

**Centro de Investigación Científica y de
Educación Superior de Ensenada**



**ESTUDIO COMPARATIVO DEL PERFIL DE ALGUNAS
ENZIMAS DIGESTIVAS IMPORTANTES EN *Penaeus
stylirostris*, *Penaeus californiensis*, *Procambarus clarkii*
*Cherax quadricarinatus***

**TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS**

LUIS ANDRES GONZALEZ AGRAZ

ENSENADA, B. C., NOVIEMBRE DEL 2000.

TESIS DEFENDIDA POR

LUIS ANDRÉS GONZÁLEZ AGRAZ

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



Dr. Facundo Joaquín Márquez Rocha
Director del Comité



Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Miembro del Comité



M. en C. Ana Denise Re Araujo
Miembro del Comité



Dr. Héctor Alonso Echavarría Heras
Miembro del Comité



M en C. Marisela Aguilar Juárez
Miembro del Comité



M. en C. Mamiel de Jesús Acosta Ruiz
Miembro del Comité



Dr. Luis Fernando Bückle Ramirez
Jefe del Depto. de Acuicultura



Dr. Federico Graef Ziehl
Director de Estudios de Posgrado

3 de noviembre del 2000

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y EDUCACION SUPERIOR DE
ENSENADA**



**DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA**

**ESTUDIO COMPARATIVO DEL PERFÍL DE ALGUNAS ENZIMAS
DIGESTIVAS IMPORTANTES EN *Penaeus stylirostris*, *Penaeus californiensis*,
Procambarus clarkii y *Cherax quadricarinatus*.**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Luis Andrés González Agraz

Ensenada, Baja California a Noviembre del 2000.

RESUMEN de la Tesis de LUIS ANDRÉS GONZÁLEZ AGRAZ, presentada como requisito parcial, para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS con especialidad en ACUICULTURA, Ensenada, Baja California, México, Noviembre del 2000.

ESTUDIO COMPARATIVO DEL PERFÍL DE ALGUNAS ENZIMAS DIGESTIVAS IMPORTANTES EN *Penaeus stylirostris*, *Penaeus californiensis*, *Procambarus clarkii* y *Cherax quadricarinatus*.

Resumen aprobado por:



Dr. Facundo Joaquín Márquez Rocha
Director de Tesis

Se realizaron evaluaciones enzimáticas con los extractos obtenidos de los hepatopáncreas de los decápodos silvestres *Penaeus stylirostris*, *Penaeus californiensis*, *Procambarus clarkii* y *Cherax quadricarinatus*. Se midió las actividades: proteolítica total; tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B y β -Glucosidasa; utilizando sustratos específicos con técnicas bioquímicas. Los resultados obtenidos muestran mayor actividad proteolítica total en los extractos de *P. stylirostris* y *P. californiensis* comparado con los obtenidos para *P. clarkii* y *C. quadricarinatus* y las diferencias entre los mismos sugiere que las enzimas participantes en el proceso de digestión son distintas para cada especie. Las actividades específicas evaluadas fueron mayores en las especies de camarones obteniendo los valores más altos en tripsina y quimiotripsina; las carboxipeptidasa A y B fueron detectadas y medidas en las especies de camarones, sin embargo, estas actividades no se encontraron en los extractos de *P. clarkii* y *C. quadricarinatus*. Por otra parte es importante mencionar que se logró montar el protocolo para medir la actividad β -Glucosidasa en los extractos de hepatopáncreas de estas cuatro especies. El estudio electroforético evidenció que para *P. stylirostris* y *P. californiensis*, las bandas de actividad estaban entre 9.6 y 27 KDa, con una banda de actividad muy fuerte marcada alrededor de los 10 KDa en ambos casos y una banda extrema de 46 KDa para *P. stylirostris*; y para *P. clarkii* y *C. quadricarinatus* las bandas de mayor actividad se detectaron entre los 7.5 y 18.5 KDa; las bandas de actividad fueron distintas para cada especie.

Palabras claves: Decápodos, hepatopáncreas y enzimas digestivas.

ABSTRACT of the thesis of LUIS ANDRÉS GONZÁLEZ AGRAZ, presented as partial requirement to obtain the MASTER ON SCIENCE degree in AQUACULTURE. Ensenada Baja California, México, November 2000.

COMPARATIVE STUDY OF THE PROFILE OF SOME IMPORTANT DIGESTIVE ENZYMES FROM *Penaeus stylirostris*, *Penaeus californiensis*, *Procambarus clarkii* y *Cherax quadricarinatus*

Abstract approved by:



Dr. Facundo Joaquín Márquez Rocha.

Crude extracts obtained from hepatopancreas of adult decapods *Penaeus stylirostris*, *Penaeus californiensis*, *Procambarus clarkii* and *Cherax quadricarinatus* were used to measure enzymatic activity. Total proteolytic, trypsin, chymotrypsin, carboxypeptidases A and B and β -glucosidase activities were determined using specific substrates by biochemical techniques. *P. stylirostris* and *P. californiensis* showed higher proteolytical activity extracts than *P. clarkii* and *C. quadricarinatus*. The differences of enzymatic activity among them suggest that the enzymes participants in the digestive process are distinct for each species. The highest activities were trypsin and chymotrypsin in the assays for shrimp species, carboxypeptidase A and B were detected and measured in shrimp species, however, these activities were not found in *P. clarkii* and *C. quadricarinatus*. It is important to mention that the protocol for detection of β -glucosidase activity was adapted to measure this activity in the hepatopancreas extracts for all of these studied species. Electrophoretic study showed that the range of activity bands for *P. stylirostris*, *P. californiensis* were between 9.6 and 27KDa, with one strong band at 10KDa in both shrimps and another band at 46KDa for *P. stylirostris*. In the case of crayfish species the range of bands with activity were between 7.5 and 18.5 KDa; in general the bands with activity were distinct for each species.

Keywords: Decapods, hepatopancreas, digestive enzymes.

Dedicatoria

*A mis padres que me dieron la vida y siempre confiaron en mi
(Sergio y Carmina)*

*A mis hermanas que siempre me apoyaron
(Yveth, Paty y Mayra)*

*Al sobrino mas loco y cariñoso
(Carlitos)*

*A mis amigos por estar conmigo tanto en los momentos difíciles
como en los fáciles*

*A todos los que me ayudaron a culminar una etapa más de mi
vida por su apoyo*

Gracias

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis el Doc. Facundo J. Márquez Rocha por su apoyo y dirección compartiendo su experiencia , además de ser un buen amigo; también a su familia por ser tan buena conmigo.

A los miembros del comité de tesis : Dra. M. Pilar Sánchez Saavedra, M. en C. Ana Denise Re Araujo, M. en C. Marisela Aguilar Juárez y M. en C. Manuel de J. Acosta Ruiz por sus comentarios y críticas constructivas que ayudaron a mejorar el trabajo realizado.

Al Doc. Jorge Olmos por permitir el uso de sus instalaciones y además por ser amigo. Al personal de los departamentos de Acuicultura y Biotecnología, tanto técnicos como investigadores, por su apoyo y disposición de ayudarme.

A mis compañeros estudiantes de maestría y amigos: Roberto Flores, Nallely, cuquita, Lalo, Compita, Juan Carlos, Gerardo , Alejandra M., Oso, Billy, Gisel, Gisela, Tatanka, Daniel M., Yessica, Darla, Silvia, Raquel, Fausto, Alejandro, Lobo, Florencia, Asunción, Rebeca, Javier, Campa, Chris, Kike Castro, Nishmed, Jhave, Xochitl, Miriam, Liza, Julio, Angie, Edurne, Chica, todos los crudáceos y todos los demás amigos. Además muy especialmente a Lorena, Leonel y su hija milery por compartir grandes momentos y su amistad gracias!!!!

A las secres Cecy, Bibi, Ale y María Elena por aguantarme y ser tan amables conmigo.

A mi hermana Paty por su compañía en esta ciudad. Además a mis padres y hermanas por su cariño LOS QUIERO MUCHO !!!!

Al CICESE, por la formación académica y económica por el proyecto 623119. Al Dr. García-Carreño y su grupo en CIBNOR por el apoyo técnico.

A CONACyT por su apoyo económico brindado a través de la beca otorgada y el pago de las colegiaturas.

CONTENIDO

I.	Introducción	1
II.	Antecedentes	5
III.	Objetivos	9
IV.	Materiales y métodos	10
IV.1	Obtención de organismos	10
IV.2	Obtención y preparación del extracto de hepatopáncreas de crustáceos.	10
IV.3	Actividad proteolítica total.	11
IV.3.1	Determinación de proteína.	11
IV.3.2	Sustratos utilizados para las actividades específicas	12
IV.4	Actividad de tripsina	12
IV.5	Actividad quimiotripsina	13
IV.6	Actividad de la carboxipeptidasa A	13
IV.7	Actividad de la carboxipeptidasa B	14
IV.8	Actividad β -glucosidasa	14
IV.9	Preparación de los extractos liofilizados	15
IV.10	Caracterización de los extractos obtenidos de los liofilizados.	15
IV.10.1	Actividad proteolítica total	15
IV.10.2	Actividad proteolítica total a diferentes temperaturas	15
IV.10.3	Actividad proteolítica total a diferentes ph	16
IV.10.4	Estabilidad térmica de la actividad proteolítica de extractos liofilizados	16
IV.10.5	Estabilidad de la actividad proteolítica de extractos liofilizados al pH	16

CONTENIDO (Continuación)

IV.11	Electroforesis (sds-page)	17
IV.11.1	SDS-PAGE	17
IV.11.2	Preparación de las muestras	18
IV.11.3	Proteínas en gel	18
IV.11.4	Zimogramas	19
IV.12	Procesamiento estadístico	20
V.	Resultados y Discusión	21
V.1	Actividad proteolítica total de extractos crudos	21
V.2	Tripsina	22
V.3	Quimiotripsina	25
V.4	Carboxipeptidasa A	28
V.5	Carboxipeptidasa B	30
V.6	Efecto de la temperatura sobre la actividad tripsina	31
V.7	β -glucosidasa	41
V.8	Caracterización de extractos liofilizados	44
V.8.1	Actividad proteolítica total	44
V.8.2	Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica total de extractos de hepatopancreas liofilizados	45
V.8.3	Efecto del ph sobre la actividad proteolítica de extractos de hepatopáncreas liofilizado	47
V.8.4	Estabilidad a la temperatura de la actividad proteolítica total de extractos liofilizados.	48
V.8.5	Estabilidad al pH de la actividad proteolítica total de extractos liofilizados.	51
V.9	Análisis electroforético	52
VI.	Conclusiones	56
VII	Perspectivas	57
	Literatura Citada	58
	Anexo I. Electroforésis	
	Anexo II Procesamiento estadístico	

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Valores de actividad obtenidas de los extractos crudos de especies de decápodos (1) <i>P. stylirostris</i> , (2) <i>P. californiensis</i> , (3) <i>P. clarkii</i> , (4) <i>C. quadricarinatus</i> . con una desviación estándar $P = 0.05$	21
2	Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 30 °C de extractos de <i>P. stylirostris</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	23
3	Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 30 °C de extractos de <i>P. californiensis</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	23
4	Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 30 °C de extractos de <i>P. clarkii</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	23
5	Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 30°C de extractos de <i>C. quadricarinatus</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	24
6	Actividad tripsina a 30 °C (a) camarones y (b) acociles.	24
7	Cambio de absorbancia para la actividad quimiotripsina en extractos de <i>P. stylirostris</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	25
8	Cambio de absorbancia para la actividad quimiotripsina en extractos de <i>P. californiensis</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	26
9	Cambio de absorbancia para la actividad quimiotripsina en extractos de <i>P. clarkii</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	26
10	Cambio de absorbancia para la actividad quimiotripsina en extractos de <i>C. quadricarinatus</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	26
11	Actividad específica quimiotripsina para extractos de hepatopáncreas de <i>P. stylirostris</i> y <i>P. californiensis</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	27
12	Actividad específica quimiotripsina para extractos de hepatopáncreas de <i>P. clarkii</i> y <i>C. quadricarinatus</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	27
13	Cambio de absorbancia para la actividad carboxipeptidasa A para <i>Penaeus stylirostris</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	28

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
14	Cambio de absorbancia para la actividad carboxipeptidasa A para <i>Penaeus californiensis</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	29
15	Actividad específica carboxipeptidasa A para <i>P. stylirostris</i> y <i>P. californiensis</i> $p = 0.05$	29
16	Cambio de absorbancia para la actividad carboxipeptidasa B para <i>Penaeus stylirostris</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	30
17	Cambio de absorbancia para la actividad carboxipeptidasa B para <i>Penaeus californiensis</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	30
18	Actividad Carboxipetidasa B para <i>P. stylirostris</i> y <i>P. californiensis</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	31
19	Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 40°C de extractos de <i>P. stylirostris</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	32
20	Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 40°C de extractos de <i>P. californiensis</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	32
21	Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 40°C de extractos de <i>P. clarkii</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	33
22	Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 40°C de extractos de <i>C. quadricarinatus</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	33
23	Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 50°C de extractos de <i>P. stylirostris</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	34
24	Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 50°C de extractos de <i>P. californiensis</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	34
25	Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 50°C de extractos de <i>P. clarkii</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	34
26	Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 50°C de extractos de <i>C. quadricarinatus</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	35
27	Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 60°C de extractos de <i>P. stylirostris</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	35

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
28	Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 60°C de extractos de <i>P. californiensis</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	36
29	Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 60°C de extractos de <i>P. clarkii</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	36
30	Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 60°C de extractos de <i>C. quadricarinatus</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	36
31	Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 70°C de extractos de <i>P. stylirostris</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	37
32	Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 70°C de extractos de <i>P. californiensis</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	37
33	Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 70°C de extractos de <i>P. clarkii</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	38
34	Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 70°C de extractos de <i>C. quadricarinatus</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	38
35	Actividades específicas de tripsina de <i>P. stylirostris</i> y <i>P. californiensis</i> , evaluadas a diferentes temperaturas, con desviación estándar $p = 0.05$	39
36	Actividades específicas de tripsina de <i>P. clarkii</i> y <i>C. quadricarinatus</i> , evaluadas a diferentes temperaturas, con desviación estándar $p = 0.05$	39
37	Cambio de absorbancia para la actividad β -Glucosidasa de extractos de <i>P. stylirostris</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	41
38	Cambio de absorbancia para la actividad β -Glucosidasa de extractos de <i>P. californiensis</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	41
39	Cambio de absorbancia para la actividad β -Glucosidasa de extractos de <i>P. clarkii</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	42
40	Cambio de absorbancia para la actividad β -Glucosidasa de extractos de <i>C. quadricarinatus</i> , con desviación estándar $p = 0.05$	42
41	Actividad β -Glucosidasa para extractos de <i>P. stylirostris</i> y <i>P. californiensis</i>	42

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
42	Actividad β -Glucosidasa para extractos de <i>P. clarkii</i> y <i>C. quadricarinatus</i>	43
43	Actividad proteolítica total en extractos liofilizados de <i>P. stylirostris</i> , <i>P. californiensis</i> , <i>P. clarkii</i> , <i>C. quadricarinatus</i> , con una desviación estándar de $p = 0.05$	45
44	Actividad proteolítica total de extractos liofilizados de <i>P. stylirostris</i> y <i>P. californiensis</i> , evaluados a diferentes temperaturas, con desviación estándar $p = 0.05$	46
45	Actividad proteolítica total de extractos liofilizados de <i>P. clarkii</i> y <i>C. quadricarinatus</i> , evaluados a diferentes temperaturas, con desviación estándar $p = 0.05$	46
46	Actividad proteolítica total de extractos liofilizados de <i>P. stylirostris</i> y <i>P. californiensis</i> , evaluados a diferentes valores de pH, con desviación estándar $p = 0.05$	47
47	Actividad proteolítica total de extractos liofilizados de <i>P. clarkii</i> y <i>C. quadricarinatus</i> , evaluados a diferentes temperaturas, con desviación estándar $p = 0.05$	48
48	Estabilidad térmica de extractos de <i>P. stylirostris</i> y <i>P. californiensis</i> : (e) incubado a 70 °C, (d) incubado a 60 °C, (c) incubado a 50 °C, (b) incubado a 40 °C y (a) incubado a 30 °C	49
49	Estabilidad térmica de los extractos de <i>P. clarkii</i> y <i>C. quadricarinatus</i> : (e) incubado a 70°C, (d) incubado a 60°C, (c) incubado a 50°C, (b) incubado a 40°C y (a) incubado a 30°C.	50
50	Estabilidad al pH de los extractos de <i>P. stylirostris</i> , <i>P. californiensis</i> , <i>P. clarkii</i> y <i>C. quadricarinatus</i> .	51
51	Gel SDS-PAGE (80x100x0.75mm), de extractos liofilizados de <i>P. stylirostris</i> (PS), <i>P. californiensis</i> (PC), <i>P. clarkii</i> (PrC), <i>C. quadricarinatus</i> (CQ) y el marcador de peso molecular (M).	52
52	Correlación obtenida entre la migración relativa de los marcadores de peso molecular y el logaritmo de este.	53

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
53	Zimogramas cargados con 5 mU (a) y cargados con 7 y 10 mU (b) de los extractos liofilizados de <i>P. stylirostris</i> (PS), <i>P. californiensis</i> (PC), <i>P. clarkii</i> (PrC) y <i>C. quadricarinatus</i> (CQ).	53

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Protocolo de preparación de los geles de electroforésis	18
II	Estandar de proteínas para electroforésis	19
III	Resumen de los valores obtenidos de las evaluaciones de tripsina en los extractos de camarones a diferentes temperaturas	40
IV	Resumen de los valores obtenidos de las evaluaciones de tripsina en los extractos de langostas de agua dulce a diferentes temperaturas	40
V	Resumen de los valores obtenidos de las evaluaciones enzimáticas realizadas a los extractos crudos de las cuatro especies de decápodos	44
VI	Actividad proteolítica total con 3 μ L de los extractos liofilizados	52

ESTUDIO COMPARATIVO DEL PERFIL DE ALGUNAS ENZIMAS DIGESTIVAS IMPORTANTES EN *Penaeus stylirostris*, *Penaeus californiensis*, *Procambarus clarkii* y *Cherax quadricarinatus*

I. INTRODUCCIÓN

En la acuicultura los estudios sobre la nutrición de organismos acuáticos son importantes para el éxito de los cultivos, ya que la formulación de alimentos efectivos depende del conocimiento nutricional a nivel bioquímico y fisiológico de las especies a producir (Vega-Villasante *et al.*, 1995). La aplicación de la biotecnología marina en esta área han dado una nueva dimensión al estudio de especies que representan un elevado potencial de cultivo. En el caso de las nutrición, los estudios de enzimas digestivas involucradas en el proceso metabólico de nutrientes han impactado, beneficiando el estudio actual de dichas especies. Los ensayos alimenticios comúnmente se utilizan para medir el valor nutritivo de las dietas para el crecimiento que presentan los organismos acuáticos; sin embargo, estos métodos son costosos, consumen tiempo y los resultados se ven afectados por los factores ambientales (Lan *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1980; Ezquerro *et al.*, 1997).

Dentro del marco de especies acuáticas susceptibles de ser cultivadas el grupo de los crustáceos son los que poseen la más alta rentabilidad históricamente, en estos organismos, la asimilación de nutrientes depende de su complejo sistema digestivo. Actualmente los estudios de nutrición se han enfocado a evaluaciones bioquímicas y de biología molecular, lo cual, ha generado interesantes resultados sobre los procesos digestivos y utilización de alimentos por estos organismos (Ceccaldi, 1998; Vega-Villasante *et al.*, 1995; Tsai *et al.*, 1986).

Con las evaluaciones de actividad de enzimas digestivas, es posible diseñar una dieta óptima basada en el conocimiento de las capacidades fisiológicas del organismo (Lee

et al., 1984; Vega-Villasante *et al.*, 1995); estas evaluaciones se realizan utilizando substratos específicos, que incluyen en su estructura un aminoácido particular (García-Carreño y Navarrete del Toro, 1997).

La cantidad de alimento suministrado ha sido un problema primordial para los cultivadores de crustáceos en muchos países, ya que el alimento sin digerir junto con los desechos, generan altas concentraciones de nutrientes disueltos, los cuales inducen a la eutroficación (Hernández-Cortes *et al.*, 1999). Por lo tanto, es importante determinar el valor protéico y los valores de la energía de una dieta, para optimizar los componentes en las mismas. Un método sería evaluar los coeficientes de digestibilidad de proteínas, lípidos y carbohidratos (Cousin *et al.*, 1996). Generalmente las dietas son evaluadas con técnicas indirectas para las estimaciones (Jones y De Silva, 1998); que no resultan muy precisas.

La hidrólisis bioquímica de los alimentos se realiza gracias a la acción de enzimas digestivas procedentes principalmente de la glándula del intestino medio o del hepatopáncreas, esta glándula ocupa una gran parte de la cavidad cefálica posterior a la cavidad cardíaca del estómago y presenta dos lóbulos separados, los cuales están compuestos por hileras de túbulos ciegos que vierten, por el extremo abierto, sus productos de secreción al estómago. Cada lóbulo está conectado ventralmente con el tubo digestivo en la unión del estómago pilórico y la parte anterior del intestino. Las paredes de los túbulos están constituidas por células de absorción y de acumulación, células secretoras y las células embrionarias (Cruz, 1998).

Las células secretoras o células B presentan un núcleo basal y grandes vacuolas citoplasmáticas llenas de material acidófilo. Estas células de borde estriado tienen

mecanismos de secreción diversa. Las células R o de absorción, captan los nutrientes presentes en la luz de los túbulos y sintetizan glucógeno y lípidos (Cruz, 1998).

Las células fibrilares sintetizan las enzimas digestivas y las guardan en reserva en una vacuola supranuclear. Esta última se agrandará por pinocitosis capturando los nutrientes de la luz tubular hasta originar una célula B típica: estas mismas, cuando están repletas, son las más voluminosas de las células de la glándula del intestino medio. Contienen una vacuola central única que se representa al menos 4/5 partes del volumen celular. Se piensa que la secreción es de tipo mecánico merocrino (en la secreción no se daña la pared celular) o apocrino (en la secreción puede dañarse la pared celular) en condiciones fisiológicas normales pero, que en caso de estimulación interna la secreción puede ser holocrina (En las secreciones se incluyen restos celulares) (Cruz, 1998).

El conjunto de enzimas proteolíticas, está constituido por dos grupos: las endopeptidasas que cortan los enlaces peptídicos en el interior de las cadenas proteicas y las exopeptidasas que cortan los enlaces peptídicos aminoterminales, carboxiterminales y los dipéptidos. En los crustáceos la digestión química de proteínas comienza en la cavidad cardíaca del estómago y continúa en los túbulos del hepatopáncreas. El modelo de hidrólisis de proteínas es en grandes líneas, similar al de los vertebrados: ruptura de las proteínas por las endopeptidasas, degradación de los peptídicos por las exopeptidasas y absorción a nivel de células especializadas del hepatopáncreas, células embrionarias y células fibrilares (Cruz, 1998).

Dentro de las exopeptidasas más estudiadas tenemos a la tripsina que hidroliza el enlace peptídico, en donde, el grupo carboxilo (C=O) es donado por la lisina o arginina, sin importar la secuencia de aminoácidos; y la quimiotripsina actúa preferentemente en los

enlaces cuya parte carboxílica se deriva de aminoácidos que contienen una cadena lateral aromática, como la fenilalanina y la tirosina, o una cadena lateral voluminosa de naturaleza hidrofóbica; por parte de las exopeptidasas tenemos a las carboxipeptidasas A y B entre otras, la primera actúa preferentemente sobre el carbón terminal que tiene aminoácidos aromáticos o cadenas laterales y la segunda actúa sobre los aminoácidos lisina, arginina y ornitina (Ezquerro *et al.*, 1997).

Las características de las enzimas asociadas con el tracto digestivo determinan la capacidad del organismo para hidrolizar proteínas, por esta razón es importante el estudio de las mismas. Los métodos *in vitro* para evaluar la digestibilidad proteica son útiles, usualmente rápidos, menos costosos que los métodos *in vivo* y proveen una evaluación mas detallada del porcentaje del total de enlaces peptídicos hidrolizados de proteína alimentaria utilizando solo pequeñas cantidades de muestra (Ezquerro *et al.*, 1997).

Los estudios de enzimas digestivas realizados en laboratorio tales como los que utilizan extractos de enzimas, ofrecen una opción barata, conveniente y rápida para desarrollarla, además puede ser considerada como una prueba de los componentes dietéticos (Lan y Sun, 1993; Omodoni y Stark, 1996). La importancia de estos análisis como herramienta en el estudio de nutrición radica en la descripción del patrón alimentario de un organismo, tal como la capacidad de hidrolizar específicamente materiales individuales en la dieta, la respuesta a diferentes fuentes y niveles de nutrientes, a la contribución bacteriana en la digestión, las secreciones circadianas y, los cambios por el crecimiento y estado de maduración (Lee *et al.*, 1984).

II. ANTECEDENTES

Es importante entender el papel que desempeñan las enzimas digestivas de los crustáceos para desarrollar nuevas y mejores dietas (Vega-Villasante *et al.*, 1995), las cuales, se ajusten a los requerimientos nutricionales de cada especie, por lo tanto se requiere de un conocimiento más específico de todos los tipos de enzimas participantes que interactúan durante la digestión (Le Chevalier y Van-Woenshoudt, 1998).

Las investigaciones sobre las enzimas digestivas del hepatopáncreas de varios crustáceos, indican que las principales proteasas son tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidasa A y B, leucina amino-peptidasa, colagenasa, proteasas alcalinas de bajo peso molecular, enzimas bacteriolíticas, di y tri peptidasa (Mendoza, 1993; Cruz, 1998), Además de estas proteasas, la presencia de carbohidrolasas y lipasas han sido documentadas en crustáceos (Goeff y Smith en 1998). También existen quitinasa que permiten la digestión de la quitina la cual, constituye el exoesqueleto de los artrópodos: los crustáceos consumen su propia quitina y a veces depredan otros crustáceos (Cruz, 1998).

Los crustáceos poseen una digestión esencialmente entre neutra y básica (con pH's de 6 a 11). Sin embargo, se han reportado actividades proteolíticas a pH's bajos como es el caso de *Homarus americanus* (pH = 2.5) y *Penaeus monodon* (pH = 4) (Mendoza, 1993; Ceccaldi, 1998).

La mayoría de los decápodos presentan una alta actividad proteolítica (García-Carreño *et al.*, 1994), y la tripsina parece ser la principal enzima con un 60% de la actividad proteasica presente en estos animales (Cruz, 1998) tales como *Procambarus clarkii*. y *Panulirus* sp. la cual esta compuesta por 6 isoenzimas, mismas que presentan un peso molecular alrededor de 24 kDa (Ceccaldi, 1998); la importancia de esta enzima y su

especificidad hacia los aminoácidos básicos que son esenciales en la nutrición de crustáceos, hace resaltar el problema de la calidad de las proteínas que se utilicen en su alimentación. Estas proteínas deben contener los aminoácidos esenciales en cantidad adecuada, pero también aminoácidos que permitan un hidrólisis rápida de las proteínas de la dieta (Cruz, 1998).

Ceccaldi, en 1998 examinó algunas otras proteasas detalladamente en algunas especies de penaeidos y de acociles; encontrando que las carboxipeptidasas A y B, mostraron mucha similitud entre las actividades encontradas en diferentes especies de crustáceos .

Las proteasas son probablemente las enzimas más estudiadas en los alimentos que cualquier otro grupo de enzimas. El conocimiento de la hidrólisis de proteína puede contribuir tanto para mejorar o para perder la calidad del alimento. La autólisis del músculo en crustáceos ocurre rápidamente después de la cosecha lo cual se ha atribuido a las proteasas digestivas; estas pueden ser directamente responsables de los cambios postmortem y por consiguiente la calidad del producto (Ezquerro y García -Carreño, 1997).

Aún cuando las proteasas han sido estudiadas por numerosos investigadores, existen pocos datos referentes a las enzimas que participan en el proceso de hidrólisis de carbohidratos. El impacto económico de utilizar fuentes adecuadas de carbohidratos debe ser una alternativa para reemplazar parcialmente la parte proteica, reduciendo así los requerimientos de proteína en la dieta (Le Chevalier y Van-Woenshoudt, 1998).

Se ha sugerido que el aporte principal de energía en los crustáceos no son los carbohidratos o lípidos sino la proteína. Como quiera que sea se ha establecido que el incremento del contenido de carbohidratos en las dietas de los juveniles de *P. indicus* de un

10 a 40% incrementa la eficiencia de conversión alimentaria, el crecimiento y la sobrevivencia. Esto puede reducir significativamente los costos de alimentación debido a que los carbohidratos son económicamente más baratos que las proteínas (Omodini y Stark, 1996).

Las enzimas digestivas de los crustáceos cambian con respecto a las diferentes etapas de desarrollo de su ciclo de vida (Biesiot y McDowell, 1990; Fernández *et al.*, 1997) y los orígenes de las alteraciones enzimáticas más comunes son el valor de la composición alimentaria, la estación del año, y el ritmo circadiano (Fernández *et al.*, 1997).

Los crustáceos aparentemente también han desarrollado estrategias enzimáticas para utilizar polisacáridos de las células vegetales como fuentes de nutrientes. Específicamente se han reportado actividades celulasa en los órganos digestivos de una gama de especies de crustáceos. Estos reportes dan como resultado potenciales mejoras en las prácticas de alimentación de crustáceos. A la par del desarrollo de la acuicultura moderna, la biotecnología marina y su aplicación en la nutrición ha venido a ser un rubro importante para mejorar la producción. Para optimizar la dietas de los organismos es importante conocer las capacidades individuales digestivas y los requerimientos nutricionales. Sin embargo, actualmente se ha dedicado poca atención en este aspecto en los cultivos de crustáceos en donde las dietas artificiales utilizadas son, algunas veces, dietas realizadas para vertebrados o para crustáceos en general (Xue *et al.*, 1999).

El camarón café (*Penaeus californiensis*) es considerado como una especie viable para ser cultivada. Solo algunos estudios relacionados a su biología han sido publicados y los requerimientos nutricionales de este camarón han recibido poca atención (Vega-Villasante, *et al.*, 1995). Por otra parte, el camarón azul (*Penaeus stylirostris*) es una

especie importante en cultivos comerciales; y ya se tienen algunos estudios sobre sus actividades enzimáticas digestivas.

El cultivo a nivel mundial de acociles de agua dulce es importante, sin embargo poca información esta disponible, específicamente de nutrición, digestibilidad de nutrientes y requerimientos dietéticos de las especies mas popularmente cultivadas. Como consecuencia la formulación de dietas para estos animales esta poco desarrollada (Jones y De Silva, 1997).

El género *Cherax* ha recibido considerable interés primero por parte de los acuicultores de los Estados Unidos. La especie *C. quadricarinatus* ha sido estudiado extensamente como un candidato potencial para cultivarlo a nivel comercial. Algunas características atractivas de esta especie incluye un comportamiento no agresivo, multiples desoves anuales entre otras, lo que lo hace una especie ideal para el cultivo. El conocimiento de los requerimientos dietéticos es esencial para un cultivo exitoso de *C. quadricarinatus*; a la fecha, es muy poco lo que se conoce en lo referente a los requerimientos dietéticos de esta especie tanto de los juveniles o los adultos (Meade y Watts, 1995).

Debido a la actual importancia y potencial de cultivo de muchos crustáceos en particular los decápodos, en muchos países del mundo, es necesario hacer estudios de sus perfiles enzimáticos digestivos con el objetivo de optimizar la formulación de dietas, y con ello reducir significativamente los costos y conocer en parte el proceso digestivo propio de los crustáceos. En este trabajo, el objetivo principal es analizar y comparar el perfil de algunas enzimas importantes que participan en el proceso digestivo de *Penaeus stylirostris*, *Penaeus californiensis* *Procambarus clarkii* y *Cherax quadricarinatus*.

III. OBJETIVOS

III.1. Comparar el perfil de algunas enzimas digestivas, en *Penaeus stylirostris*, *Penaeus californiensis*, *Procambarus clarkii* y *Cherax quadricarinatus*.

III.1.1. Determinar y comparar la actividad de proteasas digestivas importantes en *P. stylirostris*, *P. californiensis*, *P. clarkii* y *C. quadricarinatus*

1.1.1. Determinar y comparar la actividad proteolítica Total.

1.1.2. Determinar y comparar la actividad de la Tripsina.

1.1.3. Determinar y comparar la actividad de la quimiotripsina.

1.1.4. Determinar y comparar la actividad de la Carboxipeptidasa A y Carboxipeptidasa B

III.1.2. Determinar y comparar la actividad β -glucosidasa en *P. stylirostris*, *P. californiensis*, *P. clarkii* y *C. quadricarinatus*

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. 1 OBTENCIÓN DE ORGANISMOS.

Para este estudio se utilizaron organismos adultos, los organismos *Procambarus clarkii* fueron obtenidos a través de la Universidad de Louisiana, USA. Los organismos de la especie *Cherax quadricarinatus* fueron obtenidos en la granja de cultivo comercial de langosta de agua dulce "El Jicarero", ubicada en Cuernavaca, y tanto *Penaeus stylirostris* como *Penaeus californiensis* se colectaron en la bahía de Topolobampo, Sinaloa con la ayuda de pescadores ribereños de la zona.

IV.2 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE HEPATOPÁNCREAS DE CRUSTÁCEOS.

Las extracciones de hepatopáncreas se realizaron cuando los crustáceos estaban aún vivos. los cuales se pesaron y homogeneizaron en agua destilada fría, el doble de su peso (1:2 w/v). Lo mezcla se centrifugó durante 30 minutos a 600 g a 4 °C con el fin de eliminar lípidos y restos de tejidos celulares. El sobrenadante se congeló a -20 °C; para posteriormente ser utilizado en las evaluaciones enzimáticas (García-Carreño *et al.*,1994), las cuales fueron todas realizadas por triplicado.

IV. 3 ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA TOTAL.

Se midió la actividad proteolítica para conocer la actividad general de los organismos utilizando azocaseína (1%) como sustrato. En una mezcla de reacción de 2 mL se llevó a cabo la actividad proteolítica a 30 °C en una solución amortiguadora de 50mM Tris-HCL, pH 7.5, durante 10 minutos. La mezcla de reacción contiene azocaseína (1%) como sustrato y 20 µL de extracto enzimático. Para detener la reacción después de 10 minutos se agregó 0.50 mL de TCA al 20% (w/v); enseguida la reacción se colocó en frío (4 °C) por 10 minutos para ayudar a detener la reacción. La mezcla se centrifugó a 11,750 x g durante 5 minutos y del sobrenadante se midió la absorbancia a 366 nm. Para los controles el TCA se agregó antes de agregar el extracto enzimático (García-Carreño *et al.*,1994). La unidad de actividad se define como el cambio de absorbancia a 366 nm por minutos por miligramo de proteína.

$$\text{Unidades de Actividad (UA)} = \frac{\text{Abs muestra} - \text{Abs control}}{\text{min} \times \text{mg de proteína}}$$

IV.3.1 Determinación de proteína.

Se utilizó el método Bradford (1976) para los ensayos de evaluación de proteínas, utilizando albúmina de bovino (BSA) a una concentración de 1 mg/mL. como estándar para la curva de calibración. En breve, se toman 100 µL de la muestra y se agrega 900µL del reactivo Bradford fresco, después de 5 minutos se lee a 595nm de absorbancia, en un espectro de luz visible Elíptica.

IV.3.2. Sustratos utilizados para las actividades específicas

Los sustratos específicos fueron: Hipuryl-L-phe (HLPA) para carboxipetidasa A, Hipuryl-L-Arg (HLA) para caboxipeptidasa B, Benzoyl-arg-p-nitroanilide (BAPNA) para tripsina, Succinyl-(Ala)₂-Pro-Phe-p-nitroanilide(SAAPFNA) para quimi tripsina, y p-nitrophenyl- α -D-Glucopiranoside. Todos fueron obtenidos de la compañía SIGMA.

IV. 4 ACTIVIDAD DE TRIPSINA

La reacción se llevó a cabo utilizando un volumen de 1.25 mL de la solución de BAPNA 1 mM con 20 μ L del extracto de camarones y 50 μ L del extracto en el caso de acociles. El sustrato Benzoyl-Arg-p-nitroanilide (BAPNA), fue disuelto en 1mL de DMSO para hacer una solución 1mM (43.5 g) y aforar a 100 mL en un amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.5 que contiene 20 mM CaCl₂ a 37°C para solubilizar el sustrato. La reacción se llevó a cabo a 30°C por 7 minutos midiendo la absorbancia a 410nm en intervalos de 20 segundos en un espectrofotómetro Eliptica-Vis. La actividad trispina se ensayo a diferentes temperaturas: 30, 40, 45, 50, 60 y 70°C. Para las lecturas de absorbancia se utilizó agua destilada como blanco (Garcia-Carreño *et al.*,1994).

Las unidades de actividad fueron obtenidas de la relación $U.A. = (\Delta A_{410} / \text{min}^{-1} \times [1000 \times \text{volumen de reaccion}] / 8800 \times \text{mg de proteina en la reaccion})$, donde 8800 es el coeficiente de extinción del p-nitroanilide.

IV.5 ACTIVIDAD QUIMIOTRIPSINA

La actividad de la quimitripsina se determinó usando $7.7\mu\text{M}$ de Succinyl-(Ala)₂-Pro-Phe-p-nitroanilide (SAPFNA). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 0.6 como sustrato en una solución amortiguadora 0.1M de Tris a pH de 7.8 conteniendo 0.01M de CaCl₂. La reacción se realizó estandarizada a 30°C con 20 μL del extracto enzimático. El curso de reacción se determinó a 410 nm de absorbancia, en un espectro de luz visible Elíptica, por 3 minutos con intervalos de 20 segundos (García-Carreño *et al.*,1994). Las unidades de actividad fueron obtenidas de la relación $\text{UA} = (\Delta A_{410} \times \text{min}^{-1} \times 1000 \times \text{volumen de reacción} / 8800 \times \text{mg de proteína en la reacción})$, donde 8800 es el coeficiente de extinción del p-nitroanilide.

IV. 6 ACTIVIDAD DE LA CARBOXIPEPTIDASA A

En una mezcla de reacción de un volumen de 2 mL, se determinó la actividad de la Carboxipeptidasa A, en una solución amortiguadora Tris 50 mM, pH 7.5, la cual contiene 10 % de LiCl y 500 mM NaCl y 1 mM de hippuryl-L-Phe-(HLPA) como sustrato. La reacción se inicia cuando se le agregó 20 μL del extracto enzimático. El curso de reacción se determinó a 254 nm , en un espectrofotómetro UV/visible, Pharmacia Biotech, Ultrospec 200, por 3 minutos con intervalos de 3 segundos a 25°C.

Las unidades de actividad se obtuvieron de la relación siguiente

$$\text{UA} = \frac{\Delta A_{254} / \text{min}}{0.36 \times \text{mg de proteína} \times \text{mL de reacción a } 25^{\circ}\text{C}}$$

0.36 es el coeficiente de extinción molar de ácido hipúrico

IV.7 ACTIVIDAD DE LA CARBOXIPEPTIDASA B.

En una mezcla de reacción de un volumen de 2 mL se determinó la actividad de la Carboxipeptidasa A, en una solución amortiguadora Tris 50 mM, pH 7.5, la cual contiene 100 mM NaCl y 1 mM de hippuryl-L-Arg-(HLA) como sustrato. La reacción se inicia cuando se le agregó 20 μ L de extractos enzimático. El curso de reacción se determinó a 254 nm, en un espectrofotómetro UV/visible, Pharmacia Biotech, Ultrospec 200, por 3 minutos con intervalos de 3 segundos a 25°C.

Las unidades de actividad se obtuvieron de la relación siguiente

$$UA = \frac{\Delta A_{254} / \text{min}}{0.36 \times \text{mg de proteína} \times \text{mL de reacción a } 25^{\circ}\text{C}}$$

0.36 es el coeficiente de extinción molar de ácido hipúrico

IV.8 ACTIVIDAD β -GLUCOSIDASA

En una mezcla de reacción de 2 mL se determinó la actividad de una β -Glucosidasa utilizando 0.2 mL del sustrato p-nitrophenyl α -D-Glucopiranoside 10 mg/mL en 1.7 mL de una solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM pH 7.0 . La reacción con 100 μ L de extracto enzimático se determinó a 405 nm por 20 minutos con intervalos de 5 minutos, en un espectro de luz visible Elíptica, método adaptado con base a Le Chavelier y Van Wormhoudt (1998). La actividad se obtuvo con base a la siguiente relación:

$$UA = \Delta A_{405} \text{ min}^{-1} \times 1000 \times 2 / 18000 \times \text{mg de proteína en la reacción}$$

donde 18000 es el coeficiente de extinción molar del p-nitrophenyl

IV.9 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS LIOFILIZADOS

Los extractos obtenidos se colocaron en tubos de ensayo y se congelaron a -70°C en el REVCO, y posteriormente se liofilizaron con la ayuda de un liofilizador marca LABCONCO. Después se hicieron preparaciones con el liofilizado mezclándolo con agua destilada, que para el caso de los camarones fue de 2 mg/mL y para los acociles fue 3 mg/mL con los cuales se procedió a hacer las mediciones de actividad enzimática.

IV.10 CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE LOS LIOFILIZADOS.

IV.10.1. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA TOTAL.

Se realizó en ensayo de actividad proteolítica total con los diferentes liofilizados a 30°C , siguiendo la metodología descrita anteriormente en la sección IV.3.

IV.10.2 ACTIVIDAD PROTEOLITICA TOTAL A DIFERENTES TEMPERATURAS

Se realizaron ensayos de actividad proteolítica total a diferentes temperaturas de incubación (30, 40, 50, 60 y 70°C) siguiendo la metodología descrita anteriormente en la sección IV.3.

IV.10.3 ACTIVIDAD PROTEOLITICA TOTAL A DIFERENTES VALORES DE pH

Se realizaron varios ensayos de actividad proteolítica total a modificando el pH de 6 hasta 9, y los controles se mantienen a un pH fijo de 7.0; siguiendo la metodología descrita anteriormente en la sección IV.3. Las unidades de actividad proteolítica total están descritas por el cambio de absorbancia / tiempo de reacción por mg de proteína.

IV.10.4 ESTABILIDAD TÉRMICA DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE EXTRACTOS LIOFILIZADOS

Para determinar la estabilidad térmica de la actividad proteolítica con respecto a la temperatura, los extractos se incubaron a diferentes temperaturas comenzando de 30°C hasta 70°C, y se tomaron muestras cada 10 minutos para llevar a cabo las mediciones de actividad proteolítica total siguiendo la metodología descrita anteriormente en la sección IV.3.

IV.10.5 ESTABILIDAD AL pH DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE EXTRACTOS LIOFILIZADOS

Se incubaron 20 μ L del extracto en 180 μ L de una solución amortiguadora Tris-HCl 50mM por 40 minutos a 30°C a los diferentes pH (6, 7, 7.5, 8, 9 y 9.5). La actividad proteolítica se llevó a cabo en una mezcla de reacción agregando 300 μ L del azocaseína al 1% disuelta en una solución amortiguadora 7.5 a la porción incubada. Para detener la reacción después de 10 minutos se agregó 0.50mL de TCA al 20% (w/v). La mezcla se

centrifugaron a 11,750 x g durante 5 minutos y el sobrenadante se midió a 366nm. Para los controles el TCA se agregó antes de agregar el extracto (Garcia-Carreño *et al.*,1994).

IV.11 ELECTROFORESIS (SDS-PAGE)

Una muestra de los extractos liofilizados de *P. stylirostris* (9.8 mg), *P. californiensis* (9.6 mg), *P. clarkii* (10.4 mg) y *C. quadricarinatus* (10 mg), fueron reconstituidos con 500 µL de agua destilada y agitados con un vortex por un espacio de 15 minutos, después se centrifugaron un minutos a 8,160 x g . Del sobrenadante obtenido, se tomaron 5 µl diluidos con 95 µL de agua destilada, para la determinación de proteína con el método Bradford. Además se tomaron 3 µl de cada uno de los sobrenadantes obtenidos de los extractos para la determinación de actividad proteolítica total siguiendo la metodología descrita anteriormente en la sección IV.3

IV.11.1 SDS-PAGE

Las electroforésis se realizaron en una cámara Mini PROTEAN II (Bio-Rad) con dos placas de geles verticales de 8 x 10 x 0.075cm. Cada placa estaba compuesto por dos tipos de geles; gel concentrador con 4% de poliacrilamida y, un gel separador con 12% de poliacrilamida. En la tabla I se detalla el procedimiento empleado para la elaboración de los geles de poliacrilamida. El gel separador se adicionó primero después de que polimerizó, se adicionó el gel concentrador colocando el peine para formar los carriles de corrida. Una vez montados los geles en la cámara, se vertió la solución amortiguadora de corrida (0.025M Tris, 0.192 M glicina, pH 8.3; 0.1% SDS(p/v) y la electroforésis sin muestras se corre por 10 minutos a 20 mA, para observar el buen funcionamiento.

Tabla I. Protocolo de preparación de los geles para la electroforésis

Reactivo	Gel concentrador 4%	Gel separador 12%
Agua destilada	3.35 mL	2.723 mL
Sol. amortiguadora pH 6.8 (1)	2.5 mL	0.0 mL
Sol. amortiguadora pH 8.8 (2)	0.0 mL	1.121 mL
acrilamida:bis-acrilamida 30:0.8	4.0 mL	0.533 mL
SDS 10%	0.1 mL	0.045 mL
Persulfato de amonio (PSA 10%)	0.05 mL	0.022 mL
TEMED	0.005 mL	0.006 mL
Volumen final	10 mL	4.5 mL

(1) Solución amortiguadora Tris-HCl ,0.05M pH 6.8

(2) Solución amortiguadora Tris-HCl ,1.5M pH 8.8

TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamida)

Para lograr que el frente de polimeración del gel separador sea recto se utiliza isopropanol

IV.11.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los extractos se mezclaron 1:1 con la solución amortiguadora de muestra (0.125 Tris-HCl, pH 6.8, 2 % SDS(p/v), 20 % glicerol (v/v), 0.04 % (p/v) y azul de bromofenol (colorante trazador que permite visualizar el frente de la electroforésis)).

IV.11.3 PROTEÍNAS EN GEL.

Para evidenciar las proteínas cada uno de los carriles se cargó con 20 µg de proteína por muestra (utilizando una jeringa hamilton) y se corrió por 2 horas, a 15 mA por gel a 4°C. El marcador de bajo peso molecular utilizado se ilustra en la tabla II.

Tabla II. Estándar de proteínas para electroforésis

Proteína	PM
Apoproteína	6500
Alpha-lactoalbumina	14200
Inhibidor de tripsina	20000
Tripsogeno	24000
Anhidrasa-carbónica	29000
Gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa	36000
Ovoalbumina	45000
Albumina	66000

Después de concluir la electroforésis, el gel se retiró de las placas de vidrio, tomando solo el gel separador y se procedió a teñirlo con una solución de azul de comassie (0.05% azul de comassie brillante, 40% metanol y 7% de ácido acético) por un tiempo de 20 minutos. Posteriormente se destiño, con agitación constante, en una solución que contenía 40% de metanol y 7% de ácido acético, misma que se recambió cada media hora las primeras 2 horas y se dejó toda la noche con una solución nueva para destañir el gel quedando solamente las bandas de proteínas fijadas.

IV. 11.4 ZIMOGRAMAS

Con el fin de evidenciar las bandas de proteínas con actividad proteolítica se procedió a realizar los zimogramas. Se corrió la electroforésis cargando los carriles con 5, 7 y 10 mU de actividad para cada muestra, lo anterior para verificar con que cantidad de actividad se evidenciaban mejor las bandas de actividad para los diferentes sustratos.

El procedimiento de electroforesis es igual al descrito anteriormente para determinar las proteínas, solo cambió en el tratamiento posterior a la corrida.

Una vez concluida la electroforésis, el gel se incubó a 4°C, con agitación constante, en caseína (2 %) preparada con una solución amortiguadora Tris-HCl 0.05M pH 7.5, durante 30 minutos y a continuación se lavó con agua destilada y se pasó a una solución de caseína (2 %) para incubarse a temperatura ambiente por 90 minutos. Concluida la incubación se lavó el gel con agua destilada y se fijó con TCA (ácido tricloroacético) al 12%. Posteriormente los geles se tñieron con la solución de azul de commassie (0.05% azul de commassie brillante, 40% metanol y 7% de ácido acético) por 30 minutos. Al finalizar la tinción de las bandas obtenidas en los estándares se obtiene su RM (distancia relativa de migración), que determina el peso molecular aproximado de las bandas de proteína que revelaron actividad.

IV.12 PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos de cada una de las actividades enzimáticas fueron evaluados estadísticamente con la ayuda del paquete Statistica 5.0 para Windows, sometiendo los resultados a una ANOVA simple y la diferencia entre grupos se realizó con una prueba a posteriori de Duncan (todos los análisis se realizaron con un 95% de confianza).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1 Actividad proteolítica total de extractos crudos

Como podemos observar en la figura 1, la mayor actividad se presentó en el extracto de *P. stylirostris* 2.078 ± 0.014 UA, siendo este significativamente mayor que el resto; los extractos de *P. californiensis* 0.987 ± 0.11 UA y *P. clarkii* 1.005 ± 0.070 UA, mostraron similitud estadística, quedando *C. quadricarinatus* 0.3873 ± 0.085 UA como el de menor actividad (UA = unidades de actividad).

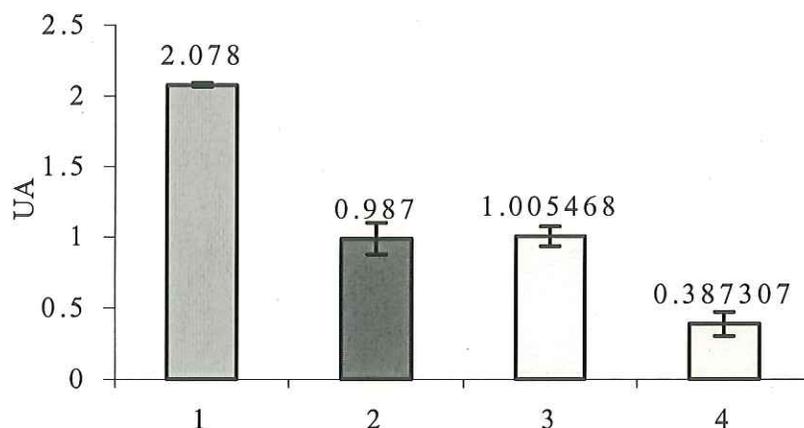


Fig.1 Valores de actividad obtenidas de los extractos crudos de especies de decápodos (1) *P. stylirostris*, (2) *P. californiensis*, (3) *P. clarkii*, (4) *C. quadricarinatus*. con una desviación estándar $P = 0.05$

Los acociles mostraron suficiente actividad proteolítica para ser analizados mediante el mismo procedimiento utilizado para los camarones. Los resultados de baja actividad sugieren existen enzimas participantes en el proceso de digestión que no son proteasas (Galgani, 1988), por lo cual deben considerarse, en estudios posteriores, la evaluación de otro tipo de enzimas como celulasas, lipasas entre otras.

Por otra parte, los valores de actividad obtenidos para *P. californiensis* son similares a los obtenidos por García-Carreño *et al.*, 1997, y los valores de actividad obtenidos para *P. stylirostris* fueron mayores que los reportados para *P. vannamei* (Ezquerro *et al.*, 1997; García-Carreño *et al.*, 1997; Hernández-Cortés, *et al.*, 1999), esto puede explicarse debido a que los organismos en este estudio fueron obtenidos del medio natural y sus hábitos alimenticios son diferentes.

Las primeras diferencias dan pauta para evaluar actividades específicas de enzimas importantes en el proceso digestivo de los crustáceos; entre las que encontramos a, tripsina y quimiotripsina, carboxipeptidasa A y B (Tsai *et al.*, 1986; Galgani, 1988; Vega-Villasante *et al.* 1995; Fernández *et al.*, 1997).

V.2 Tripsina

Las actividades de tripsina a 30 °C fueron: *P. stylirostris* 0.425 ± 0.023 UA , *P. californiensis* UA 0.464 ± 0.033 UA, *P. clarkii* $6.25e^{-5} \pm 5.51e^{-5}$ UA y *C. quadricarinatus* $5.5137e^{-5} \pm 0$ UA . Estos resultados se obtuvieron con base a las pendientes obtenidas en las curvas de reacción en las figuras 2, 3, 4 y 5.

Los resultados dela ANOVA simple, mostraron que existe diferencia significativa entre los grupos. De la prueba Duncan se obtuvo como resultado que solo las especies de acociles son estadísticamente similares.

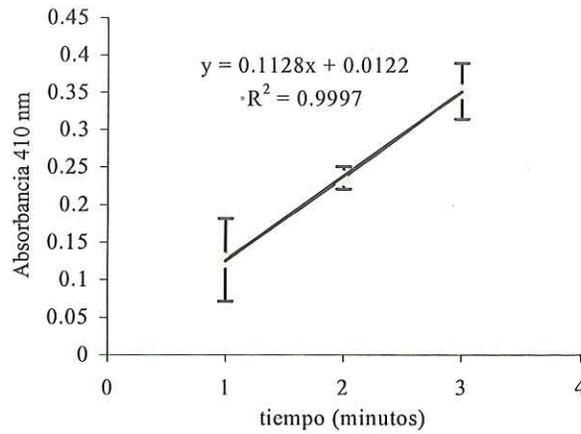


Fig.2 Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 30 °C de extractos de *P. stylirostris*, con desviación estándar $p = 0.05$

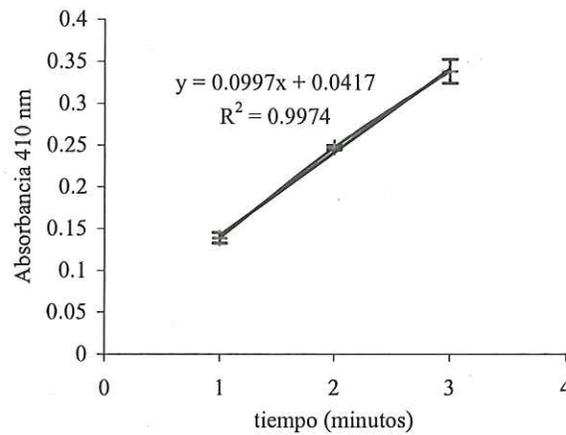


Fig.3 Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 30 °C de extractos de *P. californiensis*, con desviación estándar $p = 0.05$.

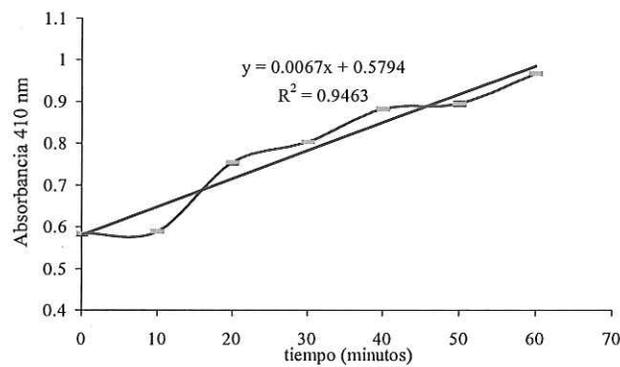


Fig.4 Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 30 °C de extractos de *P. clarkii*, con desviación estándar $p = 0.05$

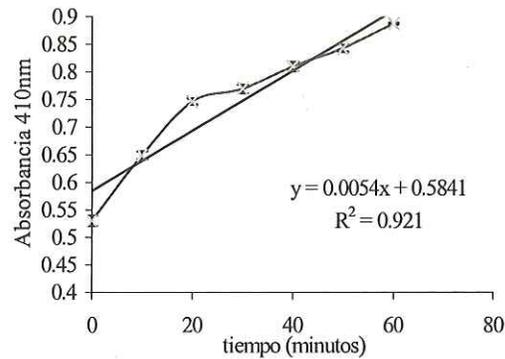


Fig. 5 Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 30°C de extractos de *C. quadricarinatus*, con desviación estándar $p = 0.05$

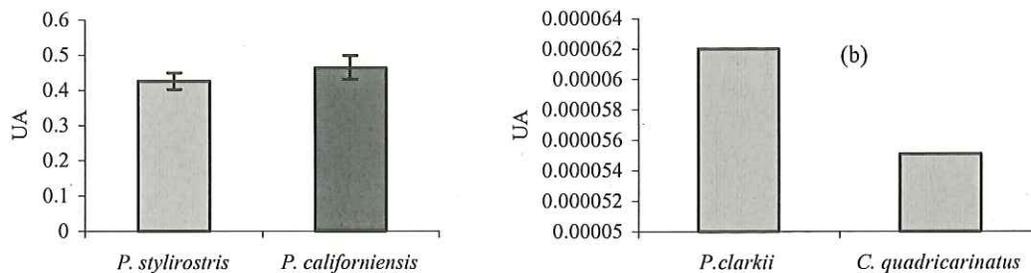


Fig. 6 Actividad tripsina a 30 °C (a) camarones y (b) acociles.

Se hicieron evaluaciones de actividad tripsina, la cual representa del 50 al 60% de la proteólisis total según varios autores (Fernández *et al.*, 1997; Cruz, 1998). En la figura 6 se pueden observar las diferencias significativas de la actividad tripsina entre peneidos y acociles. Las diferencias son por varios ordenes de magnitud.

La importancia relativa de esta enzima y su especificidad hacia los aminoácidos básicos, que son necesarios en la nutrición de crustáceos, hace resaltar el problema de la calidad de las proteínas que se utilicen en su alimentación, en este caso en alimentos balanceados. Estas proteínas deben contener los aminoácidos esenciales en cantidad

óptima, pero también los aminoácidos que permitan una hidrólisis rápida de las proteínas (Cruz, 1998). Así mismo se debe de tener precaución de no adicionar componentes que inhiban la actividad de esta enzima, lo anterior nos sugiere, a futuro, estudios relacionados con inhibidores de esta enzima.

V.3 Quimiotripsina

De las figuras 7,8, 9 y 10 se obtuvieron de las reacciones para determinar la presencia de la actividad quimiotripsina. El análisis estadístico ANOVA reflejó diferencias significativas entre los cuatro grupos. El análisis a posteriori de Duncan determinó que existe una diferencia significativa entre los grupos de camarones y el grupo de los acociles; y no se encontró diferencia significativa ($p = 0.05$) entre *P. stylirostris* 0.5187 ± 0.05 UA y *P. californiensis* 0.5909 ± 0.0001 UA, (figura 11), así mismo para *P. clarkii* 0.0006 ± 0.0004 UA y *C. quadricarinatus* 0.0007 ± 0.0 UA, (figura 12).

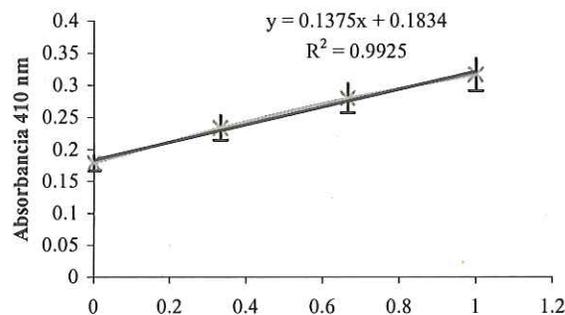


Fig.7 Cambio de absorbancia para la actividad quimiotripsina en extractos de *P. stylirostris*, con desviación estándar $p = 0.05$

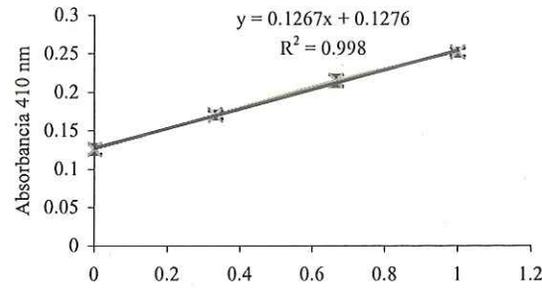


Fig.8 Cambio de absorbancia para la actividad quimi tripsina en extractos de *P. californiensis*, con desviación estándar $p = 0.05$

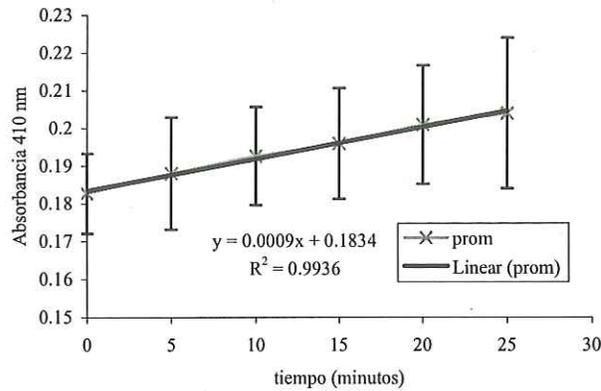


Fig.9 Cambio de absorbancia para la actividad quimi tripsina en extractos de *P. clarkii*, con desviación estándar $p = 0.05$

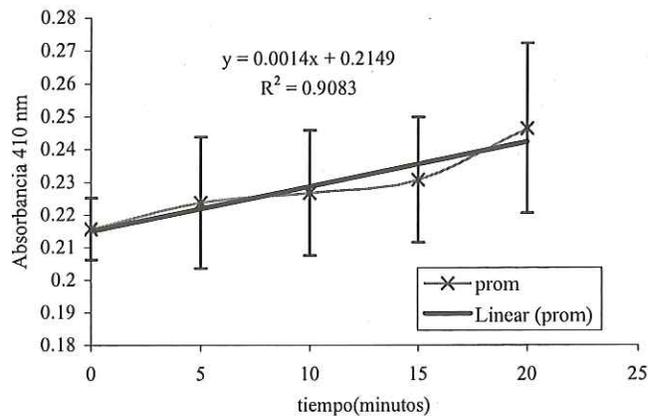


Fig.10 Cambio de absorbancia para la actividad quimi tripsina en extractos de *C. quadricarinatus*, con desviación estándar $p = 0.05$

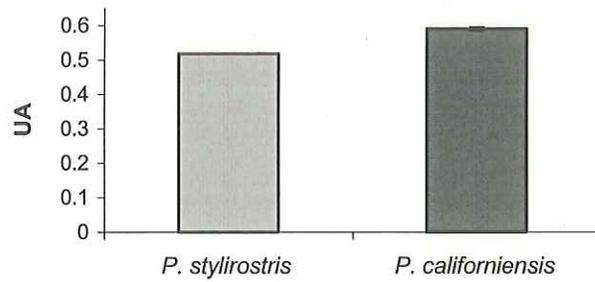


Fig. 11 . Actividad específica quimiotripsina para extractos de hepatopáncreas de *P. stylirostris* y *P. californiensis*, con desviación estándar $p = 0.05$.

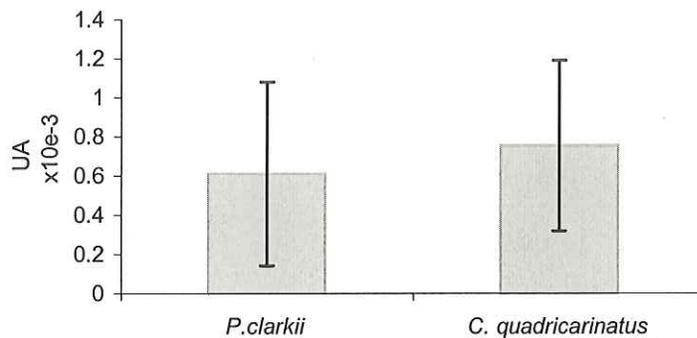


Fig. 12 . Actividad específica quimiotripsina para extractos de hepatopáncreas de *P. clarkii* y *C. quadricarinatus*, con desviación estándar $p = 0.05$.

Lo importante de detectar esta actividad radica en que existe la controversia si esta presente o no, especies de crustáceos. Por una parte, los resultados obtenidos apoyan lo obtenido por Vega-Villasante y colaboradores en 1995, detectando actividad quimiotripsina para *P. californiensis* y apoyando también a Galgani que en 1988, el cual, estudio a cinco especies de peneidos entre ellos *P. stylirostris* detectando esta actividad. Por la otra parte se detectaron estas actividades en *P. clarkii* y *C. quadricarinatus*, especies que no han sido muy estudiadas en este rubro, lo anterior es importante, ya que algunos reportes indican la ausencia de esta enzima en crustáceos decápodos (García-Carreño *et al.*, 1994).

V.4 Carboxipeptidasa A

Se determinó la actividad de carboxipeptidasa A para *P. stylirostris* y *P. californiensis* y sin embargo los acociles (*P. clarkii* y *C. quadricarinatus*) no se logró detectar esta actividad. Para las lecturas de absorbancia de las repeticiones de los ensayos, se encontró una variación entre las mismas para *P. stylirostris* y *P. californiensis* respectivamente (figuras 13 y 14). Utilizando las pendientes resultantes se obtuvieron las actividades específicas carboxipeptidasa A en los extractos crudos de los camarones. Los resultados fueron comparados con una ANOVA simple, encontrando que no existe diferencia significativa, al 95% de confianza, en esta actividad de para *stylirostris* 0.018 ± 0.002 UA y *P. californiensis* $0.016 \pm .0028$ UA.

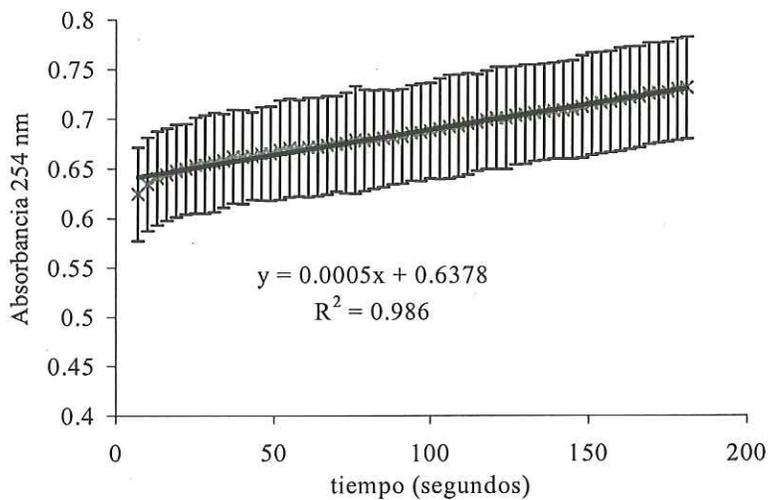


Fig.13. Cambio de absorbancia para la actividad carboxipeptidasa A para *Penaeus stylirostris*, con desviación estándar $p = 0.05$

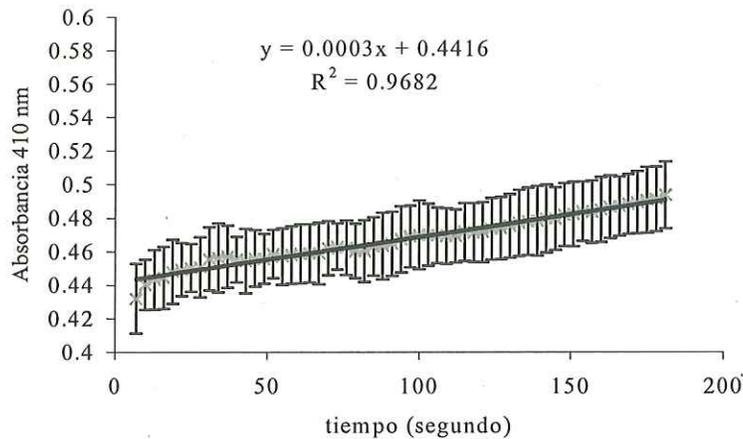


Fig.14. Cambio de absorbancia para la actividad carboxipeptidasa A para *Penaeus californiensis*, con desviación estándar $p = 0.05$

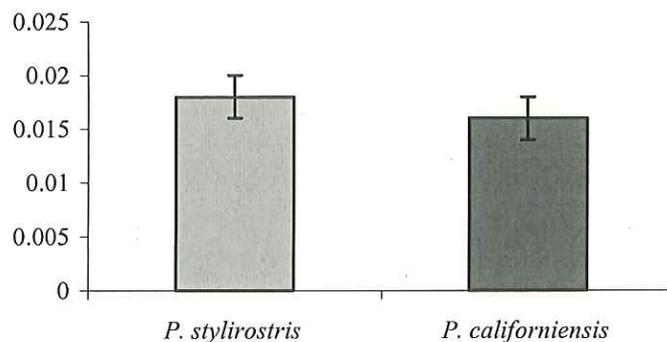


Fig. 15. Actividad específica carboxipeptidasa A para *P. stylirostris* y *P. californiensis* $p = 0.05$

Las carboxipeptidasas A fueron estadísticamente similares en ambas especies. Esta enzima ya ha sido encontrado por Vega-Villasante *et al.* en 1995, para *P. californiensis*, del cual existen pocos estudio y para *P. stylirostris* por Galgani (1988). La diferencia es que los valores obtenidos son más bajos con respectos a los de otros autores, esto se debe principalmente a los regímenes alimentarios particulares de cada los organismo , ya que los camarones utilizados en este estudio eran silvestres.

V.3 Carboxipeptidasa B

Para las lecturas de absorbancia de las repeticiones de los ensayos de actividad en as figuras 16 y 17 se muestran los resultados obtenidos para la actividad específica carboxipeptidasa B en *P. stylirostris* y *P. californiensis*, respectivamente. Utilizando las pendientes resultantes se obtuvieron las actividades carboxipeptidasas A en los extractos crudos de los camarones. Los resultados obtenidos mostraron diferencia, siendo mayor para el caso de *P. californiensis* 0.050 UA y 0.045 UA para *P. stylirostris*. En este caso no fue necesario hacer análisis estadístico ya que no presentaron desviaciones estándar.

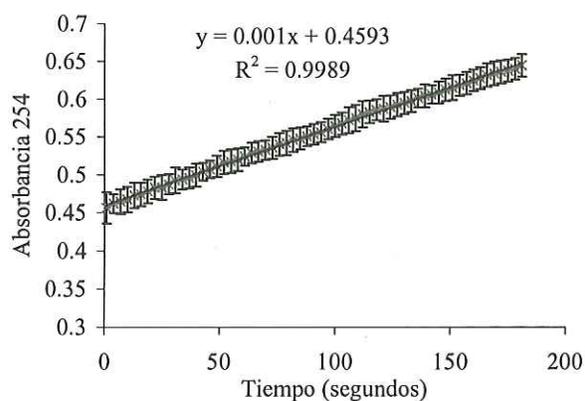


Fig.16. Cambio de absorbancia para la actividad carboxipeptidasa B para *Penaeus stylirostris*, con desviación estándar $p = 0.05$

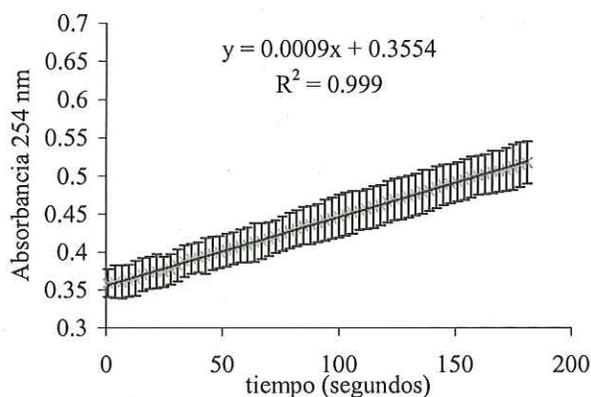


Fig.17 Cambio de absorbancia para la actividad carboxipeptidasa B para *Penaeus californiensis*, con desviación estándar $p = 0.05$

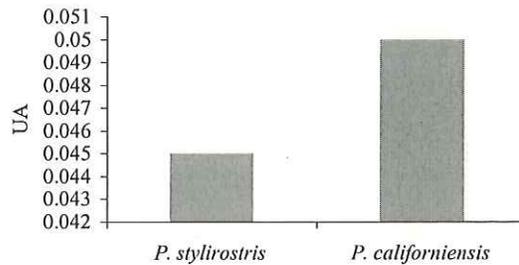


Fig. 18 Actividad Carboxipeptidasa B para *P. stylirostris* y *P. californiensis*, con desviación estándar $p = 0.05$

En la figura 18 se resumen las actividades específicas para carboxipeptidasa B en los camarones. Para el caso de las carboxipeptidasas solo lograron detectarse en *P. stylirostris* y *P. californiensis*, esta actividad ha sido detectada por Vega-Villasante *et al.*, 1995, para *P. californiensis*, del cual existen pocos estudio y para *P. stylirostris* también se ha reportado esta actividad por Galgani (1988), además estas actividades están presentes en *P. monodon*, *P. japonicus*, *P. penicilatus*, *Metapenaeus monoceros* y *M. rosebergii*, según lo citado por Tsai *et al.* (1986). La carboxipeptidasa B fue ligeramente mayor para *P. stylirostris* aunque muy parecidas en general. Para procesar los resultados de carboxipeptidasa B no fue necesario someterlo a un análisis estadístico, dado que no existía desviación estándar entre los resultados de actividad obtenidos de los ensayos.

V.6 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD TRIPSINA

Las valores de las actividades específicas de tripsina a 40°C fueron: *P. stylirostris* 0.487 ± 0.04 UA, *P. californiensis* 0.771 ± 0.029 UA, *P. clarkii* 0.008 ± 0.0001 UA y *C.*

quadricarinatus 0.008 ± 0.0003 UA. Estos resultados se obtuvieron con base a las pendientes obtenidas en las curvas de actividad, figuras 19, 20, 21 y 22.

Los resultados de la ANOVA simple, indicaron una diferencia significativa entre los grupos, donde *P. stylirostris* y *P. californiensis* presentan mayor actividad que *P. clarkii* y *C. quadricarinatus*. La prueba a posteriori Duncan dio como resultado que solo las especies de acociles no son estadísticamente diferentes ($p = 0.05$).

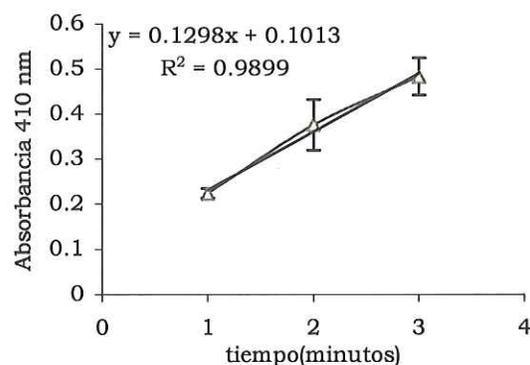


Fig. 19 . Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 40°C de extractos de *P. stylirostris*, con desviación estándar $p = 0.05$

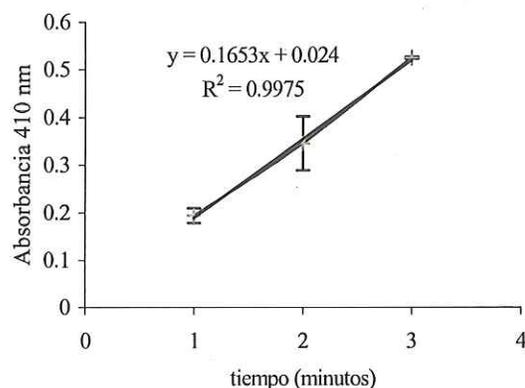


Fig. 20 . Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 40°C de extractos de *P. californiensis*, con desviación estándar $p = 0.05$

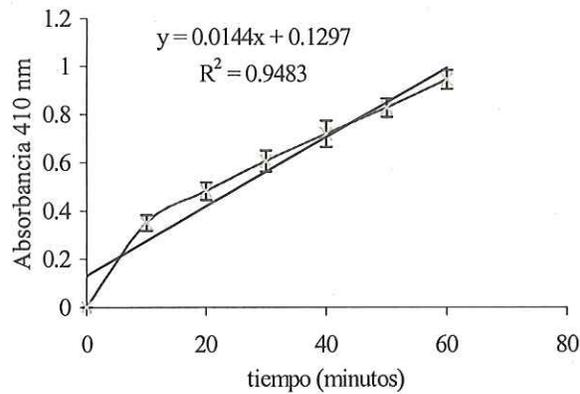


Fig. 21 Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 40°C de extractos de *P. clarkii*, con desviación estándar $p = 0.05$

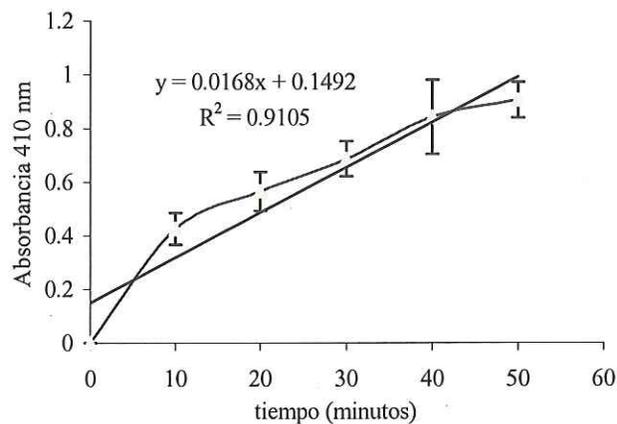


Fig. 22 Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 40°C de extractos de *C. quadricarinatus*, con desviación estándar $p = 0.05$

Las valores de actividades de tripsina a 50 °C fueron: *P. stylirostris* 0.724 ± 0.025 UA, *P. californiensis* 0.824 ± 0.08 UA, *P. clarkii* 0.031 ± 0.0008 UA y *C. quadricarinatus* 0.014 ± 0.001 UA. Estos resultados se obtuvieron con base a las pendientes obtenidas, figuras 23, 24, 25 y 26.

Los resultados obtenidos de la ANOVA, mostraron diferencias entre las medias de los grupos y con el análisis a posteriori Duncan se evidenció que solo los acociles eran estadísticamente similares.

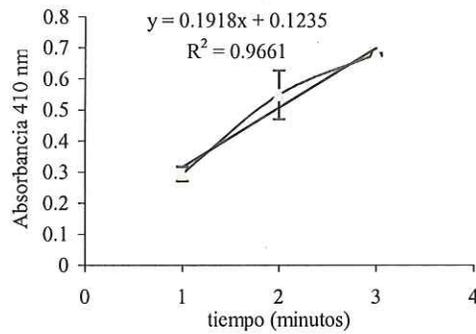


Fig.23 . Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 50°C de extractos de *P. stylirostris*, con desviación estándar $p = 0.05$

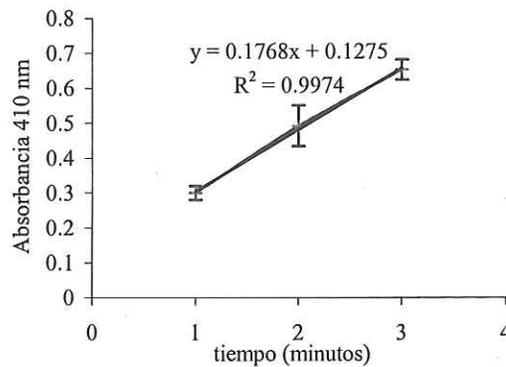


Fig.24 . Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 50°C de extractos de *P. californiensis*, con desviación estándar $p = 0.05$

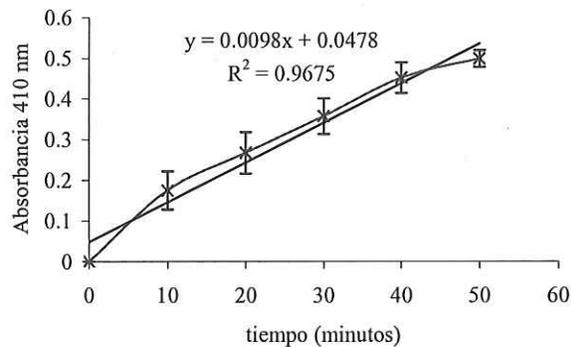


Fig.25 . Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 50°C de extractos de *P. clarkii*, con desviación estándar $p = 0.05$

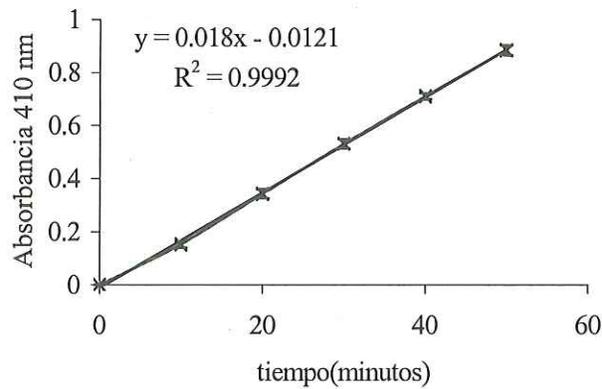


Fig.26 . Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 50°C de extractos de *C. quadricarinatus*, con desviación estándar $p = 0.05$

Los valores de actividades de tripsina a 60 °C fueron: *P. stylirostris* 0.258 ± 0.06 UA, *P. californiensis* 0.481 ± 0.078 UA, *P. clarkii* 0.025 ± 0.0006 UA y *C. quadricarinatus* 0.011 ± 0.0001 UA. Estos resultados se obtuvieron con base a las pendientes obtenidas, figuras 27, 28, 29 y 30.

De igual manera los resultados se procesaron estadísticamente resultando similares únicamente las actividades de las dos especies de acociles.

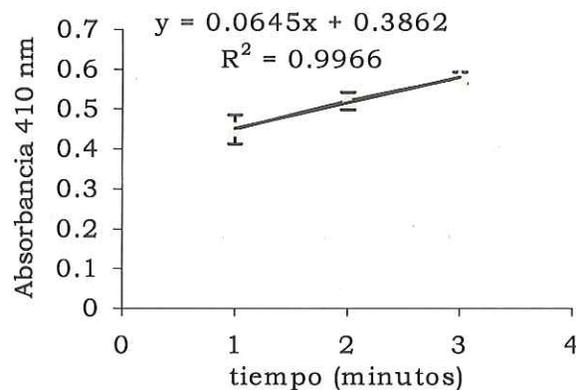


Fig.27 . Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 60°C de extractos de *P. stylirostris*, con desviación estándar $p = 0.05$

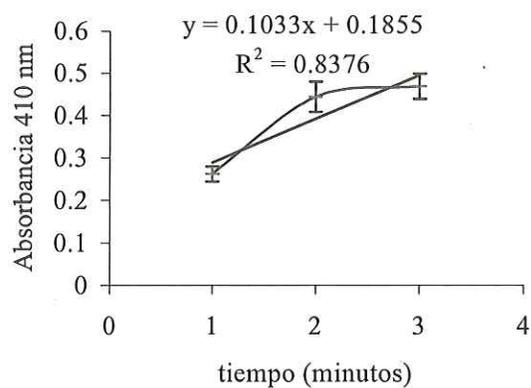


Fig.28 Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 60°C de extractos de *P. californiensis*, con desviación estándar $p = 0.05$

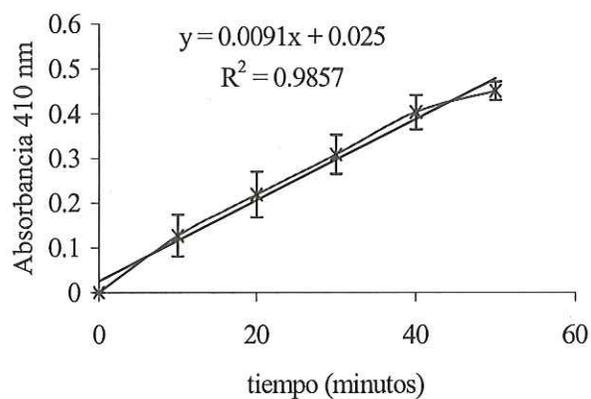


Fig.29 Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 60°C de extractos de *P. clarkii*, con desviación estándar $p = 0.05$

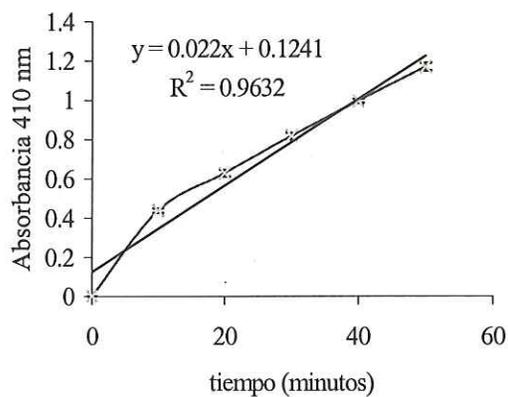


Fig.30 . Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 60°C de extractos de *C. quadricarinatus*, con desviación estándar $p = 0.05$

Las valores de actividades de tripsina a 70°C fueron: *P. stylirostris* 0.042 ± 0.04 UA, *P. californiensis* 0.02 ± 0.004 UA, *P. clarkii* 0.001 ± 0.0002 UA y *C. quadricarinatus* $0.0001 \pm 6.9e-05$ UA. Estos resultados se obtuvieron con base a las pendientes obtenidas en las evaluaciones, figuras 31, 32, 33 y 34.

A esta temperatura los valores de actividad tripsina decayeron y al ser evaluados estadísticamente *P. stylirostris* fue similar a *P. californiensis*, sin embargo no existe diferencia entre este último y las dos especies de agua dulce.

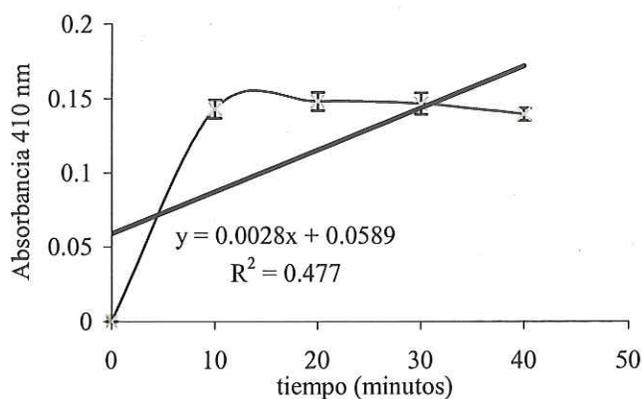


Fig.31 . Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 70°C de extractos de *P. stylirostris*, con desviación estándar $p = 0.05$

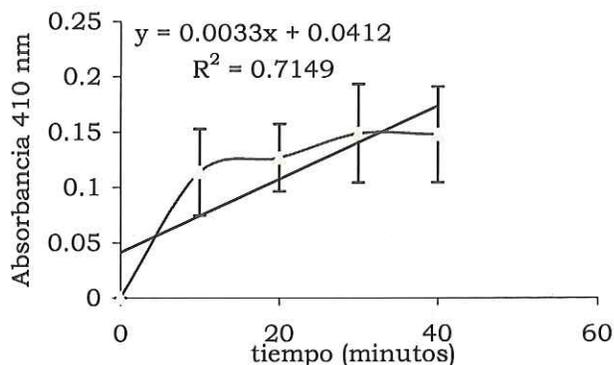


Fig.32 . Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 70°C de extractos de *P. californiensis*, con desviación estándar $p = 0.05$

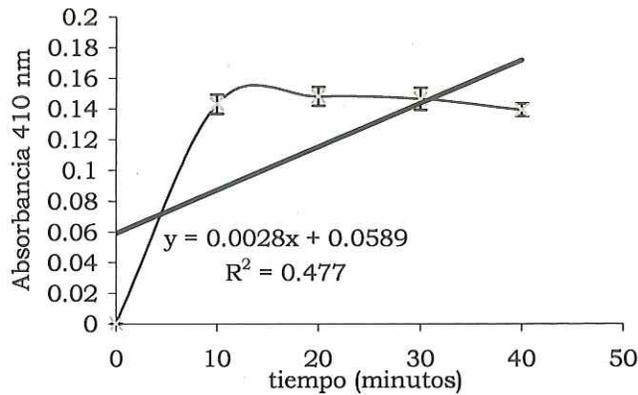


Fig.33 Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 70°C de extractos de *P. clarkii*, con desviación estándar $p = 0.05$

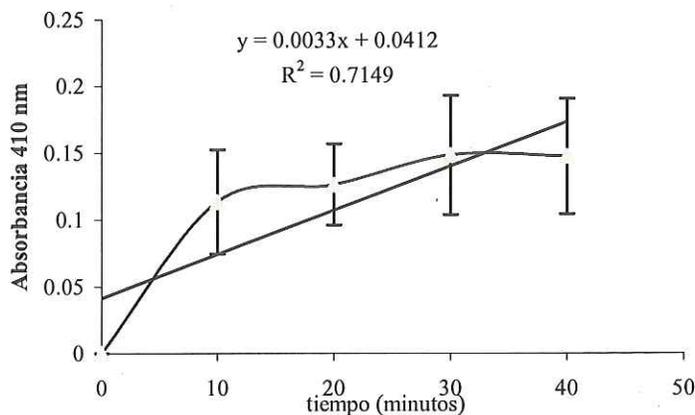


Fig.34 . Cambio de absorbancia para la actividad tripsina a 70°C de extractos de *C. quadricarinatus*, con desviación estándar $p = 0.05$

En general se observa que para las cuatro especies las mayores actividades se registraron a los 50°C (figuras 35 y 36) en las distintas evaluaciones de actividad tripsina; además se destaca que los mayores valores de actividad fueron para las especies de camarón, siendo en particular *P. californiensis* la más alta en todos los casos.

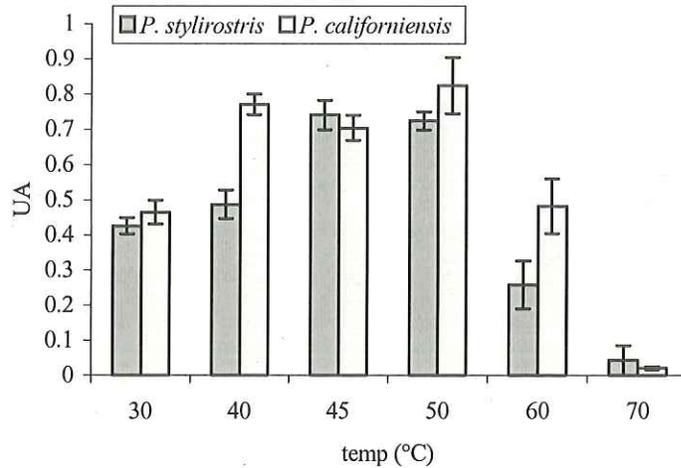


Fig.35. Actividades específicas de tripsina de *P. stylirostris* y *P. californiensis*, evaluadas a diferentes temperaturas, con desviación estándar $p = 0.05$

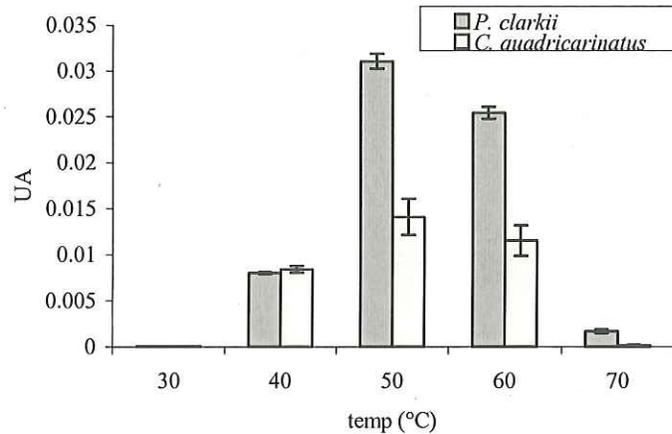


Fig.36. Actividades específicas de tripsina de *P. clarkii* y *C. quadricarinatus*, evaluadas a diferentes temperaturas, con desviación estándar $p = 0.05$

Las tablas III y IV, resumen los valores obtenidos de la actividad tripsina para las cuatro especies en extractos crudos a diferentes temperaturas. En las cuatro especies las mayores actividades se obtienen a los 50°C.

Tabla III. Resumen de los valores obtenidos de las evaluaciones de tripsina en los extractos de camarones a diferentes temperaturas.

Temp(°C)	<i>P. stylirostris</i>	Desv STD	<i>P. californiensis</i>	Desv STD
30	0.425	0.024	0.465	0.034
40	0.487	0.041	0.770	0.029
45	0.741	0.042	0.704	0.035
50	0.724	0.025	0.824	0.080
60	0.258	0.068	0.481	0.078
70	0.043	0.043	0.021	0.004

Tabla IV. Resumen de los valores obtenidos de las evaluaciones de tripsina en los extractos de acociles a diferentes temperaturas.

Temp	<i>P. clarkii</i>	Desv STD	<i>C. quadricarinatus</i>	Desv
30	6.25×10^{-5}	0	5.51×10^{-5}	0
40	0.008	0.0001	0.0084	0.0003
50	0.0310	0.0008	0.0141	0.002
60	0.0254	0.0006	0.0115	0.0017
70	0.0017	0.0002	0.0001	6.94×10^{-5}

El máximo valor de actividad a los 50°C encontrado en este estudio, coincide con el máximo de actividad proteolítica de los extractos y con lo reportado por Vega-Villasante *et al.*, 1995. Este dato de temperatura es un parámetro operacional más que una característica fisiológica de la enzima, resultante de dos procesos: por un lado, el aumento de actividad por temperatura, y por otro, la pérdida de actividad por desnaturalización térmica. En general en las evaluaciones a diferentes temperaturas, se obtuvieron los valores más altos para *P. californiensis* seguidos por *P. stylirostris* (figura 32), y estadísticamente las dos especies de acociles fueron similares con valores de actividad mucho más bajos; aunque en los casos de 50 y 60°C los valores de actividad para *P. clarkii* fueron significativamente mayores comparados con los resultados de *C. quadricarinatus* (figura 33).

V.7 β -GLUCOSIDASA.

Las valores de actividades de β -Glucosidasa fueron: *P. stylirostris* 0.007 ± 0.0001 UA *P. californiensis* 0.012 ± 0.0001 UA, *P. clarkii* $0.0007 \pm 2.84e-5$ UA y *C. quadricarinatus* $0.001 \pm 5.97e-05$ UA. Estos resultados se obtuvieron con base a las pendientes, de tiempo contra absorbancia, obtenidas en las evaluaciones, figuras 37, 38, 39 y 40. Los resultados estadísticos mostraron diferencia entre todos los cuatro decápodos estudiados.

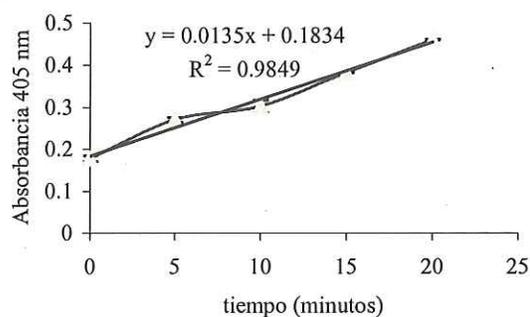


Fig. 37 Cambio de absorbancia para la actividad β -Glucosidasa de extractos de *P. stylirostris*, con desviación estándar $p = 0.05$

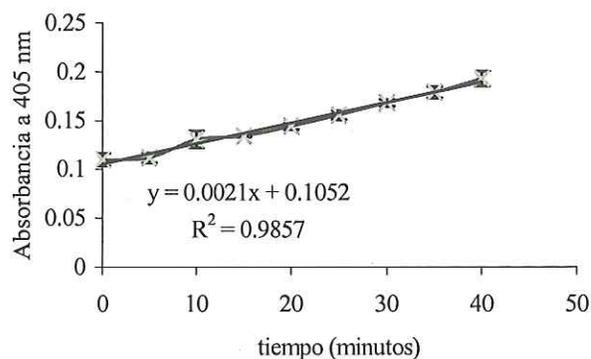


Fig. 38 Cambio de absorbancia para la actividad β -Glucosidasa de extractos de *P. californiensis*, con desviación estándar $p = 0.05$

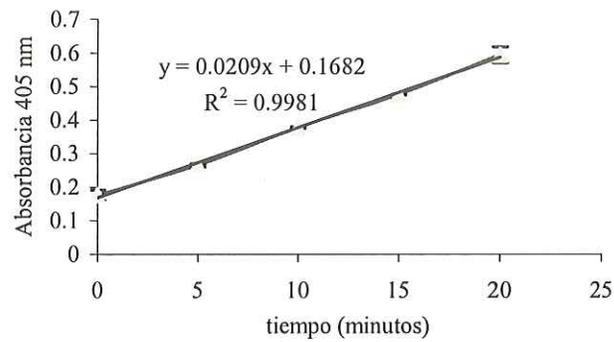


Fig. 39. Cambio de absorbancia para la actividad β -Glucosidasa de extractos de *P. clarkii*, con desviación estándar $p = 0.05$

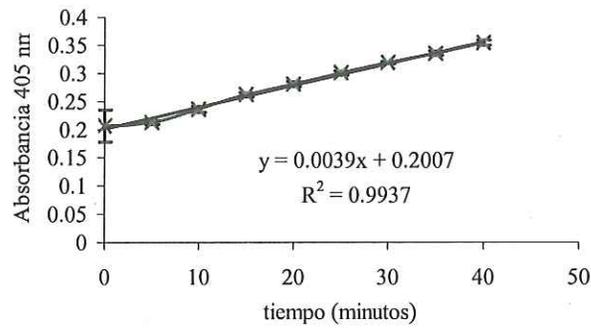


Fig. 40. Cambio de absorbancia para la actividad β -Glucosidasa de extractos de *C. quadricarinatus*, con desviación estándar $p = 0.05$

En las figuras 41 y 42 se observan las actividades específicas de β -Glucosidasa en los camarones y en acociles respectivamente.

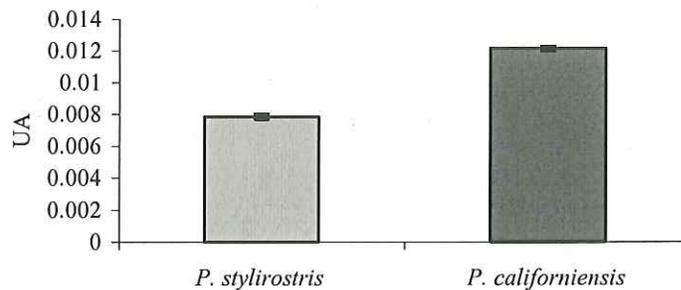


Fig. 41. Actividad β -Glucosidasa para extractos de *P. stylirostris* y *P. californiensis*.

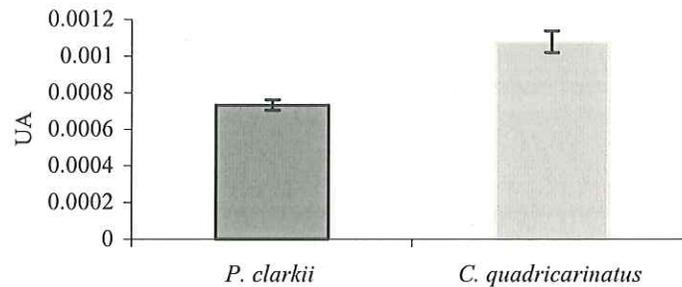


Fig. 42. Actividad β -Glucosidasa para extractos de *P. clarkii* y *C. quadricarinatus*.

Comúnmente se ha sugerido que la fuente principal de energía en los crustáceos son las proteínas, pero existen estudios que reportan incrementos en la conversión alimentaria, el crecimiento y la sobrevivencia de *P. indicus*, cuando se utilizó una mayor cantidad de carbohidratos en la dieta (Omodoni y Starks, 1996). Por esta razón es importante hacer evaluaciones de actividad carbohidrolasa y para este estudio se midió β -glucosidasa, que participa en la degradación de polisacáridos (Vg. sucrasa y lactasa), los cuales son constituyentes comunes de algas marinas.

En las evaluaciones para medir la actividad β -glucosidasa fue posible detectarla para el caso de los cuatro extractos de los decápodos estudiados, presentando *P. californiensis* la actividad más alta, seguido por *P. stylirostris*, *C. quadricarinatus* y la más baja, se detectó en *P. clarkii*. Aún cuando los valores para esta actividad fueron en general bajos comparados con los reportados por McClintonk en 1991 para el cangrejo *Callinectes sapidus*. Pero los resultados son importantes por que dan pie a futuros estudios especializados hacia enzimas degradadoras de carbohidratos en especies de decápodos, ya que, en este rubro se encuentra un potencial y fuerte herramienta para hacer sustituciones de constituyentes dietéticos por otros de menor costo.

Tabla V. Resumen de los valores obtenidos de las evaluaciones enzimáticas realizadas a los extractos crudos de las cuatro especies de decápodos.

Actividad	<i>P. stylirostris</i>	<i>P. californiensis</i>	<i>P. Clarkii</i>	<i>C. quadricarinatus</i>
Proteolítica total	2.078±0.014	0.987±0.01129	1.005±0.07	0.387±0.85
Tripsina	0.425±0.023	0.464±0.033	6.25e-5±5.51e-5	5.5137e-5
Quimiotripsina	0.5187±0.0005	0.5909±0.0036	0.0006±0.0004	0.00071
Carboxipeptidasa A	0.018 ± 0.002	0.016 ± .0028	ND	ND
Carboxipeptidasa B	0.045	0.050	ND	ND
β-Glucosidasa	0.007±0.0001	0.012±0.0001	0.0007±2.84e-5	0.001 ± 5.97e-5

ND: No detectada bajo nuestras condiciones de ensayo

V.8 CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS LIOFILIZADOS

V.8.1 Actividad proteolítica total

Se midió la actividad proteolítica total de los cuatro diferentes extractos detectando un incremento en estas actividades de los camarones con respecto a las evaluaciones de actividad proteolítica total realizadas con los extractos crudos mientras que las actividades de los acociles disminuyeron.

Los resultados de actividad proteolítica (figura 43) muestran diferencias significativas entre *P. stylirostris* y *P. californiensis*, así mismo, estos fueron diferentes a las dos especies de acociles, las cuales fueron estadísticamente similares entre sí.

Con base a los resultados obtenidos de la actividad proteolítica total de los extractos crudos, podemos observar que *P. stylirostris* es el que presenta mayor actividad seguido por *P. californiensis* y *P. clarkii*, siendo inferior el resultado de *C. quadricarinatus* (figura 1). Cabe mencionar que los resultados obtenidos con los extractos liofilizados (figura 43) difieren un poco; en este caso, claramente se observan dos agrupaciones entre los camarones y los acociles por separado, presentado mayor actividad proteolítica total los primeros y en particular *P. stylirostris* muestra la mayor actividad. Lo anterior puede

deberse a que en el proceso de liofilización se eliminaron algunas interferencias, que modificaban dicha actividad; quedando entonces más homogéneos los valores. El hecho de encontrar diferencias de actividad proteolítica total entre grupos nos sugiere que la actividad enzimática digestiva es diferente. La diferencia de actividad puede ser el resultado de varios factores: la edad de organismos, los regímenes dietéticos y las diferencias especie-específicas.

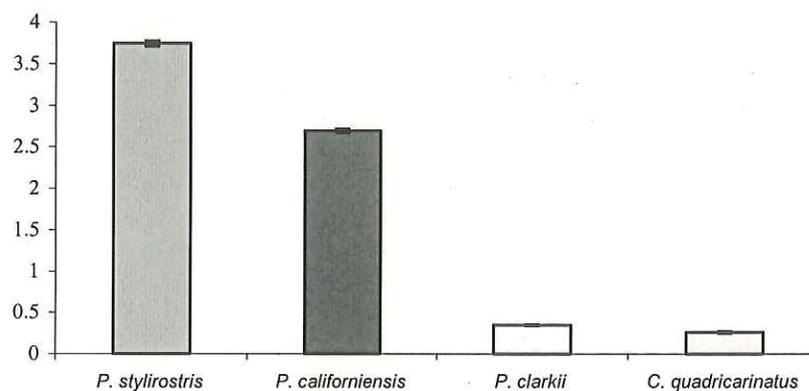


Fig. 43 Actividad proteolítica total en extractos liofilizados de *P. stylirostris*, *P. californiensis*, *P. clarkii*, *C. quadricarinatus*, con una desviación estándar de $p = 0.05$

V.8.2 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA TOTAL DE EXTRACTOS DE HEPATOPÁNCREAS LIOFILIZADOS

Se muestra en las figuras 44 y 45, que las mayores actividades para los cuatro diferentes extractos de estos decápodos se presentaron a los 50°C, así también puede observarse que a partir de los 60°C la actividad comienza a bajar y a los 70°C prácticamente no hay actividad. Esta respuesta es igual a la encontrada en un ensayo similar para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad de la tripsina en las cuatro especies.

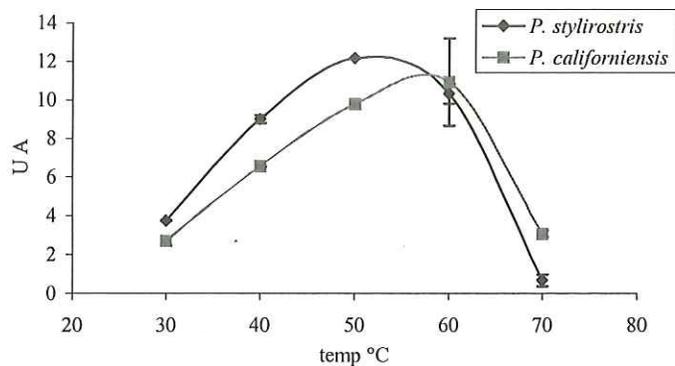


Fig.44. Actividad proteolítica total de extractos liofilizados de *P. stylirostris* y *P. californiensis*, evaluados a diferentes temperaturas, con desviación estándar $p = 0.05$

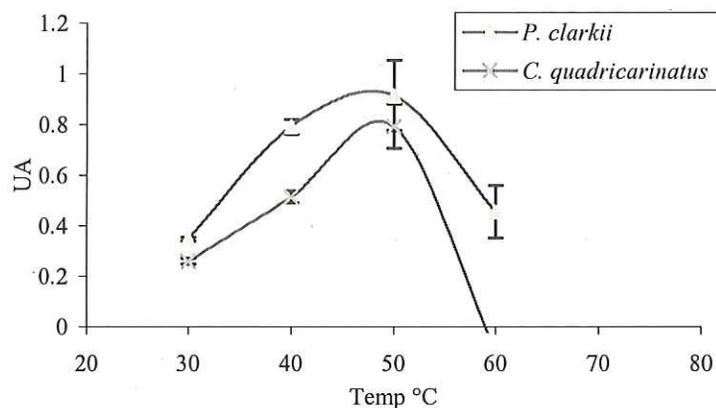


Fig.45 Actividad proteolítica total de extractos liofilizados de *P. clarkii* y *C. quadricarinatus*, evaluados a diferentes temperaturas, con desviación estándar $p = 0.05$

Los estudios de caracterización de las distintas enzimas implicadas en los procesos digestivos son fundamentales para el entendimiento del metabolismo digestivo de los nutrientes. En este caso, se realizaron ensayos para la caracterización de la actividad proteolítica total de los extractos liofilizados. Como resultado de las evaluaciones a diferentes temperaturas variando desde 30 hasta 70°C (figuras 44 y 45). Los registros de mayor actividad para las especies de *P. stylirostris*, *P. clarkii* y *C. quadricarinatus* se encontraron alrededor de 50°C, seguido por una inactivación de la enzima a temperaturas mayores, reduciendo su actividad, lo cual coincide con datos reportados para *P. californiensis* por Vega-Villasante *et al.* en 1995, mismo que compara con *P. kerathurus* y

Homarus americanus; es importante mencionar que en este trabajo los resultados obtenidos para *P. californiensis*, de extractos crudos, muestran la mayor actividad a los 60°C, comparable con los reportes de *Panulirus japonicus* y *Penaeus monodon* citados también por Vega-Villasante *et al.* en 1995. Esta diferencia en actividad máxima sugiere hacer más estudios al respecto para refutar resultados, ya que en los resultados obtenidos en este trabajo se utilizó extractos liofilizados.

V.8.3 EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE EXTRACTOS DE HEPATOPÁNCREAS LIOFILIZADO

En general, para los extractos de *P. stylirostris*, *P. californiensis*, *P. clarkii* y *C. qudricarinatus*, los datos obtenidos muestran un máximo valor resultante de actividad proteolítica cuando fueron evaluados a valores de pH 7-7.5 como se muestran en las figuras 46 y 47.

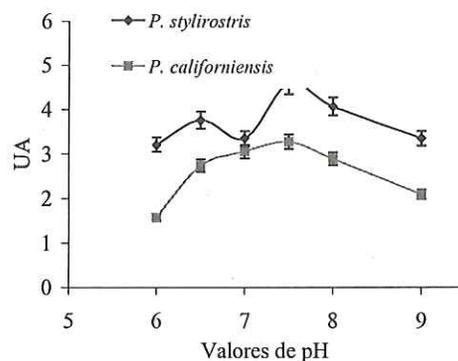


Fig. 46 Actividad proteolítica total de extractos liofilizados de *P. stylirostris* y *P. californiensis*, evaluados a diferentes valores de pH, con desviación estándar $p = 0.05$

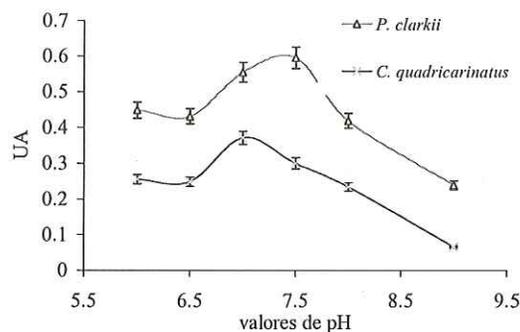


Fig. 47 Actividad proteolítica total de extractos liofilizados de *P. clarkii* y *C. quadricarinatus*, evaluados a diferentes temperaturas, con desviación estándar $p=0.05$

Otra parte importante en la caracterización enzimática es el efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de la enzima. Los resultados mostraron que la actividad mayor en los camarones se presentó entre un pH de 7.5 - 8, lo que coincide con lo reportado anteriormente, en evaluaciones enzimáticas, para varias especies de peneidos (Galgani, 1988; Hernández-Cortés *et al.*, 1999). En el caso de *P. clarkii* y *C. quadricarinatus*, la tendencia fue hacia valores de 7, similar a lo reportado por García-Carreño *et al.* en 1994 para *Pleuroncodes planipes* y *Pacifastacus astacus*.

V.8.4 ESTABILIDAD A LA TEMPERATURA DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA TOTAL DE EXTRACTOS LIOFILIZADOS.

En general los extractos de *P. stylirostris*, *P. californiensis*, presentaron tendencias similares en respuesta a la temperatura. Los resultados de estabilidad térmica mostraron que para 50, 60 y 70°C (figuras 48c, 48d y 48e) de incubación después de los 10 minutos la actividad bajo considerablemente. Para el caso de la incubación a 40°C (figura No.48b) se detectó actividad después de 90 minutos. Por otra parte, después de ser incubados los extractos por 2.5 horas a 30°C (figura 48a), presentaron actividad proteolítica total.

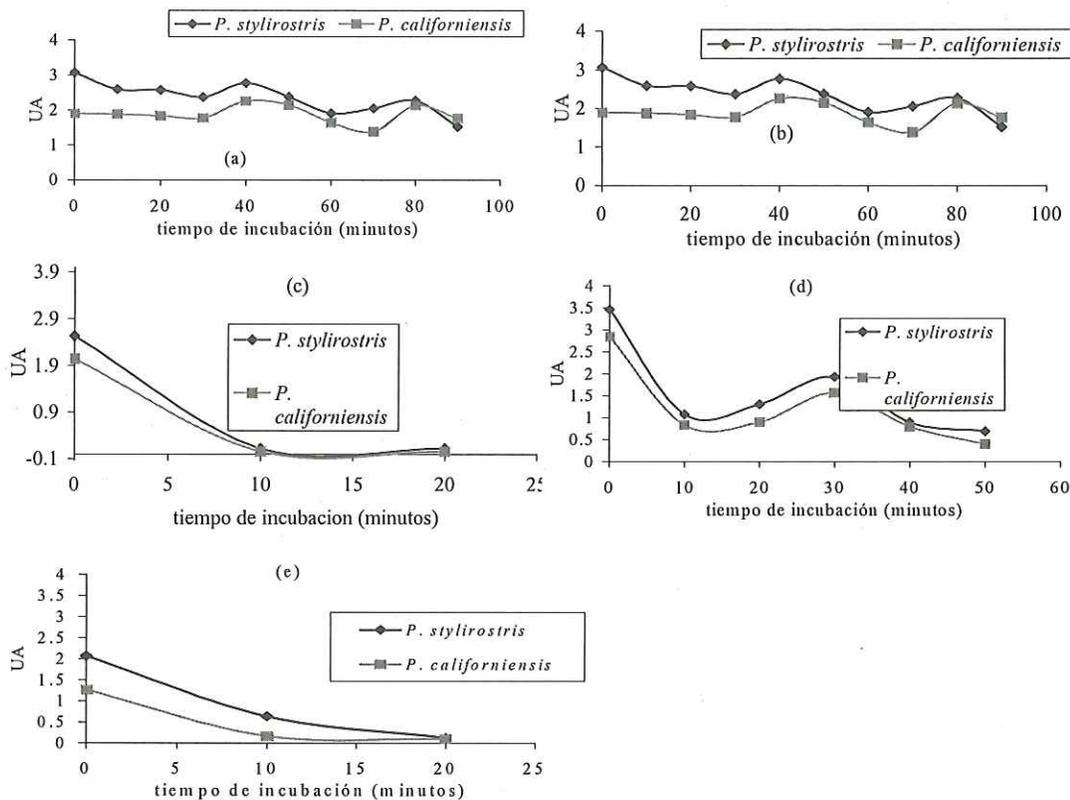


Fig. 48 Estabilidad térmica de extractos de *P. stylirostris* y *P. californiensis*: (e) incubado a 70 °C, (d) incubado a 60 °C, (c) incubado a 50 °C, (b) incubado a 40 °C y (a) incubado a 30 °C.

Para el caso de estabilidad térmica de los extractos de acociles, se observan los resultados de los incubados a 70 y 60°C (figuras 49e y 49d, respectivamente; En estas los valores de actividad proteolítica tienden a bajar conforme mayor es el tiempo de incubación. Para el caso de los 50°C de incubación (figura 49c), la actividad proteolítica total, presenta una tendencia a disminuir de manera gradual. Cuando los extractos de estas especies se incubaron a 40°C (figura 49b) por 1.5 horas presentaron actividad y a 30°C (figura 49a) la actividad proteolítica aún estaba presente

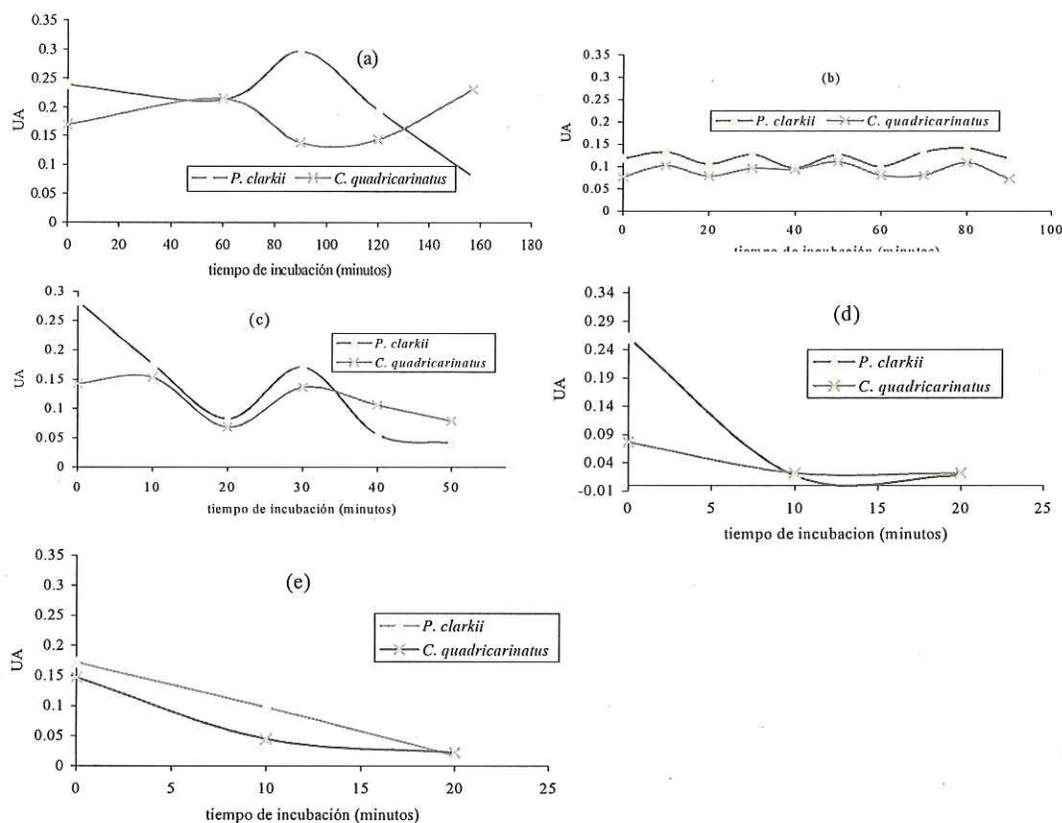


Fig. 49 Estabilidad térmica de los extractos de *P. clarkii* y *C. quadricarinatus*: (e) incubado a 70°C, (d) incubado a 60°C, (c) incubado a 50°C, (b) incubado a 40°C y (a) incubado a 30°C.

Con respecto a la estabilidad térmica se realizaron ensayos de actividad proteolítica total incubadas a diferentes temperaturas (30-70°C), con el fin de encontrar el óptimo al cual la enzima muestra un valor constante de actividad a lo largo de un tiempo determinado.

En este trabajo, los resultados para los extractos de las cuatro especies mostraron una rápida desnaturalización a temperaturas superiores a 50°C, coincidiendo con reportes de Tsai *et al.*, 1986 para extractos de *P. monodon*, y a los 40 y 30°C los extractos permanecieron estables, lo que nos indica que a estas temperaturas la actividad en estos decápodos es estable.

V.8.5 ESTABILIDAD AL pH DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA TOTAL DE EXTRACTOS LIOFILIZADOS.

Después de incubar los extractos por 40 minutos a diferentes valores de pH, la actividad proteolítica total se determinó a 30 °C por 10 min (figura 50). Se observó que los extractos de las cuatro especies fueron resistentes a los diferentes valores de pH; lo que nos indica que la actividad a pH menor de 7.0 y mayor que 7.5 puede haber modificado la carga de las enzimas sin embargo, este cambio es reversible.

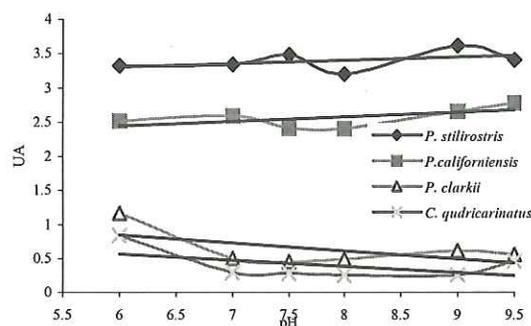


Fig.- 50. Estabilidad al pH de los extractos de *P. stylirostris*, *P. californiensis*, *P. clarkii* y *C. quadricarinatus*.

Los resultados obtenidos al evaluar la actividad proteolítica, después de incubar los extractos por 40 minutos a distintos valores de pH, (6, 6.5, 7, 7.5, 8, 9, 9.5), reflejaron que aparentemente, la enzima no es alterada, al menos en ese tiempo de incubación y en este intervalo de pH, estos resultados pueden compararse con los obtenidos por Tsai *et al.* en 1986, en el cual utilizó como parámetro la actividad de quimiotripsina después de ser incubado el extracto en un rango de 6-8 valores de pH. Para verificar que las pendientes no fueran diferentes a cero se utilizó el programa Prism Versión 3.0 y los resultados se muestran en el anexo II.

V.9 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO.

Se realizaron mediciones de proteína y actividad proteolítica (tablaVI) antes de analizar los extractos en los geles de poliacrilamida. En la figura 51, se pueden observar las bandas de las distintas proteínas en los extractos liofilizados de *P. stylirostris* (PS), *P. californiensis* (PC), con bandas a 25 kDa para PS y 27 kDa para PC y para ambos casos una banda a los 13 kDa; PS presenta una banda marcada a los 66kDa la cual está ausente en PC. Las bandas para *P. Clarkii* (PrC) se detectaron a 22, 28 y 66 kDa similar a la obtenida por PS y *C. quadricarinatus* (CQ) mostró bandas más marcadas en 22, 28, 34-36 y 66 kDa.

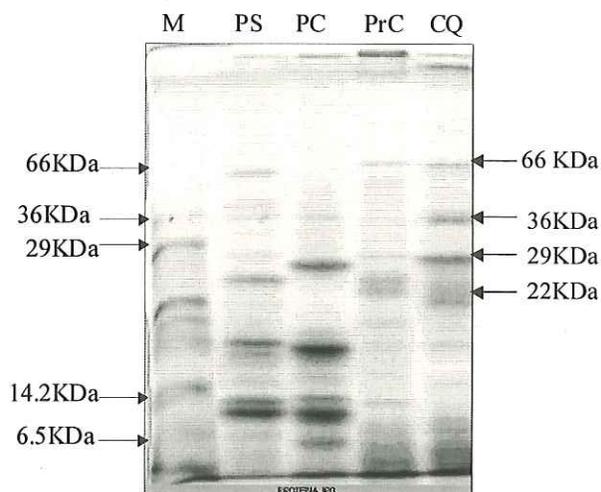


Fig. 51 Gel SDS-PAGE (80x100x0.75mm), de extractos liofilizados de *P. stylirostris* (PS), *P. californiensis* (PC), *P. clarkii* (PrC), *C. quadricarinatus* (CQ) y el marcador de peso molecular (M).

Tabla.VI Actividad proteolítica total con 3 μ L de los extractos liofilizados.

Especie	mg/ μ l de proteína	Unidad de actividad
<i>P. stylirostris</i>	2.286	0.821
<i>P. californiensis</i>	2.635	0.5914
<i>P. clarkii</i>	3.211	0.1741
<i>C. quadricarinatus</i>	3.125	0.1102

La caracterización de las fracciones protéicas en gel para conocer los pesos moleculares se realizaron con base a la relación obtenida entre la migración relativa del marcador y su peso molecular (Tabla II); la correlación se muestran en la figura 52.

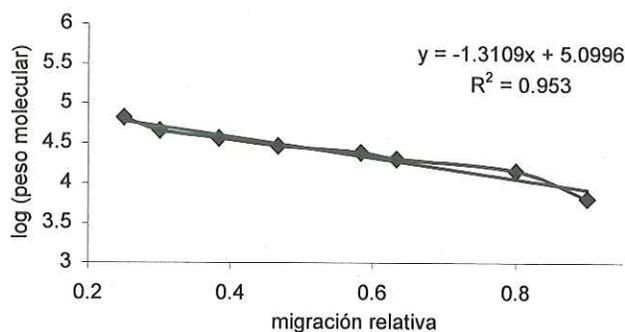


Fig. 52 Correlación obtenida entre la migración relativa de los marcadores de peso molecular y el logaritmo de este.

Posteriormente se obtuvieron resultados de los zimogramas cargados con 5 mU de actividad (figura 53 a), y 7 y 10 mU de actividad (figura 53b)

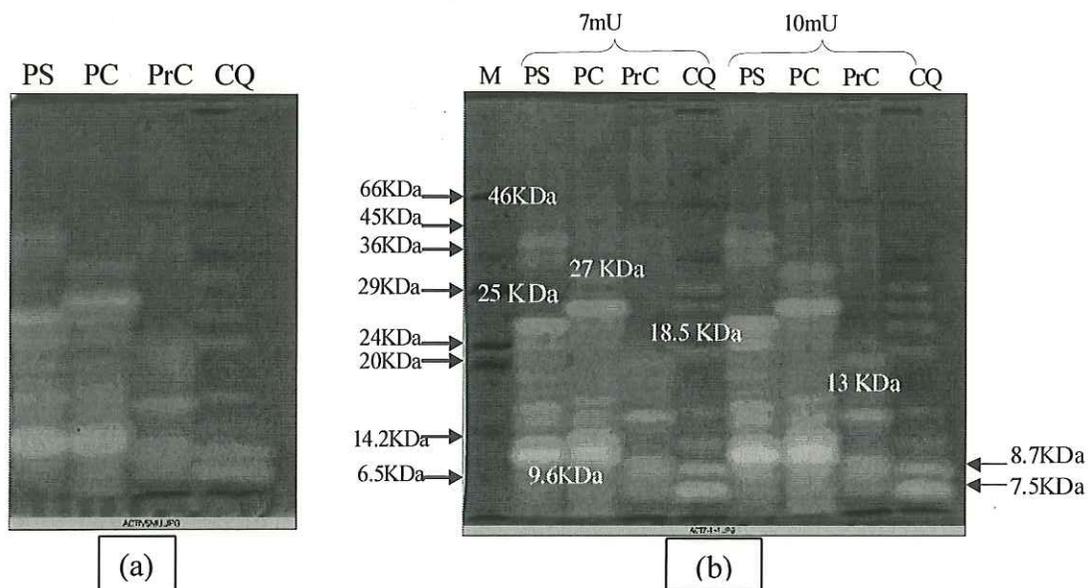


Fig. 53 Zimogramas cargados con 5 mU (a) y cargados con 7 y 10 mU (b) de los extractos liofilizados de *P. stylirostris* (PS), *P. californiensis* (PC), *P. clarkii* (PrC) y *C. quadricarinatus* (CQ).

Como parte de la caracterización enzimática, se decidió utilizar la electroforesis en geles de poliacrilamida, ya que es una fuerte herramienta bioquímica utilizada para analizar la heterogeneidad y peso molecular de las proteínas. Para el estudio se utilizó un gel separador a 12%, ya que en él pueden revelarse las proteínas más comunes, involucradas en los procesos digestivos de los crustáceos. Los parámetros empleados para la caracterización de las fracciones protéicas en los geles, se presenta en el anexo. En general, se encontraron varias bandas entre el intervalo de 6 a 66 kDa para todos los extractos (figura 51), además de presentarse unas bandas de mayor peso molecular que, por sus características no lograron migrar a través del gel. Además no se observaron diferencias entre el grupo de camarones y de los acociles.

Aún cuando se evidenciaron algunas proteínas en los extractos es necesario detectar las bandas con mayor actividad proteásica, por lo que se corrieron los geles cargados con 5, 7 y 10 mU de actividad (Figuras 52 y 53) para cada uno de los extractos. En *P. stylirostris* se detectaron tres bandas 46, 25 y una en 9-10 kDa, en *P. californiensis* se detectaron una 27 y otra entre 9-10 kDa, así mismo, presentaron pequeñas bandas de actividad entre medio de los rangos mencionados y para el caso de los acociles, para PrC se obtuvieron bandas de 7, 8, 15 y 20 kDa, mientras que para CQ se presentaron dos bandas muy claras los 7.5 y 8.7 kDa.

En esta parte, cabe mencionar que, los resultados de la electroforesis obtenidos con los extractos de los acociles, existen bandas de proteína pero al medirles la actividad no se detectan en los zimogramas, posiblemente existen inhibidores en la dieta, de las enzimas alrededor de 25 kDa, las bandas no presentes en los zimogramas pudieran ser de tipo

tripsina o quimiotripsina, razón por la cual la actividad proteolítica total en estos, inferior con respecto a los camarones.

Es importante destacar que Cruz en 1998, reporta la existencia de una proteasa de bajo peso molecular, alrededor de 11 kDa, que parece existir solamente en los decápodos y tiene un papel similar al de la tripsina; y precisamente en los resultados obtenidos de las cuatro especies se detecta una banda de actividad alrededor de ese valor, por lo que podemos suponer la presencia de una enzima con características similares. Además, las bandas alrededor de 25 kDa han sido descritas por Ezquerro *et al.*, 1997, como tripsina y quimiotripsina; la intensidad de estas bandas para los camarones concuerdan con los altos valores de actividad obtenidos para estas enzimas.

Con el objetivo de buscar mayor claridad en las bandas, se realizaron zimogramas cargados con 7 y 10 mU de actividad (figura 53b). Las principales bandas con actividad en las dos especies *P. stylirostris* y *P. californiensis* se encuentran entre los 29 y 7 kDa, además se observa que para las dos especies de camarones se encontraron unas bandas alrededor de los 35 kDa, encontrando ligeras diferencias entre las actividades de estos peneidos. Para el caso de los acociles (*P. clarkii* y *C. quadricarinatus*), las bandas con mayor actividad se encontraron a pesos moleculares menores, entre 6 y 15 kDa.

VI. CONCLUSIONES

- Existen diferencias significativas de la actividad proteolítica total entre *P. californiensis* y *P. stylirostris*.
- Los resultados de actividad de tripsina y de carboxipeptidasa A, obtenidos para *P. stylirostris* y *P. californiensis* no fueron estadísticamente similares.
- Las actividad quimiotripsina, carboxipetidasa B así como la β -glucosidasa fueron mayor para *P. californiensis* que para *P. stylirostris*.
- La similitud de las características enzimáticas entre *P. stylirostris* y *P. californiensis* sugiere la potencial utilización de dietas parecidas en el cultivo comercial de *P. californiensis*. utilizando este criterio.
- La actividad de la tripsina fue mayor en los extractos de *P. clarkii* comparado con los resultados obtenidos para *C. quadricarinatus*.
- No existe diferencia en la actividad quimiotripsina evaluada entre los acociles.
- No se logró detectar la actividad de carboxipeptidasa A y B, bajo las condiciones de reacción utilizadas en este estudio

- La actividad β -glucosidasa fue mayor para *C. quadricarinatus* comparado con la obtenida para *P. clarkii*.
- Se logró confirmar la actividad de la quimiotripsina en los extractos de las cuatro especies, (los valores más altos fueron obtenidas en las evaluaciones de camarones) utilizando el sustrato específico SAAPNA.
- Los resultados del análisis electroforético sugieren que entre los peneidos las características proteolíticas son más cercanas en comparación con la de los acociles, mismos que mostraron características cercanas entre ellos

VII. PERSPECTIVAS

- Se requieren estudios más específicos sobre las diferentes enzimas, así como la relación intra e interespecie (inhibidores, purificación de enzimas, secuenciación de proteínas y determinación de otras actividades)
- Buscar relaciones filogenéticas del proceso digestivo inter especie.
- Investigar las posibles relaciones metabólicas entre las enzimas involucradas en el proceso digestivo.

LITERATURA CITADA

- Biesiot P. M. y J. McDowell C. (1990). Digestive protease, lipase y amylase activities in stage I larvae of the american lobster, *Homarus americanus*. Comp. Biochem. Physiol, 95 A(1) 47-54.
- Bradford, M. A. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. Anal. Biochem. 72,282-254.
- Ceccaldi H. J. (1998). A synopsis of the morfology and physiology of the digestive system of some crustacean species studied in France. Reviews in Fishery Science 6(1 y 2):13-39.
- Cousin M., G. Cuzon, J. Guillaume, AQUACOP (1996). Digestibility of starch in *Penaeus vannamei*: *in vivo* and *in vitro* study on eight samples of various origen. Aquaculture (140): 361-372.
- Cruz S. L. E., (1998). Digestión en camarón y su relación con formulación y fabricación de alimentos balanceados; Curso internacional sobre alimentación de camarón, 18-19 de marzo de 1998, Mazatlán, Sinaloa.
- Ezquerria J. M. y F. L. García-Carreño. (1997); Effect of feed diets on digestive proteases from the hepatopancreas of white shrimp (*Penaeus vannamei*). Journal of Food Biochemistry 21: 401-419.
- Ezquerria J. M. , F. L. García-Carreño, R. Civera, N. F. Haard, (1997). PH-Stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture 157:251-261.

- Fernández I. , M. O. , O. Carrillo y A. V. Wormhoudt (1997). Digestive enzyme activities of *Penaeus notalis* during reproduction and moulting cycle. *Comp. Biochem. Physiol* 118A(4): 1267-1271.
- Galgani F. (1988). Etude Comparative des Protéases Digestives de cinq Espèces de Crevettes Pénéides. *Biochemical systematics and Ecology* 16 (5) : 497-504
- García-Carreño F. L. , M. P. Hernández-Cortéz, N. F. Haard, (1994). Ezymes with peptidase and proteinase activity from the digestive system of a freshwater and a marine decapod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42(7):1456-1461.
- García-Carreño F. L. y M. A. Navarrete del Toro. (1997). Clasification of proteases without tears. *Biochemical Education*. 25 (3) 161-167.
- García-Carreño F.L., A. Navarrete del Toro y M. Ezquerro (1997). Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility in vitro I: Effect of protease inhibitor in protein ingredients. *J. Mar. Biochem* 3: 36-40.
- Goeff L. A. y D. M. Smith, (1998), Recent Nutrition Research with australian penaeids. *Reviews in Fishery Science*, 6(1 y 2):113-127.
- Hernández-Cortés P., W. Quadros-Seiffert, M.A. Navarrete del Toro, G. Portillo, G. Colado y F.L. García-Carreño (1999). Rate of ingestion and proteolytic activity in digestion system of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, during continual feeding. *Journal of Applied Aquaculture* 9 (1): 35-45.
- Jone P.L. y S.S. De Silva (1997). Apparent nutrient digestibility of formulated diets by the australian freshwater crayfish *Cherax destructor* Clark (Decapoda, Parastacidae). *Aquaculture Research* 28: 881-891.

- Jones P.L. y S.S. De Silva (1998) Comparison of internal and external markers in digestibility studies involving the australian fresh water crayfish, *Cherax destructor* Clark (Decapoda, parastacidae). *Aquaculture Research* 29 : 487-493.
- Lan C. C. y B. Sun P. (1993). In vitro digestibility simulating the proteolysis of feed protein in the midgut gland of grass shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* (109) 59-70
- Le Chevalier P. y A. V. Wornhoudt (1998). Alpha-Glucosidase from the hepatopancras of shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea-Decapoda). *The Journal of Experimental Zoology* vol. 280: 284-394pp.
- Lee P. G., N. J. Blake y G. E. Rodrick (1980). A Quantitive analysis od digestive enzymes for the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Proc. World Maricul. Soc.* 11, 392-402 .
- Lee P. G. , L. L. Smith y A. L. Lawrence (1984). Digestion protease of Peaeus vannamei BOONE: Relationship between enzyme activity, size and diet. *Aquaculture* 42: 225-239 pp.
- McClinton J. B. , T. D. Klinger, Ken Marion y P. Hsueh (1991). Digestive carbohydrases of blue crab *Callinectes sapidus* (Rathbun): implications in utilization plan-derived detritusas a trophic resource. *JEMBE* 148 (4): 253-239.
- Meade Mark E. y Stephen A. Watts (1995). Weight gain and survival of juvenil australian crayfish *Cherax quadricarinatus* fed formulated feeds. *World Aquaculture Society* 26 (4) : 465-474

- Mendoza A. R. (1993). Métodos para evaluar la digestibilidad protéica de los alimentos destinado a los organismos acuáticos. Memorias del 1er. Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura, Monterrey N.L., México. 155-202.
- Omodoni J.G. y J.R. Stark (1996). *In vitro* Carbohydrate Digestibility test in the Indian white shrimp, *Penaeus indicus*. Aquaculture 139:315-328.
- Tsai Inn-Ho, Kuei-Lien Chuang y J. L. Chuang (1986). Chymotripsins in digestive tract of crustacean decapods (shrimp). Comp. Bioch. Physiol 85b (1):235-239
- Vega-Villasante F. , H. Nolasco y R. Civera (1995); The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis* –II. Properties of protease activity in the whole digestive tract. Comp. Biochem. Physiol. 112B (No.1) 123-129.
- Xue X. M., A. J. Anderson, N. A. Richardson, A. J. Anderson, G. P. Xue y P. B. Mather (1999). Characterisation of cellulase activity in the digestive system of the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). Aquaculture 180: 373-386.

APÉNDICE I

I. ELECTROFORESIS

I.1. Preparación de reactivos.

I.1.1. Solución acrilamida-bisacrilamida (30.8%, T, 2.7%)

Es importante manejar con precaución estos reactivos dada la característica neurotóxica de la acrilamida. Los componentes se disuelven parcial e individualmente antes de mezclarlos.

60.0 g de acrilamida
1.6 g de bisacrilamida
200 mL de agua destilada

I.1.2. Solución amortiguadora para el gel separador (1.5M Tris-HCl, pH 8.8)

Los componentes se disuelven en 300 mL de agua destilada.

54.6 g de TrisBase
Agregue 150 mL de agua desilada
Se ajusta el pH a 8.8 con HCl

I.1.3. Solución amiortiguadora para gel concentrador (0.5M, Tris-HCl, pH 6.8).

Los componentes se disuelven en 100 mL de agua destilada.

6.0 g de Tris Base
Agregue 60 mL de agua destilada.
Se ajusta el pH a 6.8 con HCl.

I.1.4. SDS 10% (Dodecilsulfato de sodio).

Se disuelven 10 g en 100 mL de agua destilada y se puede almacenar a temperatura ambiente hasta por 6 meses.

I.1.5. Persulfato de amonio 10% (Iniciador).

0.1 g de persulfato de amonio en 1.0 mL de agua destilada.

I.1.6. Solución amortiguadora de corrida para la cámara electroforética
(0.025M Tris, 0.192 M glicina, 0.1% SDS, pH 8.3)

30.28 g de Tris

144.13 glicina

10g SDS

I.2. Preparación del gel

I.2.1. Gel separador.

Después de ensamblar y sellar las placas de vidrio, se adiciona el gel separador, previamente desgasificado, aproximadamente 20mL. dejando polimerizar aproximadamente 40 minutos.

I.2.1. Gel concentrador.

Ya polimerizado el primer gel se adiciona el gel concentrador, previamente desgasificado y se coloca el peine, evitando queden burbujas dentro del gel. dejar polimerizar aproximadamente 40 minutos.

I.3. Preparación de las muestras.

I.3.1. Preparación de una sol. amortiguadora para las muestras 2X
(0.125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% v/v glicerol, 0.02% azul de bromofenol, pH 6.8)

4.0 mL de agua destilada

1.0 ml del sol.amortiguadora concentradora

0.8 mL glicerol

1.6 mL SDS 10%

2.0 mg azul de bromofenol

Aforar a 10 mL.

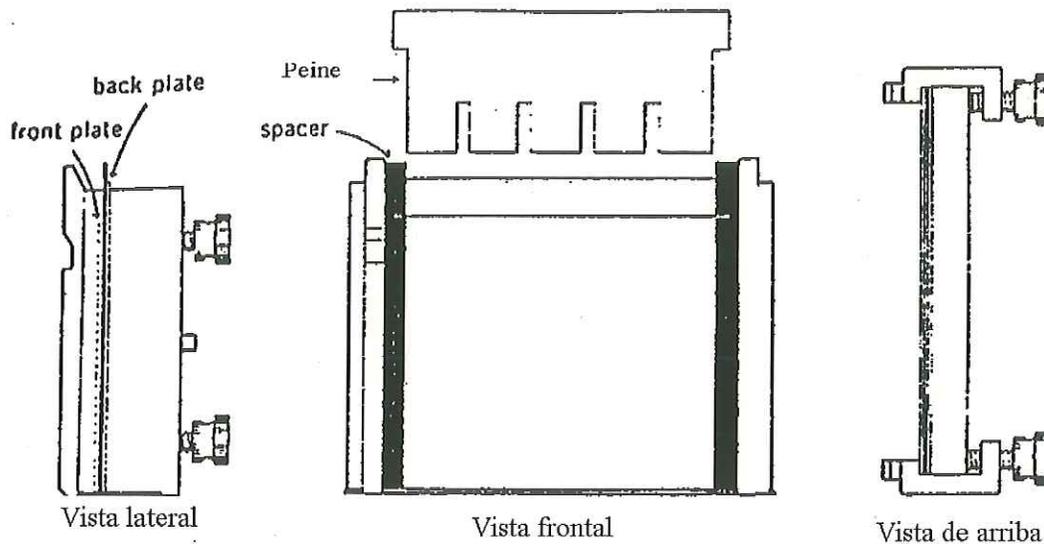
I.3.2. Preparación de muestras.

Se diluyen 1:1 con la sol. amortiguadora (0.125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% v/v glicerol, 0.02% azul de bromofenol, pH 6.8).

I.4. Corrida de muestras en la cámara electroforética.

Ya instaladas las placas de vidrio en la cámara, se rellenan los electrodos con la sol. amortiguadora de corrida. Con la ayuda de una jeringa Hamilton se llenan los carriles de la muestra cuidando que queden homogéneos en el fondo de cada carril.

Posteriormente se conecta la cámara a una fuente de poder y se corre a 30 mA por aproximadamente 1 o 2 horas (el marcador indicará).



Esquema de la cámara Bio-Rad Mini-Protean II

I.5. Tratamiento de los geles

I.5.1. Para evienciar proteínas.

El gel se tiñe por media hora con la una solución (0.05% azul brillante de Coomassie, 40% metanol, 7% ácido acético). Después se destiñe con una solución (40% metanol, 7% ácido acético) con recambios cada medio hora las primeras dos horas y se deja toda una noche con la solución para mejores resultados.

I.5.2. Zimogramas

Después de obtener el gel, este es incubado a 4°C en una solución de caseína 2%, posteriormente se enjuaga con agua destilada y se vuelve a incubar con la solución de caseína a 25°C. Al termino de las incubaciones el gel se tiñe con la solución (0.05% azul brillante de Coomassie, 40% metanol, 7% ácido acético)

IV.6. Parámetros para la caracterización de fracciones protéicas

Los parámetros utilizados para caracterizar las bandas de actividad proteasa presentes en los electroforegramas fueron los siguientes:

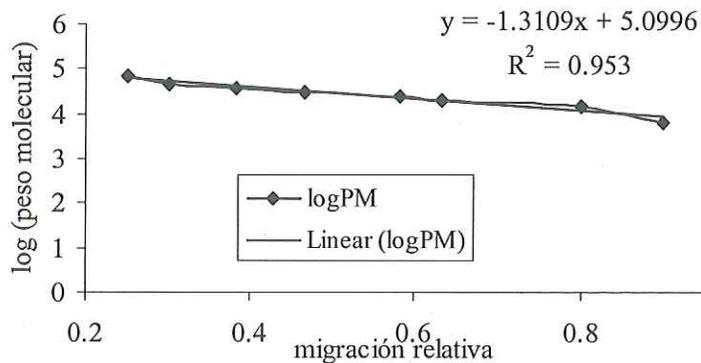
Migración: distancia en mm, desde el extremo catódico hasta el margen superior de la banda protéica.

RM: Es la distancia de movimiento relativa con respecto a la máxima migración con un valor de 1.

Con la RM y el logaritmo del peso molecular de los marcadores se hace un análisis de regresión. El resultado se utiliza para extrapolo a las bandas obtenidas de los extractos.

A continuación se presenta los cálculos realizados.

Proteína	PM	Migracion (mm)	RM	logPM
Apoproteína	6500	54	0.9	3.81291336
Alpha-lactoalbumina	14200	48	0.8	4.15228834
Inhibidor de tripsina	20000	38	0.63333333	4.30103
Tripsogeno	24000	35	0.58333333	4.38021124
Anhidrasa-carbónica	29000	28	0.46666667	4.462398
Gliceraldeido-3-fosfato eshidrogenasa	36000	23	0.38333333	4.5563025
Ovoalbumina	45000	18	0.3	4.65321251
Albumina	66000	15	0.25	4.81954394



Gráfica resultante de la regresión entre RM y Log (peso molecular)

Con los datos obtenidos se procedió a aplicarlos en las bandas obtenidas de los electroforegramas.

Bandas con alta actividad en contradas en los geles

	banda1	banda2	banda3
<i>Penaeus stylirostris</i>	0.333	0.533	0.85
<i>Penaeus californiensis</i>	0.5	0.85	
<i>Procambarus clarkii</i>	0.75	0.883	0.6333
<i>Cherax quadricarinatus</i>	0.75	0.883	0.933

logaritmo de pesos moleculares

<i>Penaeus stylirostris</i>	4.6630703	4.4008903	3.985335
<i>Penaeus californiensis</i>	4.44415	3.985335	
<i>Procambarus clarkii</i>	4.116425	3.9420753	4.29
<i>Cherax quadricarinatus</i>	4.116425	3.9420753	3.8765303

PESOS MOLECULARES

	banda1	banda2	banda3
<i>Penaeus stylirostris</i>	46033.1082	25170.4106	9667.963453
<i>Penaeus californiensis</i>	27806.7351	9667.96345	
<i>Procambarus clarkii</i>	13074.4973	8751.35497	18593.61
<i>Cherax quadricarinatus</i>	13074.4973	8751.35497	7525.412319

APÉNDICE II

II.1 PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos fueron procesados por un análisis de varianzas y los análisis a posteriori con una prueba Duncan, con una confiabilidad del 95%. Lo anterior se realizó con la ayuda del paquete estadístico Statistica 5.0 para windows.
procesamiento estadístico de las actividades

Los resultados en bruto se presentan a continuación, en rojo se muestran las diferencias.

TRIPSINA 30°

Summary of all Effects; design: (tripsina30.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	.198879	8	.000424		468.5369	.000000

SI, existe diferencia entre las 4 diferentes especies ahora ver cuales son las diferencias entre grupos.

Duncan test; VAR2 (tripsina30.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	{1}	{2}	{3}	{4}	
	.4254714	.4648259	.0000625	.0000551	
1 {1}		.047607	.000223	.000100	
2 {2}	.047607		.000100	.000077	
3 {3}	.000223	.000100		.999714	
4 {4}	.000100	.000077	.999714		

p= 0.050

TRIPSINA 40°

Summary of all Effects; design: (tripsina40.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	3	.425588	8	.000624	681.9017	.000000

SI, existe diferencia significativa por tanto se procede a verificar entre grupos

Duncan test; VAR2 (tripsina40.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	{1}	{2}	{3}	{4}
	.4886067	.7702563	.0080109	.0083956
1 {1}		.000223	.000100	.000223
2 {2}	.000223		.000077	.000100
3 {3}	.000100	.000077		.985537
4 {4}	.000223	.000100	.985537	

TRIPSINA 50°

Summary of all Effects; design: (tripsina50.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	3	.569273	8	.001780	319.8560	.000000

SI, existe diferencia significativa por tanto se procede a verificar entre grupos

Duncan test; VAR2 (tripsina50.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	{1}	{2}	{3}	{4}
	.7235403	.8238541	.0311201	.0141455
1 {1}		.019706	.000223	.000100
2 {2}	.019706		.000100	.000077
3 {3}	.000223	.000100		.635570
4 {4}	.000100	.000077	.635570	

TRIPSINA 60°

Summary of all Effects; design: (tripsina60.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	3	.147133	8	.002697	54.55705	.000011

SI, existe diferencia entre los grupos

Duncan test; VAR2 (tripsina60.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	{1}	{2}	{3}	{4}	
	.2483908	.4812936	.0254806	.0116284	
1 {1}		.000752	.000935		.000739
2 {2}	.000752		.000102		.000079
3 {3}	.000935	.000102			.752437
4 {4}	.000739	.000079		.752437	

TRIPSINA 70°

Summary of all Effects; design: (tripsina70.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
Effect	Effect	Error	Error			
1	3	.001468	8	.000460	3.189260	.084238

hay grupos parecidos por eso se hace la prueba Duncan para conocer específicos.

Duncan test; VAR2 (tripsina70.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	{1}	{2}	{3}	{4}	
	.0475401	.0209731	.0017141	.0000463	
1 {1}		.168055	.036397		.034550
2 {2}	.168055		.303763		.284993
3 {3}	.036397	.303763			.926634
4 {4}	.034550	.284993		.926634	

β-GLUCOSIDASA 37°

Summary of all Effects; design: (bglucoside.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
Effect	Effect	Error	Error			
1	3	.000081	8	.000000	4806.221	.000000

si hay diferencias significativas entre grupos

Duncan test; VAR2 (bglucoside.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	{1}	{2}	{3}	{4}	
	.0078431	.0121617	.0021000	.0010782	
1 {1}		.000223	.000223		.000100
2 {2}	.000223		.000100		.000077
3 {3}	.000223		.000100		.000226
4 {4}	.000100		.000077	.000226	

QUIMIOTRIPSINA 30°C

Summary of all Effects; design: (quimiotrpsina30.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	3	.007101	12		.000001	8249.188
						.000000

SI hay diferencias entre los grupos

Duncan test; VAR2 (quimiotrpsina30.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	{1}	{2}	{3}	{4}	
	.0746250	.0736750	.0009750	.0013750	
1 {1}		.173377	.000066		.000095
2 {2}	.173377		.000095		.000172
3 {3}	.000066		.000095		.553594
4 {4}	.000095		.000172	.553594	

CARBOXIPEPTIDASA A

Summary of all Effects; design: (ccarboxis a.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	1	.000038	6		.000006	5.865870
						.051725

NO existe diferencia entre los grupos y solo para verificar se procede al análisis a posteriori

Tukey HSD test; variable VAR2 (ccarboxis a.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	{1}	{2}
	.0169785	.0126150
1 {1}		.051903
2 {2}	.051903	

Duncan test; VAR2 (ccarboxis a.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	{1}	{2}
	.0169785	.0126150
1 {1}		.051903
2 {2}	.051903	

se corrobora la similitud entre grupos

Para la CARBOXIPEPTIDASA B NO SE OBSERVARON DIFERENCIAS SIG. POR QUE LA DESV. FUE CERO

PROTEOLITICA TOTAL DE LIOFILIZADOS 30°C

Summary of all Effects; design: (noname.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	3	6.031860	4	.011707	515.2158	.000012

Existe diferencia entre grupos

Duncan test; VAR2 (noname.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	{1}	{2}	{3}	{4}
	3.741836	2.693726	.3470690	.2593670
1 {1}		.000859	.000138	.000097
2 {2}	.000859		.000297	.000144
3 {3}	.000138	.000297		.463336
4 {4}	.000097	.000144	.463336	

PROTEOLITICA TOTAL DE LIOFILIZADOS 40°C

Summary of all Effects; design: (prot40.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	3	35.80773	4		.011252	3182.240
						.000000

Existen diferencias entre grupos

Duncan test; VAR2 (prot40.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	{1}	{2}	{3}	{4}
	8.991745	6.555527	.7911997	.5144820
1 {1}		.000295	.000137	.000097
2 {2}	.000295		.000292	.000137
3 {3}	.000137	.000292		.059690
4 {4}	.000097	.000137	.059690	

PROTEOLITICA TOTAL DE LIOFILIZADOS 50°C

Summary of all Effects; design: (noname.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	3	70.31664	4		.019239	3654.882
						.000000

Existen diferencias entre grupos

Duncan test; VAR2 (noname.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	{1}	{2}	{3}	{4}
	12.17798	9.789587	.9147328	.7929826
1 {1}		.000329	.000137	.000097
2 {2}	.000329		.000292	.000137
3 {3}	.000137	.000292		.429844
4 {4}	.000097	.000137	.429844	

PROTEOLITICA TOTAL DE LIOFILIZADOS 60°c

Summary of all Effects; design: (non.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	3	73.03219	4	1.370017	53.30752	.001107

Existen diferencias entre grupos

Duncan test; VAR2 (non.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	{1}	{2}	{3}	{4}
	10.31840	10.94177	.4558958	-.095668
1 {1}		.622727	.001300	.001059
2 {2}	.622727		.001035	.000875
3 {3}	.001300		.001035	.662209
4 {4}	.001059		.000875	.662209

PROTEOLITICA TOTAL DE LIOFILIZADOS 70°c

Summary of all Effects; design: (noname.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	3	3.807482	4	.032927	115.6340	.000243

Existen diferencias entre grupos

Duncan test; VAR2 (noname.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	{1}	{2}	{3}	{4}
	.6689949	3.075138	.2558899	.1360614
1 {1}		.000420	.085291	.045375
2 {2}	.000420		.000220	.000170
3 {3}	.085291		.000220	.545311
4 {4}	.045375		.000170	.545311

II.2. VERIFICACIÓN DE PENDIENTE IGUAL O DIFERENTE A CERO EN ESTUDIO DE ESTABILIDAD AL pH DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA TOTAL.

Prism Version 3.0- GraphPad

Variables	<i>P. stylirostris</i>	<i>P. californiensis</i>	<i>P. clarkii</i>	<i>C. quadricarinatus</i>
Slope	0.04830 ± 0.050	-0.1694 ± 0.1487	-0.1181 ± 0.08699	-0.09268 ± 0.07601
Y-intercept	3.018 ± 0.3985	4.069 ± 1.178	1.551 ± 0.6891	1.122 ± 0.6021
X-intercept	-62.47	24.02	13.14	12.11
1/slope	20.7	-5.904	-8.469	-10.79
95% Confidence Intervals				
Slope	-0.09136 to 0.1880	-0.5821 to 0.2433	-0.3596 to 0.1234	-0.3037 to 0.1183
Y-intercept	1.911 to 4.124	0.7995 to 7.338	-0.3615 to 3.464	-0.5492 to 2.794
Goodness of Fit				
r ²	0.1873	0.245	0.3154	0.271
Sy.x	0.1452	0.4292	0.2511	0.2194
Is slope significantly non-zero?				
F	0.9218	1.298	1.842	1.487
DFn, DFd	1.000, 4.000	1.000, 4.000	1.000, 4.000	1.000, 4.000
P value	0.3914	0.3181	0.2462	0.2897
Deviation from zero?	Not Significant	Not Significant	Not Significant	Not Significant
Data				
Number of X values	6	6	6	6
Maximum number of Y replicates	1	1	1	1
Total number of values	6	6	6	6
Number of missing values	0	0	0	0