una actividad enzimática digestiva por lo menos del doble encontrado en los camarones control alimentados con una dieta basal artificial, pero no demostraron si hubo aporte de enzimas por el alimento fresco, ni pudieron establecer una correlación de estos resultados con los de ganancia de peso registrados en el mismo experimento.

Asimismo Fox (1993) trató de encontrar una relación entre la quitina agregada al alimento y los niveles de quitinasa en el hepatopáncreas, encontrando que a medida que se aumentaban los niveles de quitina, los de quitinasa se abatían.

Esta incapacidad de relacionar la actividad de las enzimas con la dieta, puede estar dada por la posibilidad de que las adaptaciones fisiológicas de las actividades enzimáticas digestivas pueden estar enmascaradas por otros procesos en el momento de determinar estas actividades. Lee y colaboradores (1985) encontraron que las actividades totales (actividad enzimática/min/g de hepatopáncreas) demostraron ser

más afectadas por la dieta que al considerar la actividad específica (U/mg proteína). Estos mismos autores sugieren el hecho de que el incremento de la actividad enzimática digestiva es paralelo a un incremento en el contenido de proteína del hepatopáncreas y puede por lo tanto enmascarar cualquier elevación aparente en la actividad enzimática. Este fenómeno pudiera explicar el incremento de la actividad específica durante el ayuno, mismo que fué observado en el trabajo de Lee (1985) y de otros autores. Según Lee y colaboradores (1985) los mecanismos para la adaptación de las enzimas digestivas a cambios en la dieta, pudieran incluir la proliferación de células secretoras (células especializadas en la producción y secreción de enzimas) ó un incremento en el número de lisosomas en cada célula secretora por lo que por consecuencia el nivel de proteína de los tejidos de la glándula digestiva también se incrementaría. Por lo tanto, la actividad específica (unidades/mg de proteína de los extractos crudos) no es un buen indicador de cambios en la calidad y cantidad de enzimas digestivas en los organismos en estudio y tiene que apoyarse en análisis adicionales (electroforéticos [número de isoenzimas], caracterización y propiedades de las enzimas purificadas, etc) o complementarse con los datos de la actividad total.

Según Gibson (1981), aparentemente las enzimas digestivas en los decápodos son no-constitutivas, lo cual quiere decir que no son continuamente sintetizadas sino solo a partir de un estímulo dado . Además se ha sugerido que las enzimas digestivas son secretadas en ondas durante las primeras 12 horas a partir de que el animal fué alimentado (Barker y Gibson, 1977, 1978). Posterior a esta emisión de enzimas, las células V (células secretoras) cambian radicalmente su función a la de encapsulación

de desechos (Hopkin y Nott, 1980).

En trabajos desarrollados por el grupo de Nutrición del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, trabajando con ritmos circadianos de producción de enzimas digestivas en varias especies de decápodos: *Penaeus vannamei* (camarón blanco), *Penaeus californiensis* (camarón café), *Callinectes arcuatus* (jaiba azul) y *Pleuroncodes planipes* (langostilla roja), se ha encontrado que aún durante condiciones de ayuno los ritmos de producción de enzimas se mantienen y son generalmente de carácter bifásico (Vega-Villasante *et al* 1998, en prensa; Fernández-Luna *et al.* 1998, en prensa; Nolasco *et al* 1998, no publicado). Sin embargo también se ha encontrado que efectivamente el estímulo alimenticio puede generar ondas de producción de enzimas digestivas tal y como lo mencionan Gibson y Barker.

Por otro lado, en el mismo grupo de Nutrición se ha estudiado la actividad enzimática digestiva en los diferentes estadios de muda de algunos crustáceos y se ha encontrado que existen variaciones importantes en la manifestación de las enzimas digestivas dependiendo del estadio del ciclo de muda en que se encuentre el organismo. De esta manera se ha demostrado que en la jaiba azul, *Callinectes arcuatus* la actividad de proteasas del hepatopáncreas disminuye a niveles indetectables durante el momento de la ecdisis, mientras que la actividad amilasa se incrementa hasta tres veces en relación a los niveles detectados en intermuda.

El hecho de someter a los animales de experimentación (a los cuales se vaya a determinar actividad enzimática digestiva) a un ayuno de por lo menos 48 horas previas a su sacrificio, es una práctica que en principio puede parecer lógica pues de esta forma se obtendrían organismos en el mismo estado alimenticio con el tracto digestivo libre de heces. Sin embargo surgen algunas dudas al respecto:

a). Si las células productoras de enzimas responden al estímulo de una manera inmediata, su regreso a niveles basales, una vez pasado el estímulo, podría pensarse fuera de forma inmediata también. En nuestro experimento los camarones fueron alimentados con sustituciones crecientes de harina de langostilla. Si la harina de langostilla efectivamente produjo un efecto en la calidad o cantidad de la actividad enzimática digestiva, este efecto no sería observable después del período de ayuno pues las enzimas pudieran haber recuperado ya sus niveles basales.

b). Si la síntesis de enzimas se lleva a cabo de una forma adaptativa, esto es respondiendo a un estímulo de forma gradual, entonces el regreso a niveles basales se llevaría a cabo de una forma gradual también y el ayuno no alcanzaría a enmascarar este efecto. Entonces, el efecto causado por la sustitución de un insumo por harina de langostilla en caso de haber sido positivo (incremento en la actividad enzimática) debería en teoría evidenciarse aún después del ayuno de 48 horas.

Existe un vacío importante en el conocimiento de estos procesos fisiológicos en el camarón y decápodos en general. Los bioensayos tradicionales en donde se confina

a un número determinado de organismos sometidos a ciertas condiciones de ambiente y alimentación no son suficientemente seguros como para garantizar que la totalidad de los organismos estudiados estarán en un momento dado en un mismo estado fisiológico o de muda. Dentro de los bioensayos hay que considerar el hecho de que los organismos mudarán en repetidas ocasiones, y debido a esto pueden existir importantes variaciones en la expresión de las enzimas digestivas. El hecho de muestrear sin tomar en cuenta el estadio de muda de los organismos en la selección de la muestra, puede provocar grandes diferencias entre tratamientos sin que estas diferencias deban necesariamente estar relacionadas con el efecto de los tratamientos experimentales. Es necesario considerar además que aún y cuando *Penaeus californiensis* posee un comportamiento bifásico de picos máximos de actividad enzimática digestiva en ayuno (un pico máximo entre 16:00 y 20:00 horas y otro entre las 2:00 y las 5:00), la alimentación a determinadas horas puede estimular la aparición de picos secundarios de actividad e incluso sincronizar estos picos a las horas en que es ofrecida la alimentación. Por lo tanto es necesario considerar dentro de los muestreos una hora fija para la colecta de organismos y que la alimentación así mismo se realice en un horario determinado. En el caso de los bioensayos de crecimiento que dieron lugar a este trabajo, tanto la alimentación como la toma de muestras se llevó a cabo bajo un programa y horario establecido. Sin embargo es necesario considerar de igual manera que los camarones son organismos que practican el "canibalismo" oportunista. En caso de existir muertes espontáneas dentro de los espacios de experimentación, los organismos sobrevivientes llevarán a cabo la ingestión de los

cadáveres. El caso de las mudas es más común ya que los organismos mudan el exoesqueleto debido al crecimiento normal del organismo o como una respuesta al estrés. La ingestión de los exoesqueletos puede llevarse a cabo por el mismo organismo que sufrió la muda y por otros. En todo caso, no es posible determinar el número de organismos que ingirieron las mudas y los que no lo hicieron. Esto puede tener repercusiones importantes dentro de los estanques de experimentación si tomamos en cuenta que a pesar de existir un ciclo circadiano de producción de enzimas digestivas en ayuno, la ingestión de alimento puede desencadenar la aparición de picos de actividad fuera de los ciclos naturales, pudiendo dar como resultado que en el mismo estanque obtendríamos organismos con diferentes estados fisiológicos digestivos y por lo tanto con actividades enzimáticas muy variables. La única forma de minimizar estas variables sería con un monitoreo constante de los acuarios de experimentación, en donde se retiraran de inmediato tanto los organismos muertos como las exuvias para evitar la ingestión de estos por los demás organismos.

El hecho de haber encontrado que los camarones silvestres poseen una actividad enzimática digestiva mayor que aquellos cultivados en sistemas de agua clara, nos puede hacer suponer que si bien los requerimientos de los camarones cultivados son cubiertos por las dietas, los camarones silvestres poseen una carga enzimática mayor, proveniente del tipo de alimentos que ingieren o posiblemente al desarrollo de una flora bacteriana más abundante producto de sus hábitos alimenticios y del medio en el que se desarrollan. En el mismo grupo de Nutrición del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste se desarrollan trabajos tendientes a

demostrar la participación de las bacterias asociadas al tracto digestivo del camarón café en la actividad enzimática digestiva de este organismo. Los resultados parecen confirmar que la flora bacteriana posee la capacidad de liberar al medio enzimas proteolíticas, amilolíticas, lipolíticas y quitinolíticas (García-Aboites, 1997).

Al igual que otros autores, bajo este tipo de diseño experimental se han encontrado dificultades para relacionar actividad enzimática y ganancia de peso de una manera clara. Tratando de clarificar podemos decir que la dieta, a diferentes niveles, tuvo influencia en la ganancia de peso y también en la actividad enzimática general presente en los extractos del tracto digestivo de los organismos alimentados con diferentes dietas. Sin embargo, para llegar a una mejor comprensión de ambos eventos requiere de un diseño experimental donde se puedan conocer otros parámetros tales como digestibilidad *in vivo*, el contenido en aminoácidos esenciales, la presencia de inhibidores enzimáticos, la actividad enzimática microbiana asociada, el consumo real de alimento, etc. No obstante se pudo determinar que la inclusión de harina de langostilla no causó un decremento en el crecimiento ni en la manifestación general de las enzimas digestivas. Este hecho por sí solo es ya de relevancia para las futuras aplicaciones de la harina de langostilla en las formulaciones alimenticias dirigidas a camarones. La capacidad de afirmar que un insumo alternativo puede sustituir a otro de demostrada capacidad nutritiva, es de gran utilidad práctica, sobre todo en estos tiempos en donde el manejo sustentable de los recursos bióticos se perfila como la única opción viable en el aprovechamiento y conservación de los mermados recursos del mar.

9. CONCLUSIONES GENERALES.

Con la finalidad de estudiar las actividades enzimáticas digestivas presentes en el tracto digestivo del camarón café y cómo esta actividad puede ser afectada por alimentos con insumos de diferente composición suministrados como dietas, se realizaron trabajos de investigación sobre la actividad proteolítica y amilolítica asociada al tracto digestivo de juveniles del camarón café del Pacífico *Penaeus californiensis*.

Los resultados muestran que el conjunto de enzimas estudiadas poseen características generales similares a las de otras especies de peneidos. Se observó una alta actividad de tripsina y una baja actividad de quimotripsina. Con solo estas dos enzimas, el animal es capaz de degradar el conjunto de proteínas ingeridas y la degradación final a nivel de péptidos está asegurada por la presencia de carboxipeptidasas A y B y la leucino aminopeptidasa. A través de PAGE se pudo constatar por lo menos ocho bandas de actividad de proteasa. La purificación de estas bandas, así como su análisis posterior aportarán información relevante a la identificación de las proteasas específicas y a la posible participación de las isoenzimas en la hidrólisis de los alimentos.

Aparentemente las amilasas están representadas por solamente dos isoenzimas evidenciadas como bandas de actividad en los geles de agarosa. Aún así, en el revelado de los geles de agarosa, las bandas de amilasa fueron aparentemente más grandes que las de proteasas. Esto, aunque no fué cuantificado, nos permite sugerir el hecho de que aún y cuando, por el número de bandas de actividad existe una carga

mayor de proteasas, las amilasas de *P. californiensis* son muy activas aún a condiciones extremas de pH y salinidad.

Los resultados obtenidos a través de los bioensayos de alimentación de los camarones con diferentes dietas y su posterior análisis, nos permiten confirmar que en algunos de los tratamientos efectivamente existió un efecto sobre la actividad de proteasa y amilasa asociada al tracto digestivo como consecuencia del tipo de dieta suministrada. Sin embargo, estos resultados no nos permiten concluir que algunos de los insumos integrados a las dietas puedan tener algún efecto positivo en la manifestación de las enzimas digestivas; la efectiva ganancia de peso no correspondió con un aumento en la actividad enzimática (expresada como actividad específica de los extractos). Lo anterior es debido a que son muchos los factores que pueden influir en la actividad y manifestación de las enzimas a nivel de tracto digestivo, entre otros: mudas, enfermedades subclínicas, estrés, etc. Si a esto agregamos que nuestras determinaciones fueron hechas en base a un extracto crudo de tracto digestivo en donde la cantidad de proteína (no enzima), puede variar también de una manera severa aún entre individuos de un mismo tratamiento, podemos concluir que para evidenciar una efectiva correlación entre la ganancia de peso y la actividad enzimática, los estudios deberán apoyarse del estudio del comportamiento de las diferentes enzimas que se encuentran en los organismos, incluyendo la separación y/o purificación, caracterización y determinación de las propiedades de las enzimas puras. Asimismo la explotación de las técnicas de electroforesis puede brindar información adicional al simple análisis de la actividad enzimática en base a ensayos de actividad.

La aparición ó desaparición de bandas de actividad en relación a los tratamiento suministrados y la posterior identificación de la mismas puede ser una mejor vía de acercamiento para lo que se intenta probar.

Los resultados presentados en este trabajo, aún y cuando son en su mayoría descriptivos permiten tener un primer acercamiento de la participación de las enzimas digestivas en los procesos de degradación de los alimentos en el tracto digestivo de *Panaeus californiensis*. No obstante, más trabajo deberá realizarse para llegar a un conocimiento más profundo y objetivo en esta línea, para entender los mecanismos involucrados en los procesos digestivos del camarón, la respuesta de estos a nivel intracelular y las posibles alteraciones causadas por factores externos como el tipo de alimento.

10. REFERENCIAS

- Arvy, L. 1969. Les enzymes chez les crustaces. *Anne Biologie*, 8:505-580.
- Asgeirsson, B. and J.B. Bjarnason. J.B. 1991. Structural and kinetic properties of chymotrypsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.* 99: 327-335.
- Barker, P.L. 1976 Histochemical studies on the digestive physiology of four species of decapod Crustacea. Ph.D. Thesis, Liverpool Polytechnic, 224 p.
- Barker, P.L. and R. Gibson. 1977. Observations on the feeding mechanism, structure of the gut, and digestive physiology of the European lobster *Homarus gammarus* (L.) (Decapoda:Nephropidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 26:297-324.
- Bernfeld, P. 1951 Enzymes of starch Degradation and Synthesis. *Advances in Enzymol.*, 12, 379 p.
- Biesot, P.M., and J. MacDowell-Capuzzo. 1990a. Digestive protease, lipase and amylase activities in stage I larvae of the American lobster *Homarus americanus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 95A: 47-54.
- Biesot, P.M., and J. MacDowell-Capuzzo. (1990b) Change in digestive enzyme activities during early development of the American lobster *Homarus americanus* Milne Edwards. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 136:107-122.
- Blandamer, A., and R.B. 1964. The identification of an amylase in aqueuos extract of the hepatopancreas of *Carcinus maenas* the comun shore-crab. *Comp. Biochem. Physiol.* 13: 97-105.
- Brand, C.W. and L.B. Colvin. 1977. Compounded diets for early postlarval *Peneaus californiensis*. Proceedings of the Eighth Annual Workshop Wold Mariculture Society, San José Costarrica. pp. 811-820.
- Brun, G. and M. Wojtowicz. 1976. A comparative study of the digestive enzymes in the hepatopancreas of jonah crab (*Cancer borealis*) and rock crab (*Cancer irroratus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 53B: 387-391.
- Bunt, A.H. 1968. An ultrastructural study of the hepatopancreas of *Procambarus clarkii* (Girard) (Decapoda Astacidea). *Crustaceana*, 14:56-66.
- Chen, Y., Lu, P. and I. Tasai. 1991. Collagenolytic activity of crustacean midgut serine proteases: comparison with the bacterial and mammalian enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 100B: 763-768.

- Clark, D.J., Lawrence, A.L. and D.H.D. Swakon. 1993. Apparent chitin digestibility in penaeid shrimp. *Aquaculture*, 109:51-57.
- Civera-Cerecedo R. 1984. Effet du phytate du sodium sur la croissance et la mineralisation de divers tissus des crevettes peneides (CRUSTACEA:DECAPODA). Role de ces composants en tant que source de phosphore e d'inositol. These de Doctorat. Universite de Bretagne Occidentale, Brest, France. 153 p.
- Civera-Cerecedo, R., Villarreal, H., Vega-Villasante, F., Nolasco, H., Rocha-Meza, S., González, M.A., Goytortúa, E. and M.T. Camarillo. 1994. Digestive enzyme activity and growth of *Penaeus californiensis* fed diets containing red crab, *Pleuroncodes planipes*, meal as a protein source. Presentación oral en Conference of Aquaculture '94. New Orleans, Louisiana U.S.A. January 12-18 1994.
- Civera, R., Villarreal, H., Goytortúa, E., Rocha, S., Vega, F., Nolasco, H., Pastén, J. and T. Camarillo. 1996. Use of the Langostilla (*Pleuroncodes planipes*) as a protein source in experimental diets for shrimp. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 11- 13 de Noviembre 1996. Facultad de Ciencias Biológicas UANL. Monterrey, Nuevo León.
- Davis, L.E. and A.L. Burnett. 1964. A study of growth and cell differentiation in the hepatopancreas of the crayfish. *Develop. Biol.* 10: 122-153.
- DeVillez, E.J. and D.J. Fyler. 1965. Isolation of hepatopancreatic cell types and enzymatic activities in B cells of the crayfish *Orconectes rusticus*. *Can. J. Zool.* 64:81-83.
- DeVillez, E.J. and K. Buschlen. 1967. Survey of tryptic digestive enzyme in various species of Crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.* 21: 541-546.
- Divakaran, S. and A.C Ostrowski . 1990. Enzymes present in pancreatic extracts of the dolphin *Coryphaena hippurus*. *J. World Maricult. Soc.* 21, 35-40.
- Eisen, A. and J. Jeffrey. 1969. An extractable collagenase from crustacean hepatopancreas. *Biochem. Biophys. Acta.* 191: 517- 526.
- Fernández-Luna, I., Chavez, R.M., Preciado, R.M., Oliva, M., Nolasco, H. and F. Vega-Villasante (1998). Contribution to the knowledge on growth and molting of the crab *Callinectes arcuatus* Ordway(1863) in Nayarit, Mexico. *Rev. Inv. Mar.* en prensa.

- Folk, J. and Schrimmer, S. 1963. The porcine pancreatic carboxipeptidase A system. *J. Biol. Chem.* 238: 3884-3890.
- Fox, C.J. 1993. The effect of dietary chitin on the growth, survival and chitinase levels in the digestive gland of juvenile *Penaeus monodon* (Fab.) *Aquaculture*, 109:39-49.
- Fredericq, L. 1878. La digestion de matieres albuminoïdes chez quelques invertébrés. *Archiv. Zool. Exp. Gen.* 7:391-400.
- Frenzel, J. 1883. Über die mitteldarmdrüse der crustaceans. *Naples Stazione Zoologica Mittellunger* 5:50-101.
- Galicia-Xicohténcatl, R. 1976. Crecimiento del "camarón azul" (*Penaeus stylirostris*) y "camarón café" (*Penaeus californiensis*) en la zona de Puerto Peñasco, Sonora. Memorias del Simposio sobre Biología y Dinámica Poblacional de Camarones, Guaymas, Sonora, México. pp. 191-210.
- Galgani, F. (1983) Etude des proteases digestives de crevettes peneïdes (Crustacea Decapoda). Ph.D. Thesis Université d'Aix-Marseille II. France. 70 p.
- Galgani F., and F. Nagayama. 1987. Digestive proteinases in the japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B: 889-893.
- Galgani, F. 1988. Etude comparative des protéases digestives de cinq espèces de crevettes peneïdes. *Bioch. Syst. Ecol.* 16:497-504.
- Galgani, F.; Ceccaldi. H.J. et AQUACOP. 1988. Effet de l'incorporation de farines de soja et de poisson dans l'aliment sur la croissance et les enzymes digestives de *Penaeus vannamei*. *Aquat. Living. Resour.* 1:181-187.
- García-Aboites, C.R. 1997. Actividad enzimática microbiana asociada al tracto digestivo de juveniles de camarón café del Pacífico *Penaeus californiensis*. Tesis de In. Bioquímico en Alimentos. Instituto Tecnológico de La Paz. 90 pp.
- García-Carreño, F.L. 1992b. The digestive proteases of langostilla (*Pleuroncodes planipes*, Decapoda): their partial characterization, and the effect of feed on their composition. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B:575-578.
- García-Carreño, F. and N. Haard. 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *J. Food Biochem.* 17:97-113.

- Giaja, J. and M. Gompel. 1907. Sur la digetion des glucosides et des hydrates de carbone chez l'ecrevisse. *Compte Rendu de la Societe de Biologie*, 63:1197-1198.
- Gibson, R. and P.L. Barker. 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanography and Marine Biology Annual Review*, 17:235-346.
- Gibson, R. 1981. Feeding and digestion in decapod crustaceans. Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and physiological approaches to shellfish nutrition. Delaware, USA.
- Goytortúa-Bores, E. 1993. Evaluación de la digestibilidad de dietas compuestas a base de harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) y su efecto en el crecimiento en el camarón blanco (*Penaeus vannamei*). Tesis de Licenciatura de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. 112 pp.
- Guieysse, A. 1907. Etudes des organes digestifs chez les Crustaces. *Archives of Anatomy and Microscopy*, 9:343-494.
- Hassett, R.P. and Blades-Eckelbarger. 1995. Diel Changes in gut-cell morphology and digestive activity of the marine copepod *Acartia tonsa*. *Marine Biology*, 124:59-69.
- Head, E.J.H. and R.J. Conover. 1983. Induction of digestive enzymes in *Calanus hyperboreus*. *Mar. Biol. Lett.* 4:219-231.
- Hernández Cortés, M.P. 1993. Proteinasa con actividad de quimotripsina y colagenasa en langostilla *Pleuroncodes planipes* (Decapoda). Tesis de Licenciatura en Biología Marina de la Universidad Autónoma de Baja California Sur. México. 82 pp.
- Hoppe-Seyler, F. 1876. Unter unterschiedem chemischen bau und er verdauung hoherer und niederer thiere. *Pflugers Archiv. European J. Physiol.* 14:395-400.
- Hopkin, S.P. and J.A. Nott. 1980. Studies on the digestive cycle of the shore crab *Carcinus maenas* (L.) with peccial reference to the B cells in the hepatopancreas. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 60:891-907.
- Hoyle, R.J. 1973. Digestive enzyme secretion after dietary variation in the American lobster (*Homarus americanus*). *J. Fish. Res. Board of Canada*, 30:1647-1653.
- Hummel, B. 1959. A modified spectrophotometric determination of trypsin, chymotripsin and thrombin. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 34: 137-142.

- Jiang, S.T., Moody, M.W. and H.C.H. Chen. 1991. Purification and characterization of proteases from digestive tract of grass shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Food Sci.* 56:322-326.
- Jordan, H. 1904. Zur frage nach der exkretive fluktion der mitteldarmdruse bei *Astacus fluviatilis*. *Pfluegers Archiv. European Journal of Physiology* 105:365-379.
- Kong, Ch. and W. Co. 1988. Prawn Culture. Westpoint Aquaculture Corporation. Cushon Printing Press. Dagupan. 322 pp.
- Kulkarni, G.K., Nagabhushanam, R. and P.K. Joshi. 1979. Amylase activity of the digestive system in marine Penaeid prawns, *Parapenaeopsis hardwickii* & *P. styliifera*. *Indian J. Mar. Sci.* 8, 195-197.
- Kumlu, M. & D.A. Jones. 1995. Feeding and digestion in the caridean shrimp larva of *Palaemon elegans* Rathke and *Machrobrachium rosenbergii* (De Man) (Crustacea: Palaemonidae) on live and artificial diets. *Aquaculture Nutrition*, 1:3-12.
- Krunkenberg, C.F. 1879. Vergleichend-physiologische beitrage zur kenntniss der verdauungsvorgange. Untersuchungen aus dem physiologischen. *Heidelberg* 2:1-45.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lee, P.G., Blake, N.J. and G.E. Rodrick. 1980. A quantitative analysis of digestive enzymes for the freshwater prawn *Machrobrachium rosenbergii*. *Proc. World Maricul. Soc.* 11: 392-402.
- Lee, P.G. 1984. Digestive enzymes of Penaeid shrimp: A descriptive and quantitative examination of the relationships of enzyme activity with growth, age and diet. Ph.D. Thesis, Texas A&M University. U.S.A. 148 p.
- Lee, P.G., Smith, L.L. and A.L. Lawrence. 1984. Digestive proteases of *Penaeus vannamei* Boone: Relationships between enzyme activity, size and diet. *Aquaculture*, 42:225-239.
- Lee, P.G. and A.L. Lawrence. 1985. Effects of diet and size on growth, feed digestibility and digestive enzyme activities of the marine shrimp, *Penaeus setiferus* Linnaeus. *J. World Maricul. Soc.* 16:275-287.
- Lehninger, A. 1979. Bioquímica. Ediciones Omega. Barcelona. 1093 pp.

- Le Moullac, G., Van Wormhoudt, A. and AQUACOP. 1993. Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrates and fibre levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapoda). *Aquat. Living Resour.*, 7:203-210.
- Loizzi, R.F. 1971. Interpretation of crayfish hepatopancreatic function based on fine structural analysis of epithelial cell lines and muscle network. *Zeitschrift fur Zellforschung and Mikroskopische Anatomie*: 113:420-440.
- Lovett, D.L. and D.L.Felder. 1990a. Ontogenetic changes in enzyme distribution and midgut function in developmental stages of *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Bull. Mar. Biol.* 178:160-174.
- Lovett, D.L. and D.L.Felder. 1990b. Ontogenetic changes in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Bull. Mar. Biol.* 178:144-159.
- Lovett, D.L. and D.L. Felder. 1990c. Ontogeny of kinematics in the gut of the white shrimp *Penaeus setiferus* (Decapoda, Penaeidae). *J. Crust. Biol.* 10(1): 53-68.
- Lowry, O.H., Rosebrough N.J., Fars A.L. and R.S. Randall. 1951. Protein measurement with the pholin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Mansour-Bek, J.J. 1954a. The digestive enzymes in invertebrates and protochordates. In: *Tabulae Biologicae*, volume 21, part 3. H.J. Vonk, J.J. Mansour-Bek and E.J. Slijper (Editors), Bosch-Utrecht, pp. 76-353.
- Mansour-Bek, J.J. 1954b. The composition of the digestive juices of Invertebrata. In: *Tabulae Biologicae*, volume 21, part 3. H.J. Vonk, J.J. Mansour-Bek and E.J. Slijper (Editors), Bosch-Utrecht, pp. 369-382.
- Martínez-Córdova, L.R., Porchas-Cornejo, M.A., Villarreal-Colmenares, H., and J.A. Calderón-Pérez. 1998. Winter culture of yellowleg shrimp *Penaeus californiensis* in aerated ponds with low water exchange. *J. World Maricul. Soc.* 29:120-124.
- Maugle, P.D., Deshimaru, O., Katayama, T. and K.L Simpson. 1982a. Characteristics of amylase and protease of the shrimp *Penaeus japonicus*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 48:1753-1757.
- Maugle, P.D., Deshimaru, O., Katayama, T. and K.L. Simpson. 1982b. Effect of shortnecked clam diets on shrimp growth and digestive enzyme activities. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 48:1759-1764.
- Maugle, P.D., Deshimaru, O., Katayama, T. and K.L. Simpson. 1983. The use of amylase supplements in shrimp diets. *J. World Maricul. Soc.* 14:25-37.

- Nakamura, K. 1987. Classification of diverticular cells of the midgut gland in the prawn *Penaeus japonicus*. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.* 36: 207-213.
- Nakamura, K. 1989. Microvilli pattern of midgut gland cells in the prawn *Penaeus japonicus*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 55:215-219.
- Nolasco, H. and F. Vega-Villasante. 1992. Rapid detection and quantification of amylase activity in fractions after liquid chromatography. *J. Biotech.* 23: 103-109.
- Ogura, K. 1959. Midgut gland cells accumulation iron or copper in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Annot. Zool. Jap.* 32: 133-142.
- Omondi, J.G. and J.R. Stark. 1995. Some digestive carbohydrases from the midgut gland of *Penaeus indicus* and *Penaeus vannamei* (Decapoda:Penaeidae). *Aquaculture*, 134:121-135.
- Rosales-Juárez, F.J. 1976. Alimento y alimentación de algunas especies del género *Penaeus*. *Memorias del Simposio sobre Biología Dinámica y Poblacional de Camarones, Guaymas, Sonora, México.* pp. 352-370.
- Ryle, A.P. 1988. Pepsins, gastricsins and their zymogens. In: *Methods of Enzymatic Analysis, Vol.V. Enzymes 3: Peptidases, Proteinases and their Inhibitors.* 3rd Edn.(Editado por Bergmeyer). pp.223-228. VCH Press, Weinheim.
- Sather, B. 1969. A comparative study of amylase and proteinases in some decapods. *Comp. Biochem. Physiol.* 28:371-379.
- Sedlmeier, D. 1988. The crustacean hyperglycemic hormone (CCH) releases amylase from the crayfish midgut gland. *Regulatory Peptides*, 20:91-98.
- Tasai, I., Chuang, K. and J. Chuang. 1986. Chymotrypsin in digestive tracts of crustacean decapods (shrimps). *Comp. Biochem. Physiol.* 85B: 235-239.
- Titani, K., Sasagawa, T., Woodbury, R., Ericsson, L., Dorsam, H., Kraemer, M., Neurath, H., and R. Zwillig. 1983. Aminoacid sequence of crayfish *Astacus fluvitalis*, trypsin. *Biochemistry*, 22: 1459-1463.
- Toullec, J.Y., Chikhi, M. and A. Van Wormhoudt. 1992. In vitro protein synthesis and a-amylase activity in F cells from hepatopancreas of *Palaemon serratus* (Crustacea; Decapoda). *Experientia* , 48:273-276.
- Trellu, J. and H.J. Ceccaldi. 1977. Variations des activites enzymatiques de l'hépatopancreas et du muscle de *Palaemon serratus* au cours du cycle d'intermue. *C.R. Soc. Biol.* 171: 115-121.

- Tuppy, H., Wisbauer, V. and E. Winterberger. 1962. Aminosäure-p-nitroanilida als substrate für aminopeptidase und andere proteolytische. *Hoppe seyler's. Physiol. Chem.* 329: 278-288.
- Van Weel, P.B. 1955. Processes of secretion, restitution and resorption in gland of midgut of *Atya spinipes* Newport. *Physiol. Zool.* 28: 40-54.
- Van Wormhoudt, A. 1974. Etudes des enzymes de l'hepatopancreas de *Penaeus kerathurus* et *Palaemon serratus*, crustacés décapodes, dans les conditions physiologiques normales et en élevage. Ph.D. Thesis. Université d'Aix Marseille II. France. 350 p.
- Van Wormhoudt A., Ceccaldi, H.J. and B.J. Martin. 1980. Adaptation de la teneur en enzymes digestives de l'hepatopancreas de *Palaemon serratus* a la composition d'aliments experimentaux. *Aquaculture*, 21:63-78.
- Van Wormhoudt, A., Cruz, E., Guillaume, J. and P. Favrel. 1986. Action de l'inhibiteur de soja sur la croissance et l'activité des enzymes digestives chez *Penaeus japonicus* (Crustacea Decapoda): Role eventuel des hormones gastro-intestinales.
- Vega-Villasante, F., Fernández, I., Preciado, R.M., Oliva, M. and H. Nolasco. 1998. The activity of digestive enzymes during the molting stages of the blue crab *Callinectes arcuatus* Ordway (1863). *Bulletin of Marine Science*. En prensa.
- Villarreal, H. 1995. Utilización de la langostilla en la acuicultura. En Auriolos Gamboa y Balart (eds.): *La Langostilla: Biología, Ecología y Aprovechamiento*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz. 233 pp.
- Villarreal, H., Rivera, M.C. and A. Millan. 1990. Effect of the substitution of shrimp meal and soy meal for red crab (*Pleuroncodes planipes*) meal in the growth of postlarvae and juvenile *Penaeus californiensis*. *The Crustacean Nutrition Newsletter*, 6:9-19.
- Vonk, H.J. 1937. The specificity and collaboration of digestive enzymes in Metazoa. *Biol. Rev.* 12:245-284.
- Walford, J. and T.J. Lam. 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, 109:187-205.
- Yonge, C.M. 1924. Studies on the mechanism of feeding, digestion and assimilation in *Nephrops norvegicus*. *British J. Exp. Biol.* 1:15-63.

Yonge, C.M. 1937. Evolution and adaptation in the digestive system of Metazoa. *Biol. Rev.* 12:87-115.

Zwilling, R. and H. Neurath. 1981. Invertebrate proteases. *Methods in Enzymology*. 8: 633-665.

INDICE DE FIGURAS

ESQUEMA A. TRACTO DIGESTIVO DE LOS PENEIDOS Y SUS ESTRUCTURAS ASOCIADAS.....	11
ESQUEMA B. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS DIFERENTES HIPÓTESIS DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR EN CRUSTÁCEOS DECÁPODOS.....	14
FIG.1 EFECTO DE LA SALINIDAD SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA ASOCIADA AL TRACTO DIGESTIVO DEL CAMARON CAFE, UTILIZANDO CASEINA COMO SUBSTRATO	41
FIG.2a. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA ASOCIADA AL TRACTO DIGESTIVO DEL CAMARON CAFE.....	42
FIG.2b. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ESTABILIDAD DE LAS PROTEASAS ASOCIADAS AL TRACTO DIGESTIVO DEL CAMARON CAFE	43
FIG.3. EFECTO DEL pH SOBRE LAS PROTEASAS ASOCIADAS AL TRACTO DIGESTIVO DEL CAMARON CAFE	44
FIG. 4. (a) ANALISIS ELECTROFORETICO (PAGE) DEL EXTRACTO CRUDO DE SISTEMA DIGESTIVO DE CAMARON CAFE. (b) GEL DE AGAROSA-CASEINA MOSTRANDO LAS BANDAS CON ACTIVIDAD DE PROTEASA EN EL EXTRACTO CRUDO DE SISTEMA DIGESTIVO DE CAMARON CAFE.....	47
FIG. 5. ACTIVIDAD DE TIPO TRIPSINA DETECTADA USANDO TAME COMO SUBSTRATO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO CRUDO (PROTEINA) DE TRACTO DIGESTIVO DE CAMARON CAFE	48
FIG. 6. ACTIVIDAD DE TIPO QUIMOTRIPSINA USANDO BTEE COMO SUBSTRATO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO CRUDO (PROTEINA) DE TRACTO DIGESTIVO DE CAMARON CAFE	49
FIG. 7. ACTIVIDAD DE TIPO CARBOXIPEPTIDASA USANDO HPLA COMO SUBSTRATO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO CRUDO (PROTEINA) DE TRACTO DIGESTIVO DE CAMARON CAFE	50
FIG. 8. ACTIVIDAD DE TIPO CARBOXIPEPTIDASA B USANDO HA COMO SUBSTRATO, A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO CRUDO (PROTEINA) DE TRACTO DIGESTIVO DE CAMARON CAFE	51
FIG. 9. ACTIVIDAD DE TIPO LEUCINO AMINOPEPTIDASA USANDO LAPNA COMO SUBSTRATO, A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO CRUDO (PROTEINA) DE TRACTO DIGESTIVO DE CAMARON CAFE	52
FIG. 10. ACTIVIDAD DE TIPO TRIPSINA DETECTADA EN EL EXTRACTO DEL TRACTO DIGESTIVO DEL CAMARON CAFE.....	55
FIG. 11. ACTIVIDAD DE TIPO QUIMOTRIPSINA DETECTADA EN EL EXTRACTO DEL TRACTO DIGESTIVO DEL CAMARON CAFE.....	56
FIG. 12. ACTIVIDAD DE TIPO CARBOXIPEPTIDASA "A" DETECTADA EN EL EXTRACTO DEL TRACTO DIGESTIVO DEL CAMARONCAFE	59
FIG. 13. ACTIVIDAD DE TIPO CARBOXIPEPTIDASA "B" DETECTADA EN EL EXTRACTO DEL TRACTO DIGESTIVO DEL CAMARON CAFE.....	60

FIG. 14. ACTIVIDAD DE TIPO LEUCINO-AMINOPEPTIDASA DETECTADA EN EL EXTRACTO DEL TRACTO DIGESTIVO DEL CAMARON CAFE.....	61
FIG. 15. EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD AMIOLITICA DEL EXTRACTO DEL TRACTO DIGESTIVO DEL CAMARON CAFE.....	64
FIG. 16. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD AMIOLITICA DEL EXTRACTO CRUDO DE TRACTO DIGESTIVO DE CAMARON CAFE.....	65
FIG. 17. EFECTO DE LA SALINDAD SOBRE LA ACTIVIDAD AMIOLITICA DEL EXTRACTO DEL TRACTO DIGESTIVO DE CAMARON CAFE.....	66
FIG. 18. (a) PAGE DEL EXTRACTO CRUDO DE SISTEMA DIGESTIVO DE CAMARON CAFE b) GEL DE AGAROSA-ALMIDON MOSTRANDO BANDAS CON ACTIVIDAD DE AMILASA	68
Fig. 19. PESO FINAL (EN GRAMOS) DE LOS ORGANISMOS ALIMENTADOS CON DIFERENTES DIETAS EXPERIMENTALES Y COMERCIALES.....	72
Fig. 20. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE PROTEASAS ENCONTRADA EN LOS EXTRACTOS DEL TRACTO DIGESTIVO DE ORGANISMOS ALIMENTADOS CON DIFERENTES DIETAS.....	73
Fig. 21. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE AMILASA ENCONTRADA EN LOS EXTRACTOS DEL TRACTO DIGESTIVO DE ORGANISMOS ALIMENTADOS CON DIFERENTES DIETAS.....	77

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. EFECTO DE IONES DIVALENTES E INHIBIDORES ENZIMATICOS SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA ASOCIADA AL TRACTO DIGESTIVO DE <i>Penaeus californiensis</i>	45
TABLA 2. ACTIVIDAD DE LAS DIFERENTES PROTEASAS DETECTADAS EN EL TRACTO DIGESTIVO DE <i>Penaeus californiensis</i>	62
TABLA 3. EFECTO DE IONES DIVALENTES Y EDTA EN LA ACTIVIDAD DE AMILASA DEL TRACTO DIGESTIVO DE <i>Penaeus californiensis</i>	67
TABLA 4. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DE LOS EXTRACTOS DEL TRACTO DIGESTIVO DE ORGANISMOS DE <i>Penaeus californiensis</i> SOMETIDOS A DIFERENTES REGÍMENES DIETÉTICOS.....	70