TESIS DEFENDIDA POR

Eduardo Roberto Morales Guerrero

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Facundo J. Márquez Rocha

Director del Comité

Dr.Helmut Maske Rubach

Miembro del Comité

M.C. Denisse Re Araujo

Miembro del Comité

M.C. Manuel de J. Acosta Ruiz

Miembro del Comité

Dr. Jaime Farber Lorda

Jefe del Departamento de Ecología

Dr. Federico Graef Ziehl

Director de Estudios de Posgrado

13 de junio del 2000

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICAY DE EDUCACIÓN SUPERIOR

DE ENSENADA.

DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA.

DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA

INDUCCIÓN DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS EN EL CAMARÓN

Penaeus vannamei (Boone)

TESIS

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

Eduardo R. Morales Guerrero

Ensenada, Baja California, México. Junio del 2000

RESUMEN de la Tesis de **EDUARDO ROBERTO MORALES GUERRERO** presentada como requisito parcial, para la obtención del grado de **MAESTRO EN CIENCIAS en ECOLOGIA MARINA.** Ensenada, Baja California, México. Junio del 2000.

INDUCCIÓN DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS EN EL CAMARÓN

***Penaeus vannamei* (Boone)**

Resumen aprobado por:

Dr. Facundo J. Márquez Rocha

Director de Tesis

Se estudia el efecto del origen de la proteína en la dieta de el camarón *Penaeus vannamei* sobre la producción de enzimas proteolíticas en el hepatopáncreas, específicamente de la Quimotripsina y las Carboxipeptidasas A y B. Se utilizaron dos dietas, una preparada en el laboratorio de Nutrición del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), con componentes vegetales y una dieta comercial con alto porcentaje de proteina de origen animal. Las dietas fueron ensayadas sobre 120 camarones, cada una de ellas fue proporcionada a cuatro grupos de 15 organismos entre 6 y 8.5 cm de longitud, los que se mantuvieron por un periodo de 15 dias en acuarios a salinidad de 28 ‰ y temperatura de 28 °C. El bioensayo se realizó dos veces y al término de cada uno se extrajeron los hepatopáncreas de los organismos y con estos se preparó un extracto enzimático por acuario. A los extractos se les determinó la concentración de proteína, la Actividad Proteolítica Total sobre azocaseina, la Actividad Carboxipeptidasa A sobre hippuril-L-Phe (HPE) y la Actividad Carboxipeptidasa B sobre

hippuril-L-Arg (HA). Se purificaron los extractos precipitando la proteina con sulfato de amonio al 40%, 60% y 80%. Los precipitados resuspendidos que se obtuvieron con las concentraciones de 40% y 60% de sulfato de amonio se purificaron por segunda ocasión a través de una columna de Sephadex G25 y se analizó el efecto de la temperatura sobre la Actividad Proteolítica Total a 40, 45, 50, 60 y 70 °C y se determinó la estabilidad térmica a 40, 50 y 60 °C.
Los camarones alimentados con la dieta animal tuvieron un crecimiento mayor en los dos bioensayos. La Actividad Proteolítica Total y la Actividad de las Carboxipeptidasas A y B no presentaron diferencias en los dos bioensayos. La Actividad Quimotripsina fue mayor en la dieta vegetal solo en el primer bioensayo, en el segundo no hubo diferencia. Después de la purificación con sulfato de amonio las fracciones obtenidas con 40% y 60% presentaron actividad enzimática, las actividades en la fracción de 80% fueron muy bajas en relación a las anteriores, por lo que se eliminó esta fracción. La Actividad Proteolítica se incrementó proporcionalmente al aumentar la temperatura hasta los 50 °C en la dieta vegetal y hasta los 60 °C en la dieta animal. A 70 °C no hubo Actividad en ninguna de las dos dietas. Los extractos fueron termoestables a 40 °C durante 100 minutos, a 50 °C la Actividad Proteolítica inicial fue mayor que a 40 °C pero disminuyó paulatinamente con el tiempo. A 60 °C la Actividad Proteolítica inicial fue mayor que a 50 °C pero disminuyó rápidamente hasta casi nulificarse a los 100 minutos.

Palabras clave: Enzimas, *Penaeus vannamei*, Quimotripsina, Carboxipeptidasas

ABSTRACT of the Thesis of Eduardo Roberto Morales Guerrero, presented as partial requirement to obtain the MASTER IN SCIENCES grade in MARINE ECOLOGY. Ensenada, Baja California, México. June 2000.

INDUCTION OF PROTEOLYTIC ENZYMES IN THE SHRIMP
Penaeus vannamei (Boone)

ABSTRACT

The effects of source of feed protein on digestive proteases from hepatopancreas of *Penaeus vannamei* had been studied, specifically Chymotrypsin and Carboxypeptidases A and B enzymes. Two diets were used, one of them was prepared in the Nutrition Laboratory at CICESE with vegetables ingredients and a comercial diet with a high percentage in animal proteins. These diets were tested on 120 shrimps, each diet was given to four groups of 15 organisms between 6 and 8.5 cm. of length, which were kept for 15 days in aquariums with 28%° of salinity and 28 °C. Bioassay was done twice, at the end, the hepatopancreas was took out from the organisms and with this was made an ezymatic extract for each aquarium. The protein concentration was determinated per extract, the Proteolytic Activity was measure over azocasein, Carboxypeptidase A over hippuryl-L-Phe (HPE) and Carboxypeptidase B with hippuryl-L-Arg (HA). The extracts were purified precipitating the protein with ammoniun sulfate to 40%, 60% and 80%. The proteins which were gotten with the 40% and 60% ammonium sulfate were purified by the second time through Sephadex G25 column. The temperature effect on Proteolytic Activity was studied and the thermic stability was measured at 40, 50 and 60 °C., the shrimps with the animal diet had a higher growth in both bioassays. Total Activity and Carboxypeptidases A and B Activities did not show any difference. Chymotrypsin Activity was higher in the vegetable diet, just in the first bioassay, in the second one was not any difference. After the purification with ammonium sulfate, the gotten fractions with 40% and 60% showed Proteolytic Activity, the activity in the 80% fraction was much lower than the lower percentages fractions made before, therfore this was eliminated. The Proteolytic Activity was incremented in a proportional way when the temperature was increased to 50 °C in the vegetable diet and to 60 °C in the animal diet. In the 70 °C any diet showed activity. The extracts were thermostables in 40 °C in 100 minutes, in 50 °C the initial Activity was more higher than in the 40 °C but it was slowly decreased with the time. In 60 °C Proteolytic Activity was higher than the 50% but it got decrease and dropped rapidly until it was almost dissapeared at the 100 minutes.

Keywords: Enzymes, *Penaeus vannamei*, Chymotrypsin, Carboxypeptidases

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos aquellos que directa o indirectamente me ayudaron a la realización de esta Tésis, especialmente al **Dr. Facundo J. Márquez Rocha** por haberme dirigido hasta su terminación.

A la **M. C. Denise Re A.**, al **M. C. Manuel de J. Acosta R.** y al **Dr. Helmut Maske** por haber fungido como sinodales y por sus sugerencias para mejorar el trabajo realizado.

A los **Investigadores** y **Técnicos** del Departamento de Acuicultura, porque me han enseñado mucho aunque desafortunadamente no todo lo he aprendido.

A **Francisco Valenzuela B.,** por su colaboración en la realización de algunos gráficos.

A **Marisela Aguilar J.,** por sus observaciones y amistad.

A mis hijas **Alina** y **Tania** y especialmente a mi esposa **Blanca Hilda**, quiero agradecerles y dedicarles esta Tésis por seguir conmigo, siempre apoyandome y animandome.

CONTENIDO

1 INTRODUCCION 1

1.1 Importancia de la camaronicultura. 1

1.2 Biología de Penaeus vannamei 1
1.2.1 Taxonomía 1
1.2.2 Morfología 3
1.2.3 Reproducción y desarrollo. 6
1.2.4 Alimentación 6

1.3 La nutrición en la camaronicultura 7
1.3.1 Antecedentes 8
1.3.2 Digestibilidad enzimática 11
1.3.3 Proteasas 13
1.3.3.1 Tripsina 14
1.3.3.2 Quimotripsina 15
1.3.3.3 Carboxipeptidasa A 15
1.3.3.4 Carboxipeptidasa B 16

1.4 JUSTIFICACIÓN 16

1.5 OBJETIVO 17

2 MATERIALES Y MÉTODOS : 17

2.1 Diseño experimental 17
2.2 Dietas 20
2.3 Organismos 21
2.4 Preparación de extracto crudo de hepatopáncreas al 20% 21
2.5 Determinación de proteina 22
2.6 Determinación de actividad proteolítica 22
2.7 Determinación de actividad carboxipeptidasa A 23
2.8 Determinación de actividad carboxipeptidasa B 24
2.9 Determinación de Actividad Quimotripsina 24
2.10 Purificación de enzimas proteolíticas 25

2.11 Etapa de purificación en Sephadex G25 27
2. 12 Efecto de la temperatura sobre la Actividad Proteolítica Total 27
2.13 Determinación de la estabilidad térmica de la Actividad Proteolítica. 27
2.14 Análisis estadístico 28

3 RESULTADOS 29

3.1 Morfometría 29

3.2 Actividad enzimática 32
3.2.1 Actividad Proteolítica Total 32
3.2.2 Actividad Carboxipeptidasa A 32
3.2.3 Actividad Carboxipeptidasa B 35
3.2.4 Actividad quimotripsina 35

3.3 Purificación de proteasas 35

3.4Efecto de la temperatura sobre la Actividad Proteolítica Total 35

3.5Determinación de la Estabilidad Térmica de la Actividad Proteolítica Total a 40, 50 y 60°C 41

4 DISCUSIÓN 45

5 CONCLUSIONES 52

6 LITERATURA CITADA 53

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Anatomia externa del camarón *Penaeus*	3
2	Anatomia interna del camarón *Penaeus*	5
3	Distribución de acuarios A1, A2, ..., A8 y dietas proporcionadas. Dieta 1 a los acuarios 1, 3, 6 y 8. Dieta 2 a los acuarios 2,4,5 y 7.	19
4	Curva estándar con albúmina de suero bovino para determinación de proteína.	22
5	Comparación en cada acuario del promedio de talla longitudinal al inicio y al término del bioensayo 1. La diferencia fue significativa (P>0.05).	30
6	Comparación en cada acuario del promedio de talla al inicio y al término del bioensayo 2. La diferencia fue significativa (P>0.05).	30
7	Comparación en cada acuario del promedio de peso al inicio y al término del bioensayo 1. La diferencia fue significativa (P>0.05).	31
8	Comparación en cada acuario del promedio de peso al inicio y al término del bioensayo 2. La diferencia fue significativa (P>0.05).	31
9	Cinética de la Carboxipeptidasa A del extracto crudo de hepatopáncreas. Bionesayo 1.	34
10	Cinética de la Carboxipeptidasa A del extracto crudo de hepatopáncreas. Bioensayo 2.	34
11	Cinética de la Carboxipeptidasa B del extracto crudo de hepatopáncreas. Bioensayo 1.	36
12	Cinética de la Carboxipeptidasa B del extracto crudo de hepatopáncreas. Bioensayo 2.	36
13	Cinética de la Quimotripsina de extracto crudo de hepatopáncreas. Bioensayo 1.	37
14	Cinética de la Quimotripsina de extracto crudo de hepatopáncreas. Bioensayo 2.	37
15	Actividad Proteolítica de las fracciones de extracto crudo de hepatopáncreas separadas con diferentes concentraciones de sulfato de amonio.	38

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
16	Actividad Carboxipeptidasa A de las fracciones de extracto crudo de hepatopáncreas separadas con diferentes concentraciones de sulfato de amonio.	38
17	Actividad Carboxipeptidasa B de las fracciones de extracto crudo de hepatopáncreas separadas con diferentes concentraciones de sulfato de amonio.	39
18	Actividad Quimotripsina de las fracciones de extracto crudo de hepatopáncreas separadas con diferentes concentraciones de sulfato de amonio.	39
19	Determinación de proteína de las fracciones eluidas de la columna de Sephadex G25.	40
20	Cinética a 20 °C de la Actividad Proteolítica Total de extracto crudo de hepatopáncreas.	42
21	Cinética a 40 °C de la Actividad Proteolítica Total de extracto crudo de hepatopáncreas.	42
22	Cinética a 45 °C de la Actividad Proteolítica Total de extracto crudo de hepatopáncreas.	42
23	Cinética a 50 °C de la Actividad Proteolítica Total de extracto crudo de hepatopáncreas.	43
24	Cinética a 60 °C de la Actividad Proteolítica Total de extracto crudo de hepatopáncreas.	43
25	Cinética a 70 °C de la Actividad Proteolítica Total de extracto crudo de hepatopáncreas.	43
26	Efecto de la temperatura sobre la Actividad Proteolítica Total de extracto de hepatopáncreas a diferentes temperaturas.	44
27	Estabilidad a diferentes temperaturas de la Actividad Proteolítica Total del extracto crudo de hepatopáncreas de los camarones alimentados con la Dieta Animal.	44

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Composición de la **Dieta 1 (vegetal)**	20
II	Porcentaje final de saturación de sulfato de amonio	26
III	Talla longitudinal de los camarones *Penaeus vannamei* alimentados con las dietas 1 y 2, al inicio de los bioensayos 1 y 2.	30
IV	Peso promedio de los camarones *Penaeus vannamei* alimentados con las dietas 1 y 2, al inicio de los bioensayos 1 y 2.	31
V	Promedio de concentración de proteína en los extractos crudos de hepatopáncreas en los bioensayos 1 y 2.	32
VI	Promedio de Actividad Proteolítica Total sobre azocaseina de los extractos crudos de hepatopáncreas en los bioensayos 1 y 2.	32
VII	Actividad Carboxipeptidasa A de el extracto crudo de hepatopáncreas en los bioensayos 1 y 2.	34
VIII	Actividad Carboxipeptidasa B de el extracto crudo de hepatopáncreas, en los bioensayos 1 y 2.	36
IX	Actividad Quimotripsina obtenida en las dos dietas ensayadas.	37
X	Determinación de Actividad después de fraccionar los extractos crudos de hepatopáncreas de cada dieta con (NH4)SO4 con tres porcentajes de saturación, 40%, 60% y 80%.	40

INDUCCIÓN DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS EN EL CAMARÓN

Penaeus vannamei (Boone)

I INTRODUCCION

I.1 Importancia de la camaronicultura.

La producción mundial de camarón es aproximadamente 2.2 millones de toneladas, incluyendo 700,000 tons. de camarón cultivado (García-Carreño *et al.*, 1997b). Entre los principales productores de camarón se cuentan China, Indonesia, Tailandia y Filipinas. En América Latina el principal productor es Ecuador que cuenta con 345 laboratorios para la producción de larvas y postlarvas. En México esta modalidad productiva se está desarrollando principalmente en la costa del Pacífico en los Estados de Sinaloa, Sonora y Nayarit en donde una de las especies naturales de esa zona es *Penaeus vannamei* conocida comúnmente como camarón blanco.

I.2 Biología de *Penaeus vannamei*

I.2.1 Taxonomía

De acuerdo con Burkenroad (1981) la clasificación taxonómica de *Penaeus vannamei* es la siguiente:

Phylum: *Arthropoda*

Superclase: *Crustacea* (Pennant, 1777)

Clase: *Malacostraca* (Latreille, 1806)

Subclase: *Eumalacostraca* (Grobben, 1892)

Superorden: *Eucarida* (Caiman, 1904)

Orden: *Decapoda* (Latreille, 1803)

Suborden: *Dendrobranchiata* (Bate, 1888)

Superfamilia: *Penaeoidea* (Rafinesque-Schmaltz, 1815)

Familia: *Penaeidae* (Rafinesque-Schmaltz, 1815)

Subfamilia: *Penaeinae* (Ortmann, 1898)

Género: *Penaeus* (Smith, 1885)

Subgénero: *Litopenaeus*

Especie: *vannamei* (Boone, 1931)

Actualmente Pérez-Farfante *et al.* (1997), propone, entre otros cambios, elevar a rango de género el subgénero *Litopenaeus.*

I.2.2 Morfología

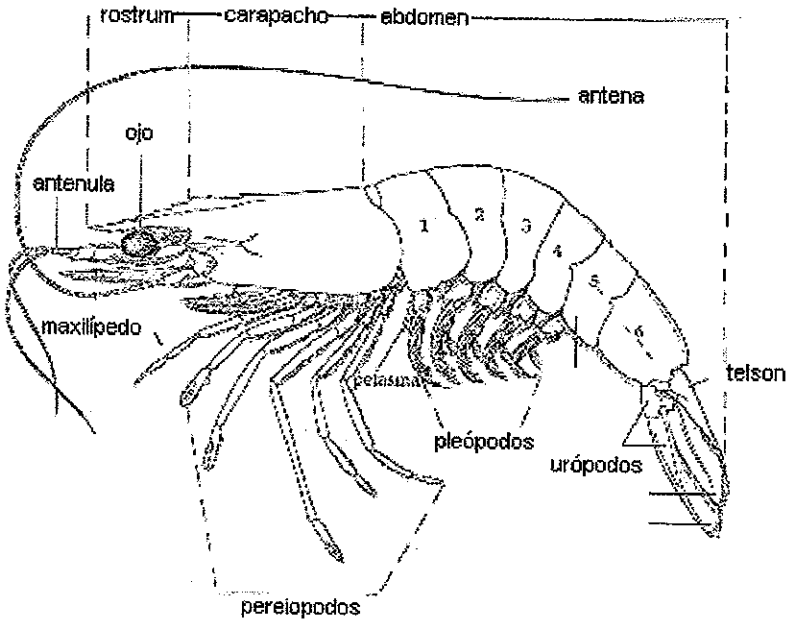


Fig. 1. Anatomia externa del camarón *Penaeus*

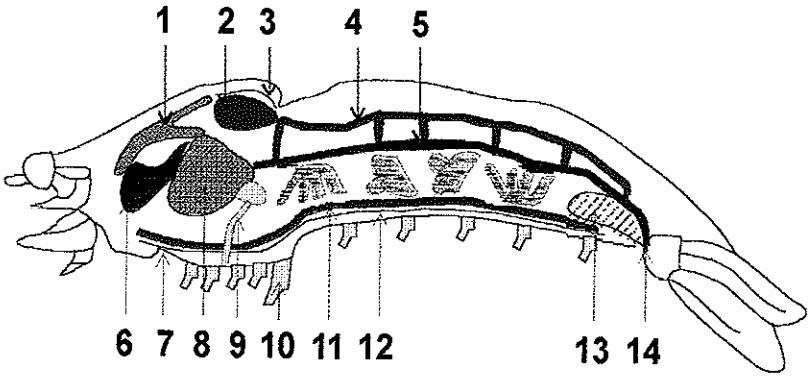
El cuerpo del camarón está constituido de trés regiones principales: cefalotórax, abdomen y telson. Cada una de estas, con apéndices especializados. En el cefalotórax se encuentran las antenas, antenulas, mandíbulas, maxilas, maxilípedos y pereiópodos (Fig. 1). Las primeras, provistas de órganos quimioreceptores denominados **astetascos,** mediante los cuales el camarón detecta el alimento. Junto a las mandíbulas y maxilas, se encuentran tres pares de apéndices torácicos denominados maxilípedos especializados para retener y manipular el alimento, los cinco pares torácicos restantes; los pereiópodos, tienen función locomotora. En el cefalotórax se encuentra el *rostrum,* el cual está provisto de espinas o

dientes cuya disposición es característica de cada especie. En el caso de *Penaeus vannamei* se encuentran de 3 a 9 dientes sobre su cresta dorsal y dos dientes en su porción ventral. El segundo diente de la cresta ventral está al mismo nivel o delante del primer diente de la cresta dorsal.

En el abdomen se localizan cinco pares de pleópodos cuya función principal es la natatoria. En los machos el primer par se ha modificado para formar un órgano copulatorio llamado petasma, en las hembras se encuentra una estructura quitinizada llamada télico entre el quinto par de pereiópodos. En el telson se encuentran los urópodos.

Todo el cuerpo se encuentra cubierto por un exoesqueleto quitinoso o caparazón que es secretado por la epidermis (Rodríguez, *et al.*, 1991).

El tubo digestivo se divide en tres partes: estomodeo, mesenterón y proctodeo (Fig 2).



1.- Ovario
2,- Corazón
3.- Pericardio
4.- Arteria abdominal dorsal
5.- Intestino
6.- Estómago
7.- Arteria torácica ventral
8.- **HEPATOPÁNCREAS**
9. - Oviducto
10.- Télico
11.- Arteria abdominal ventral
12.- Cordón nervioso ventral
13.- Glándula intestinal
14.- Ano

Fig 2. Anatomia interna del camarón *Penaeus*

La boca se encuentra localizada en posición cefálica ventral, rodeada de las mandíbulas, maxílas y maxilípedos con los que rompe el alimento antes de ser introducido al esófago y enseguida al estómago. Este último dividido en dos partes separadas por una válvula cardio-pilórica. La primera parte como almacén de los alimentos ingeridos y la segunda sirve para molerlos mediante una serie de piezas calcáreas. Los alimentos avanzan del intestino anterior al intestino medio en donde las particulas más finas pasan a través de cerdas muy cerradas hacia el hepatopáncreas, las particulas que no pasan el filtro pasan al intestino, donde son recubiertas por mucopolisacáridos formandose así las heces fecales.

I.2.3 Reproducción y desarrollo.

En el género *Penaeus* La fecundación de los huevecillos es externa y en mar adentro, el macho coloca el espermatóforo en el abdomen de la hembra y la fecundación ocurre cuando la hembra libera los huevos y el esperma simultáneamente. Se ha estimado que una hembra puede producir de 500,000 a 1,000,000 de huevecillos en el desove (Cook y Lindner 1970), Los huevecillos se hunden y eclosionan entre 11 y 18 horas después del desove (Cook y Murphy, 1971).El primer estadio larval es denominado **nauplio,** tiene seis subestadios y dura 40 horas, el segundo estadio larval, **protozoea** con tres subestadios en aproximadamente 80 horas, por último el tercer estadio larval, **mysis** con tres subestadios, en aproximadamente 70 horas (Rodríguez, *et al.*, 1991). A partir de este estadio los cambios son muy sutiles y se inicia el desarrollo postlarvario. Durante los primeros estadios larvales el camarón es planctónico y se mueve del lugar de desove hasta las aguas protegidas constituídas por las marismas, esteros y bahías donde entra a la etapa de postmysis. Al alcanzar el estado adulto sale de las aguas protegidas e inicia el movimiento mar adentro.

I.2.4 Alimentación

En el medio natural o durante el cultivo, los camarones no requieren alimentación en la etapa de **nauplio**, pues se alimentan de la reserva de vitelo. en las etapas de **protozoea** y **mysis** se alimentan de fitoplánctón y zooplánctón. En la etapa de **postlarva** (10-12 mm), comienzan a alimentarse en el fondo del estanque o de los esteros, según sea el caso. Los peneidos son detritívoros y pueden alimentarse de materia vegetal o animal (Wikins, 1976), es en esta etapa cuando es necesario proporcionar un alimento adecuado a la especie que se

cultiva tomando en cuenta la edad y el estado fisiológico de los organismos, pues hay evidencias de que las preferencias alimenticias cambian, dependiendo de las condiciones (Marte, 1980).

I .3 La nutrición en la camaronicultura

La nutrición es la ciencia que interpreta la relación entre los nutrientes que ingiere un organismo y su funcionamiento. Para ello, evalúa los procesos de ingestión del alimento, los procesos digestivos, la liberación de energía, la eliminación de residuos y, la síntesis de los elementos necesarios para su mantenimiento, crecimiento y reproducción.

En la camaronicultura la nutrición es uno de los aspectos más importantes y la enzimología digestiva y la utilización de macronutrientes (proteínas, lípidos, carbohidratos) son de los aspectos más importantes en la nutrición.

Un conocimiento de la fisiología digestiva de las larvas marinas es necesario cuando se diseñan dietas artificiales para especies cultivadas (Diaz, 1977). En la última década se observa un incremento sustancial en el número de trabajos científicos publicados en nutrición de camarones, enfocados a determinar los requerimientos de los principales nutrientes en las diferentes especies y fases de producción, esto se debe a la necesidad de optimizar los recursos nutricionales ya que el alimento para camarones puede llegar a constituir más del 50% de los costos de producción del camarón por acuicultura (Garcia-Carreño, 1997b).

A la fecha el mejor alimento que se ha encontrado para las postlarvas es *Artemia nauplii*, con la cual alcanzan hasta tres veces el crecimiento que se logra con otras dietas.

Los ingredientes más utilizados en la elaboración de dietas artificiales para el camarón se pueden dividir en 3 categorías.

a) Aminoácidos.- Las fuentes animales han sido mejor que las vegetales.

b) Carbohidratos.- Principalmente las harinas de granos, entre estas destaca la harina de soya.

c) Minerales.- Existe una necesidad de calcio y magnesio que pueden ser proporcionados a través de la harina de pescado. En cuanto a elementos traza, se han incluidoen en las dietas artificiales pero no hay un efecto visible.

I.3.1 Antecedentes

El interés por conocer el papel que juegan las enzimas se refleja en los estudios que se han llevado a cabo sobre diferentes especies de valor comercial, buscando inducir la secreción de enzimas mediante la adición de diferentes elementos en la dieta, con el fin de lograr un mejor aprovechamiento de la misma y una mejor calidad del producto después de cosechado.

Mohd *et al.* (1993), estudiaron el efecto sobre el crecimiento, la composición muscular y la actividad de las enzimas digestivas en juveniles de mahseer, pez de la India de la familia *Cyprinidae*, al proporcionarle una dieta a base de 40% de proteina de pescado adicionada con diferentes porcentajes de aceite de sardina: 3, 6, 9 y 12%, y encontraron que la incorporación de aceite al nivel más alto indujo no sólo la producción de lipasas, sino una secreción mayor de proteasas.

La incorporación de algas en combinación con una dieta viva, para alimentar larvas de la carpa europea *Dicentrarchus labrax* provoca una secreción mayor de tripsina, mientras que

la amilasa y la quimotripsina no cambian su actividad, Cahu C.L. *et al.* (1998). La presencia de actividad amilasa y proteasa sugiere la necesidad de incorporar proteina animal en la dieta de los peces que presentan este patrón, Das, K.M. *et al.* (1991).

Cambios en la actividad enzimática se presentan durante el desarrollo larval de algunas especies de crustáceos, asociados con los cambios morfológicos y de hábitos alimenticios. Biesiot, P.M. *et al.* (1990), estudiaron en la langosta americana *Homarus americanus* (Milne Edwards), la actividad de: proteasas, lipasas y amilasas. Determinan que todas las actividades fueron muy bajas en los embriones antes de eclosionar, posiblemente porque las celulas responsables de la secreción de las mismas no se habian desarrollado. Después de los primeros estadios de desarrollo, durante la etapa post-metamórfica, los cambios en las actividades enzimáticas parecen estar relacionados con los cambios en la forma corporal, el hábitat o el patrón de almacenaje y utilización de la energía.

Larvas de *Penaeus japonicus* alimentadas con tres diferentes dietas: artificial, viva, viva + algas, no presentaron diferencia en peso y talla hasta el tercer estadio larval. Durante la fase mysis y postlarval el crecimiento del grupo alimentado con la dieta artifical fue mucho menor que el de los otros dos, sin embargo la actividad de tripsina en la dieta artificial fue mayor. Le Vay, L. *et al.* (1993). Otra investigación en tres grupos de *Penaeus japonicus* en el estadio mysis, los que fueron alimentados con dieta animal, vegetal y una mezcla de ambas, muestra que la actividad de tripsina fue influenciada por la dieta en mayor grado que la actividad de la amilasa. Aparentemente la poca proteina disponible en la dieta vegetal estimula la secreción de tripsina. Rodríguez A. *et al.* (1994).

En camarones la actividad proteolítica se debe principalmente a la acción de la tripsina y

quimotripsinas, Van Wormhoudt *et al.* (1992) reporta dos variantes de quimotripsina en *Penaeus vannamei* sin embargo Hernández-Cortéz P. *et al.* (1997) purifica una sóla quimotripsina en la misma especie. En diferentes especies de camarones la actividad de la quimotripsina parece ser siempre menor que la de la tripsina, Inn-Ho (1986).

En *Penaeus monodon,* durante nauplio y zoea la actividad proteolítica es muy baja y aumenta en la etapa mysis (Lee-Shing, 1992), situación parecida a la encontrada por Biesiot, P.M. *et al.* (1990) en *Homarus americanus,* esto debido al aumento de la actividad de la tripsina y quimotripsina en la etapa de mysis. Además la relación de la actividad amilasa:proteasa coincide con el cambio de dieta del camarón en los diferentes estadios de vida por lo que pudiera pensarse que la dieta es la causa del cambio en la proporción de las enzimas.

Ezquerra (1997), ensayó en *Penaeus vannamei* una dieta base a la que se le reemplazó el 15% de la misma con diferentes elementos. Realizó siete ensayos y analizó la actividad proteasa en el hepatopáncreas . Este estudio mostró que un pequeño cambio en la dieta puede modificar la secreción enzimática.

En dos Decápodos: *Pacifastacus astacus* y *Pleuroncodes planipes,* estudiados por Garcia-Carreño *et al.* (1994a), se encontró un alto porcentaje de actividad endopeptidasa del tipo "**serine proteinasa**" en relación a la actividad de las exopeptidasas. En otro estudio realizado sobre las mismas especies de decápodos, se comprobó la presencia de enzimas tipo quimotripsina (Garcia-Carreño *et al.*, 1994b).

La actividad enzimática puede ser inhibida por diferentes compuestos, es por esto que cuando se ensaye un nuevo ingrediente en una dieta, se debe investigar si no tiene

inhibidores enzimáticos (Garcia-Carreño *et al.*, 1996). En caso de que existan se debe tratar térmicamente al alimento ya que esto reduce la capacidad de los inhibidores (Garcia-Carreño, 1997b).

I.3.2 Digestibilidad enzimática

Para que las moléculas puedan interactuar durante un proceso bioquímico requieren energía de activación, esta se puede generar de la colisión de una molécula con otra o puede ser proporcionada por una fuente externa, como el calor. Las enzimas (E) forman con el sustrato (S) un compuesto intermedio enzima-sustrato (ES) que requiere una energía de activación pequeña y entonces el proceso esperado es rápido, finalmente el compuesto de transición (ES) se descompone en la enzima original sin alterarla (E) y el producto esperado (P), así la enzima (E) participa en la reacción una y otra vez.

La formación de el complejo enzima-sutrato (ES) depende de una relación especial entre las superficies de las dos substancias de tal manera que solamente una forma particular del sustrato "encaja" en un sitio particular de la enzima conocido como **sitio activo**. Se cree que la unión del sustrato en el sito activo de la enzima provoca que esta cambie su forma a una que requiere menos energía de activación. Una vez realizado el proceso la enzima (E) libera el producto (P) y recupera su forma.

Como un mecanismo regulador de la actividad enzimática las celulas producen compuestos que pueden inhibirla. Hay tres formas principales de inhibición: **competitiva, sin competencia** y **no competitiva.**

Un inhibidor **competitivo** actúa ocupando el **sito activo** de la enzima formando un complejo enzima-inhibidor (EI) que impide que se forme el complejo enzima-sustrato (ES).

El inhibidor **sin competencia** actúa después de que se ha formado el complejo enzima-sustrato (ES) combinandose con este para formar el complejo enzima-sustrato-inhibidor (ESI), el cual no forma el producto (P) y no libera la enzima (E).

Un inhibidor **no competitivo** puede combinarse con la enzima libre formando el complejo (EI), o puede combinarse con el complejo enzima-sustrato (ES) formando un nuevo complejo enzima-sustrato-inhibidor (ESI), en ambos casos interfiere la función normal de la enzima. El inhibidor **no competitivo** se une a la enzima en un sitio diferente del **sitio activo**, deformando la enzima e impidiendo que forme el complejo enzima-sustrato (ES) (Lehninger, 1975).

A las enzimas se les denomina comúnmente a partir de la raíz del nombre de la fuente de obtención agregandole la terminación **ina,** vgr.: **papaína** se obtiene de la papaya, o también pueden basarse en la raíz del nombre del sustrato sobre el que actúan agregandole la terminación **asa**, **proteasa**, hidroliza las proteinas.

Un sistema de clasificación internacional (EC), establecido en 1956 por la Unión Internacional de Bioquímica, clasifica las enzimas en seis grupos de acuerdo a la reacción total catalizada; (1) Oxidorreductasas: las que participan en oxidaciones biológicas como la respiración, transfiriendo electrones. (2) Transferasas: catalizan la transferencia de grupos funcionales. (3) Hidrolasas: participan en reacciones de hidrólisis sobre ésteres, enlaces glucosílicos, enlaces peptídicos, enlaces C-N y sobre ácidos anhídricos. (4) Liasas: rompen enlaces C-C, C-O, C-N por eliminación. (5) Isomerasas: Actúan sobre isómeros ópticos

transformándolos de uno a otro. (6) Ligasas: catalizan el enlace de dos moléculas, C-O, C-S, C-N, C-C. (Gonzalez, 1981).

Para definir la actividad de cada enzima la Comisión de Enzimas (EC) sugiere un nombre sistemático que consiste del nombre del sustrato sobre el que actúa añadiendole la terminación "asa", seguido de un código de cuatro dígitos separados por un punto, relacionados con el tipo de actividad catalizada por la enzima, en donde el primer dígito indica el grupo principal al que pertenece la enzima, el segundo indica la subclase, el tercero la sub-subclase y el último indica un número seriado de la enzima dentro de la sub-subclase (Garcia-Carreño *et al*, 1997a).

I.3.3 Proteasas

En el tracto digestivo de los camarones las proteínas son hidrolizadas para obtener los aminoácidos que las conforman, este proceso se realiza rápidamente debido a la intervención de las enzimas proteolíticas o proteasas, que catalizan reacciones específicas, sin ellas el proceso sería sumamente lento.

En la clasificación de las proteasas el nombre sistemático es "péptido hidrolasas" y el primer dígito es el 3, ya que están comprendidas dentro de las Hidrolasas.

El segundo dígito en la clasificación EC indica el tipo de enlace hidrolizado: (1) ester, (2) glucosílico, (3) eter, (4) péptido, (5) enlace C-N, que no sea de péptido. Para las proteasas el segundo dígito es 4.

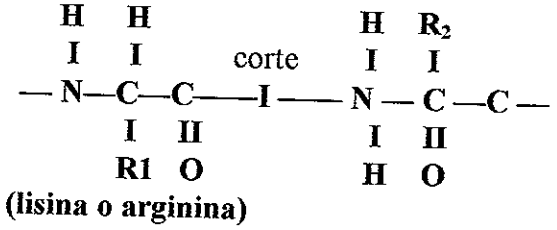
El tercer dígito para proteasas es: 11-19, para las enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos entre aminoácidos, en los grupos amino y carboxílico de los extremos de la proteína,

comúnmente se les denomina peptidasas; 21-24, para las enizmas que hidrolizan enlaces peptídicos internos, se conocen como proteinasas. Entre estas últimas se encuentran las que posiblemente más se han estudiado, la **tripsina** y la **quimotripsina** entre otras. (Gonzalez, 1981).

I.3.3.1 Tripsina

En organismos con un páncreas bien definido la tripsina es una enzima que es generada a partir de un elemento precursor no activo secretado por el páncreas, conocido como tripsinógeno. Este se activa por una acción autolítica (Walsh and Wilcox, 1970).

La tripsina hidroliza las proteinas, básicamente rompiendo el enlace peptídico, en donde el grupo carbonilo (C=O) es donado por lisina o arginina, sin importar la longitud de la cadena o secuencia de aminoácidos (Lehninger, 1975).



La tripsina que se encuentra en mamíferos tiene un peso molecular de 23,000 daltons (d), pH de actividad 7.0-9.0 y una temperatura de actividad de 37 °C (Gonzalez, 1981).

En ***Haliotis fulgens*** Hernández-Santoyo (1998), encontró dos enzimas tipo tripsina con peso molecular de 29,500 y 32,000 d, con puntos isoeléctricos de 3.6 y 4.0 respectivamente. Enzimas tipo tripsina y quimotripsina son las proteasas más abundantes en el sistema digestivo de organismos acuáticos (Hernández-Cortés, P. *et al.*, 1997).

I.3.3.2 Quimotripsina

La quimotripsina en mamíferos tiene un peso molecular de 25,300 d. pH de actividad 7.0-9.0 y temperatura de actividad de 37 °C (Gonzalez, 1981).

La quimotripsina 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.

En el pasado se pensaba que esta enzima no existía en los crustáceos, hoy se sabe que esto es incorrecto, Garcia-Carreño *et al.* (1994a), demostró que puede ser detectada en extractos de hepatopáncreas de langostilla (*Pleuroncodes planipes*).

En el hepatopáncreas de *Penaeus vannamei* se encontró quimotripsina con un peso molecular de 33,200 d y pI de 3.1 (Hernández-Cortés *et al.*, 1997).

En el abulón ***Haliotis fulgens*** se encontró una enzima tipo quimotripsina con peso molecular de 28,100 d y p.I. 6.3 (Hernández-Santoyo *et al.*, 1998).

I.3.3.3 Carboxipeptidasa A

La carboxipeptidasa A es una exopeptidasa que hidroliza la unión peptídica del carbón terminal de una cadena de polipéptidos

CPA

$$\mathbf{R\text{-}CONH\text{-}CHR'COOH + H_2O \quad \text{----} \quad R\text{-}COOH + H_2NCHR}$$

Esta enzima actúa preferentemente sobre el carbón terminal que tiene aminoácidos aromáticos o cadenas laterales.

La unidad de esta enzima es definida como: la cantidad de enzima que hidroliza un micromol

de hippuril-L-fenilalanina minuto^{-1} a pH 7.5 y 25 °C

En bovinos la carboxipeptidasa A se deriva de un zimógeno trimérico activado por tripsina. Tiene un peso molecular de 35,268, un pH óptimo 7-9 y contiene un átomo de zinc por molécula, que cuando se sustituye por otros metales, la carboxipeptidasa no presenta actividad, Rosenberg *et al.* (1975a y b).

I.3.3.4 Carboxipeptidasa B

La carboxipeptidasa B extraida de porcinos es una exopeptidasa con peso molecular de 34,300 (folk *et al.*, 1960), actúa sobre la únion peptídica de los aminoácidos **lisina, arginina y ornitina.** La hidrólisis ocurre en la unión peptídica del carbón terminal en estos polipéptidos.

CPB

Péptido-L-lisina + H_2O ------- Péptido + L-lisina

La carboxipeptidasa B presenta una actividad minima sobre los sustratos específicos de la carboxipeptidasa A.

La unidad de esta enzima es definida como: la cantidad de enzima que hidroliza un micromol de hippuril –L-arginina / minuto a pH 7.65 y. 25 °C.

I.4 JUSTIFICACIÓN

El estudio de los organismos vivos incluye el conocimiento de la estructura y función de las

moleculas que se encuentran en ellos y de los procesos por medio de los cuales estas moleculas son sintetizadas y degradadas. El proceso de la digestión se realiza con la intervención de enzimas, y en el camarón *Penaeus vannamei* este proceso no ha sido completamente estudiado, y es necesario caracterizar las enzimas que intervienen en el mismo y determinar como estimular su producción o inhibición. Ezquerra *et al.*, 1997 señala que las condiciones del cultivo pueden influenciar la cantidad y el tipo de enzimas que pueden afectar la calidad del camarón después de la cosecha por lo que es necesario conocer la composición de las proteasas en animales cultivados con diferentes dietas.

I.5 OBJETIVO

Determinar si el origen de los macronutrientes, específicamente de proteina, es un factor importante en la inducción de enzimas digestivas.

II MATERIALES Y MÉTODOS :

II.1 Sistema experimental

Para estudiar la inducción de enzimas en *Penaeus vannamei* se llevaron a cabo dos bioensayos en el laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, CICESE, con duración de 15 dias cada uno. Se utilizaron camarones cultivados en el otoño de 1998, por el M. C. Manuel Acosta R., en una Aquacelda Experimental ubicada en Rancho Bravo, ejido de Maneadero la cual fue construida en un area de 25 X 8 m, cubierta con un domo de plástico. El sistema

consistía de un canal de 2 m de ancho en forma elipsoide, con un sistema semi-cerrado de agua de mar en flujo continuo y area total de 100 m^2. De este canal se obtuvo un grupo de 120 camarones y se instaláron en ocho acuarios de fibra de vidrio de 0.75 X 0.75 X 0.2 m. Todos los acuarios se conectaron a un circuito semi-cerrado de recirculación de agua de mar filtrada Fig 3, que se mantuvo a 28 ‰ de salinidad y temperatura de 28 °C con un calentador sumergible de 1000 watts. En este sistema habia un volumen total de 1500 litros de agua con un recambio de agua de mar fresca del 30% dos veces a la semana. Además a cada acuario se le instaló un difusor de aire y un calentador de 40 watts para mantener las mismas condiciones cuando se detenía la recirculación del agua para mantenimiento de los filtros.

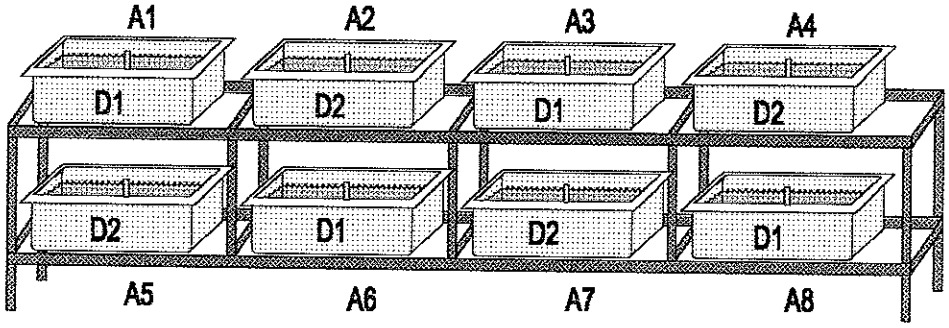


Fig 3 Distribución de acuarios A1, A2, ..., A8 y dietas proporcionadas. Dieta 1 (Vegetal), a los acuarios 1, 3, 6 y 8. Dieta 2 (Animal), a los acuarios 2, 4, 5 y 7.

II.2 Dietas

Para determinar si la composición de el alimento permite la inducción de enzimas en el hepatopáncreas o tiene influencia en la actividad de las mismas, se utilizaron dos dietas; **Dieta 1 (vegetal)**: Se preparó en el Laboratorio de Nutrición del CICESE, con proteina de origen vegetal, Tabla I. **Dieta 2 (animal):** Alimento comercial, que incluye en su composición principalmente proteina de origen animal

Tabla I. Composición de la **Dieta 1 (vegetal)**

DIETA 1	
INGREDIENTES	%
Gluten de Trigo	8.1
Pasta de soya	25.5
Harina de trigo	49.7
Spirulina	2.7
Lecitina liquida	3.9
NaH_2PO_4	5.5
Metionina	0.1
Mezcla vitamínica	0.2
Colesterol	0.0
Aceite de ajonjoli	3.7
TOTAL	100

Composición proximal: Proteína cruda 30.14 %, lipidos 10.37%, fibra cruda 2.59%, ceniza 9.13%, Fósforo 1.33%.

Composición de la Dieta 2 (animal): Granos procesados, calamar seco, aceite de pescado, lecitina de soya.. **Vitaminas:** C, biotina, cloruro de colina, ácido fólico, niacina, ácido pantotenoico, piridoxina, riboflavina, tiamina, B12, A, D3, E, K3. **Sales:** sulfato de cobre, sulfato de potasio, fosfato de sodio, ioduro de potasio, cloruro de sodio, sulfato de zinc, ethoxyquina, ácido propiónico, ácido sorbico. **Composición proximal:** Proteina cruda > 40%, lipidos > 8%, fibra cruda < 4%, ceniza <15 %, fósforo > 1%.

II.3 Organismos

En cada acuario se introdujeron 15 camarones seleccionados por talla en el rango 6-8.5 cm., todos los organismos fueron pesados, medidos y se mantuvieron durante 15 dias en los acuarios con temperatura de 28 °C y salinidad de 28 ‰, alimentándolos con el 10% del peso promedio de los 120 camarones al iniciar el experimento, dividido en dos raciones iguales que se les proporcionaron una en la mañana y otra en la tarde. Para simular un ritmo circadiano, los acuarios se cubrian con plástico negro durante la noche y se descubrian parcialmente durante el dia. Después de 15 dias todos los camarones fueron pesados, medidos y se les extrajo el hepatopáncreas, los cuales tambien se pesaron y se congelaron a –70 °C.

II.4 Preparación de extracto crudo de hepatopáncreas al 20%

A los 15 camarones de cada acuario se les extrajo el hepatopáncreas. El conjunto de cada acuario se pesó y se le agregó agua destilada en una relación 1:2 (peso:volumen). La muestra se homogenizó con un triturador de tejido *Tissue Tearor, modelo 985-370*, durante 15 segundos y se centrifugó durante 45 min a 500 X g, manteniendo 4°C, en una centrífuga

Hermle Z 360 K de National Labnet Company, para eliminar lípidos y sólidos en suspensión. Una alicuota del extracto diluida 1:5 con agua destilada, se utilizó para la determinación de actividad y concentración de proteina y el resto se congeló a –70 °C .

II.5 Determinación de proteina

La determinación de proteina se realizó con un kit de Sigma Diagnostics, Inc. basado en el método Micro-Lowry modificado por Peterson . La Fig 4 es la curva estándar que se obtuvo al iniciar las determinaciones.

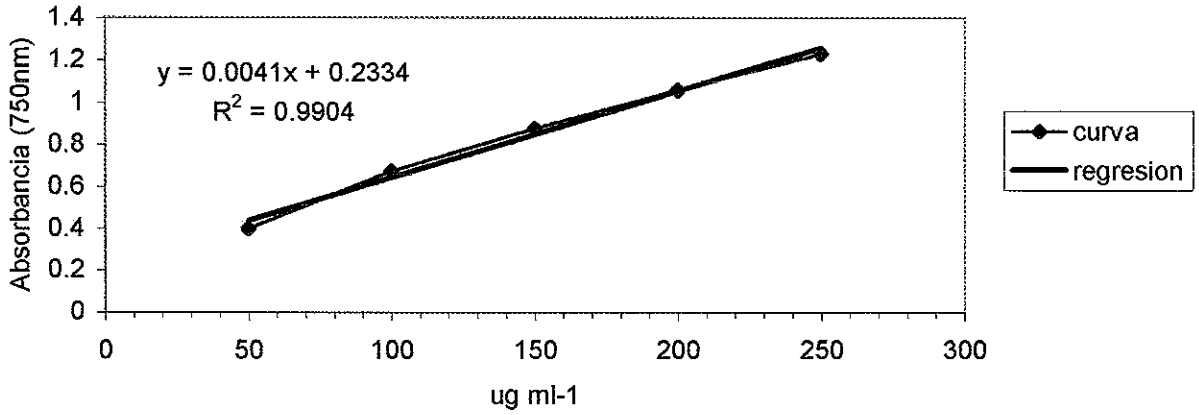


Fig 4. Curva estándar con albúmina de suero bovino para determinación de proteína.

II.6 Determinación de actividad proteolítica

Se realizaron mediciones de actividad proteolítica total utilizando el procedimiento de Garcia-Carreño *et al.*, 1997b. La mezcla de reacción tiene buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, azocaseina 1% diluida en el mismo buffer de reacción, extracto crudo de hepatopáncreas. La reacción se llevó a cabo por 10 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo de reacción esta se para con ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v). Las **muestras** se

prepararon utilizando: 500 µl de solución buffer, 20 µl de extracto crudo de hepatopáncreas, 500 µl de sustrato (azocaseína 1%), la mezcla se incubó 10 minutos a temperatura ambiental, después se agregaron 500 µl de TCA, se mantuvo 10 minutos a 4 °C y se centrifugó a 16,000 g durante 5 minutos. El sobrenadante se utilizó para leer a una absorbancia de 366 nm en un espectrofotómetro *Ultrospec 2000 UV/Visible, Pharmacia Biotech*, el control para cada reacción se preparó de la misma manera sólo que el TCA se agregó a tiempo cero, para parar la reacción.

Las unidades de actividad se determinaron mediante la fórmula:

$$\text{Actividad Proteolítica Total} = (\text{Abs muestra} - \text{Abs control})\ \text{min}^{-1}\ \text{mg}^{-1}$$

II.7 Determinación de actividad carboxipeptidasa A

La actividad de esta enzima se evaluó utilizando 1mM hippuril-L-Phe (HPA) en 50 mM de solución amortiguadora TRIS-HCL, pH 7.5, conteniendo 500 mM NaCl y LiCl al 10%. Al sustrato (2.0 ml) se le agregó 20 µl del extracto crudo. La hidrólisis se registró como incremento de la absorbancia a 254 nm. La lectura se tomó a intervalos de tres segundos, durante cinco minutos a temperatura ambiente (García-Carreño *et al.* 1994).

La unidad de actividad para la carboxipeptidasa A se definió como µmol de ácido hippurico liberado por minuto.

Actividad Carboxipeptidasa A (U mg^{-1} proteína) = $\Delta\ Abs_{254}$ / (min 0.36* mg de enzima ml de mezcla de reacción).

*(0.36 = coeficiente de absorción molar)

II.8 Determinación de actividad carboxipeptidasa B

La actividad se evaluó utilizando 1mM hippuril-L-Arg (HA) en 50 mM de solución amortiguadora Tris, pH 7.5, con 100 mM de NaCl. La solución sustrato (2.0 ml) se mezcló con 20 µl del extracto crudo. El incremento de la absorbancia a 254 nm a causa de la hidrólisis del sustrato, se registró a intervalos de tres segundos durante cinco minutos a temperatura ambiente (García-Carreño *et al.* 1994).

La unidad de actividad para la carboxipeptidasa A se definió como µmol de ácido hippurico liberado por minuto.

Actividad Carboxipeptidasa B (U mg^{-1} proteína) = Δ Abs_{254} / (min 0.36* mg de enzima ml de mezcla de reacción).

*(0.36 = coeficiente de absorción molar).

II.9 Determinación de Actividad Quimotripsina

La actividad de la quimotripsina se determinó utilizando 20 µl de extracto crudo, que fueron ensayados sobre 2 ml de solución Succinil-$(Ala)_2$-Pro-Phe-*p*-nitroanilide (SAPNA) a 0.01 mM en HCl 0.1 M Tris, pH 7.8, conteniendo $CaCl_2$ 0.01 M . La Absorbancia se registró a intervalos de tres segundos durante cinco minutos a 410 nm (García-Carreño *et al.* 1994).

La unidad de actividad para la quimotripsina se definió como µmol de nitroanilina liberada

por minuto.

Actividad Quimotripsina (U mg^{-1} proteína) = Δ Abs_{410} min^{-1} mg^{-1} 1000 / 8800

Donde 8800 es el coeficiente de extinción de *p*-nitroanilina

II.10 Purificación de enzimas proteolíticas

Se realizó una etapa de purificación parcial por precipitación con sulfato de amonio. Esta técnica permite la deshidratación en el microambiente de la molecula de proteina, uniendo una gran cantidad de moléculas de agua con el ion sulfato (SO_4^{2-}), reduciendo asi la cantidad de agua disponible para mantener en solución las moléculas de proteína provocando la precipitación de las mismas. Para cada dieta se ensayaron tres porcentajes de saturación con sulfato de amonio: 40%, 60% y 80%. Los extractos de los dos bioensayos se unieron en un vaso de precipitados (uno para cada dieta), y en un baño de agua con hielo y sobre un agitador magnético se añadió lentamente sulfato de amonio, hasta llegar a una concentración de 40% de acuerdo a la Tabla II, la solución permaneció en el agitador durante 30 minutos después de añadido el sulfato de amonio, posteriormente se centrifugó a 10,000 X g durante 10 minutos, el sobrenadante se colectó, se determinó el volumen y se le añadió más sulfato de amonio para subir la concentración al 60%. El precipitado se resuspendió con agua y se congeló. El procedimiento se repitió y al sobrenadante de 60% se le añadió sulfato de amonio hasta llegar a 80% de concentración. A los precipitados de 40, 60 y 80% se les determinó actividad proteolítica total, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B y quimiotripsina con los métodos descritos anteriormente.

Tabla II. Porcentaje final de saturación de sulfato de amonio

	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
% inicial	**Gramos de sulfato de amonio solido para añadir a un L de solución**																
0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
45									32	65	9*9	134	171	210	250	339	431
50										33	66	101	137	176	214	302	392
55											33	67	103	141	179	264	353
60												34	69	105	143	227	314
65													34	70	107	190	275
70														35	72	153	237
75															36	115	198
80																77	157
90																	79

Tomado de; **Rosenberg I. M.** 1996. Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques. ed. Birkhauser, Boston.

II.11 Etapa de purificación en Sephadex G25

Los precipitados resuspendidos que se obtuvieron con las concentraciones de amonio al 40% y 60% se mezclaron y se filtraron a través de una columna de 9.5 cm de Sephadex G25 que se preparó con 7.24 gr de polvo de Sephadex G25 y 35 ml de solución buffer pH 7.8 El filtrado se recolectó en viales eppendorf numerados conteniendo una fracción de 20 gotas cada uno. Con un espectrofotómetro se determinó la presencia o ausencia de proteina en cada una de las fracciones leyendo en un espectrofotómetro *Ely-2000, ELyPTICA* la absorbancia a 260 y 280 nm

II.12 Efecto de la temperatura sobre la Actividad Proteolítica Total

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica, se les determinó la actividad proteolítica total a 20°C con el método ya descrito pero deteniendo la actividad enzimática cada 30 segundos con TCA, durante 10 minutos. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro *Ely-2000, ELyPTICA*. El procedimiento se repitió a las temperaturas; 40, 45, 50, 60 y 70°C., deteniendo la reacción cada 30 segundos durante 6 minutos.

II.13 Determinación de la estabilidad térmica de la Actividad Proteolítica.

Para determinar la estabilidad térmica de la actividad proteolítica, se prepararon muestras con 20 µl de extracto crudo de hepatopáncreas en 500 µl de solución buffer pH 7.5. Se mantuvieron a 40°C en un "baño maria", durante cinco diferentes periodos; 20, 40, 60, 80 y 100 minutos. Al final de cada periodo se determinó la actividad proteolítica remanente. El

mismo procedimiento se repitió para las temperaturas de 50 y 60°C.

II.14 Análisis estadístico

El análisis de todos los datos se realizó en hoja de cálculo electrónico Excel 97 y con el paquete estadistico para computadora Sigma Stat, versión 1.01 y de acuerdo con los procedimientos de Zar, 1980.

III RESULTADOS

III.1 Morfometría

La talla longitudinal al final de los bioensayos 1 y 2, fue mayor que la talla inicial en los ocho acuarios de experimentación, es decir para ambas dietas ($P<0.05$) Figs. 5 y 6. La diferencia fue mayor (bioensayo 1 = 1.33 cm, bioensayo 2 = 1.59 cm) en los grupos alimentados con la Dieta 2 ($P<0.05$) Tabla III, que con la Dieta 1 (bioensayo 1 = 0.75 cm, bioensayo 2 = 0.99 cm). El crecimiento de los camarones alimentados con la Dieta 1 fue similar en los cuatro acuarios, numerados como 1, 3, 6 y 8. El análisis de la varianza ANVA indica que no hubo una diferencia significativa de crecimiento ($P>0.05$). El ANVA aplicado a los camarones alimentados con la Dieta 2, tampoco indica una diferencia significativa ($P>0.05$) entre los acuarios numerados: 2, 4, 5 y 7.

El ANVA sobre el peso de los camarones al inicio y al final de los bioensayos 1 y 2, señala que con ambas dietas los camarones tuvieron un incremento significativo ($P<0.05$) Figs. 7 y 8. La diferencia en peso fue mayor en los grupos alimentados con la Dieta 2 ($P<0.05$), bioensayo 1 = 1.45 g, bioensayo 2 = 1.69 g, comparado con los camarones alimentados con la Dieta vegetal, bioensayo 1 = 0.42 g, bioensayo 2 = 0.82, Tabla IV. El incremento de peso en los camarones alimentados con la Dieta 1, fue similar en las cuatro réplicas, acuarios: 1, 3, 6 y 8 ($P>0.05$). Tampoco se detectó una diferencia en el incremento de peso entre los acuarios: 2, 4, 5 y 7 alimentados con la Dieta 2 ($P>0.05$).

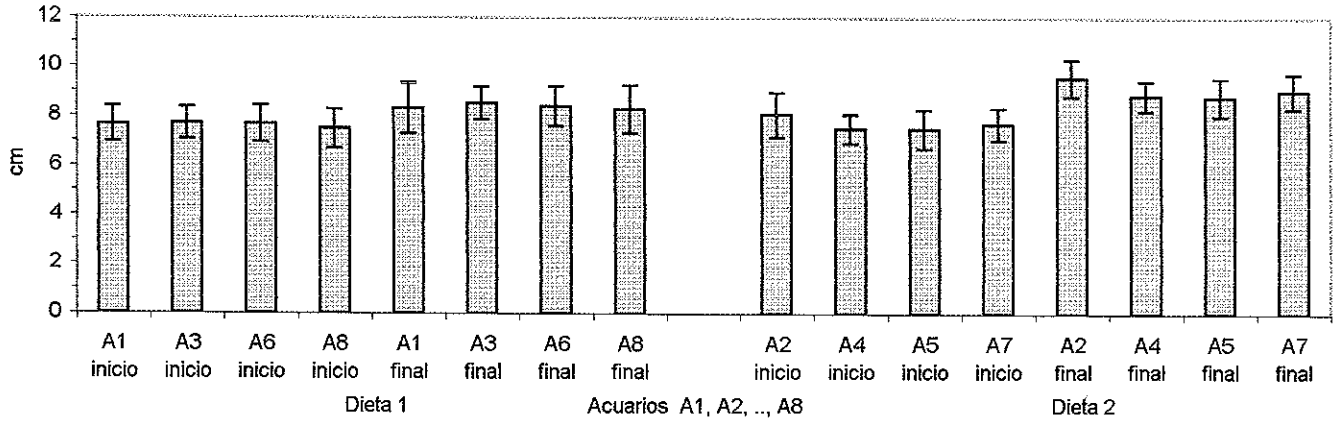


Fig 5. Comparación en cada acuario del promedio de talla longitudinal al inicio y al término del bioensayo 1. La diferencia fue significativa (P<0.05).

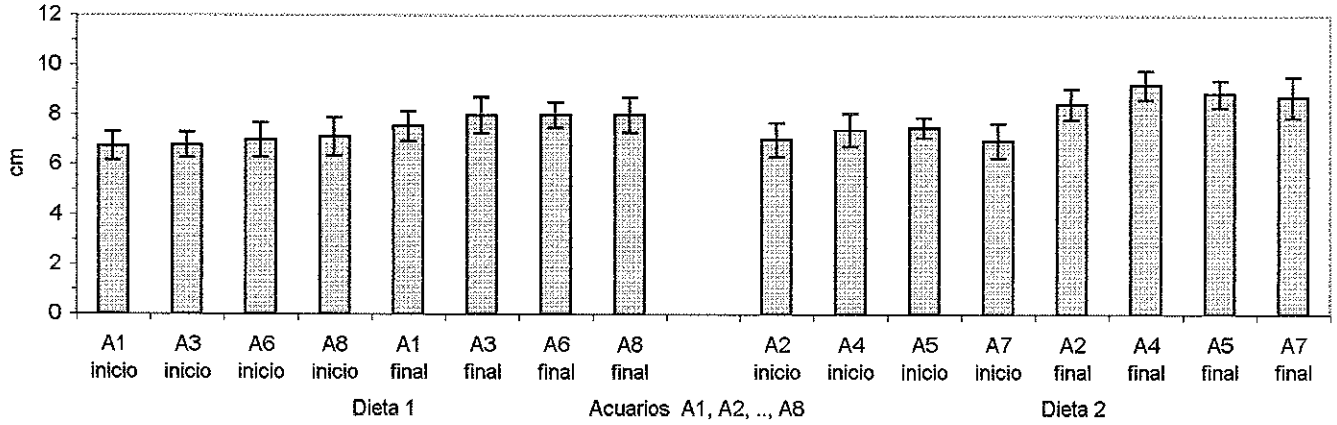


Fig 6. Comparación en cada acuario del promedio de talla al inicio y al término del bioensayo 2. La diferencia fue significativa (P<0.05).

Tabla III. Talla longitudinal de los camarones *Penaeus vannamei* alimentados con las Dietas 1 y 2, al inicio y final de los bioensayos 1 y 2.

	TALLA LONGITUDINAL (cm)			
	DIETA 1		DIETA 2	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Bioensayo 1	7.61±0.71	8.36±0.83	7.65±0.75	8.98±0.74
Bioensayo 2	6.88±0.64	7.87±0.64	7.21±0.66	8.80±0.67

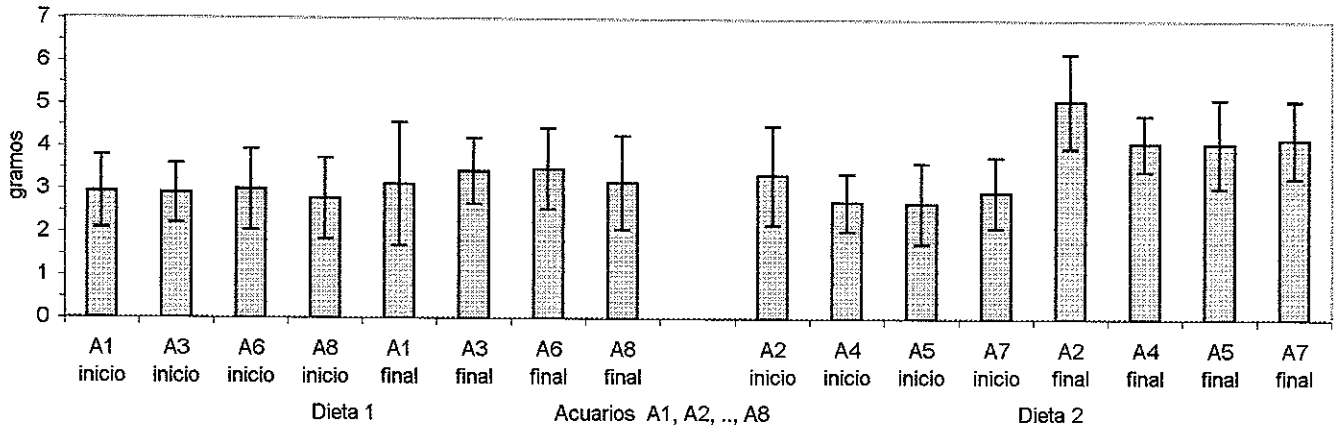


Fig 7. Comparación en cada acuario del promedio de peso al inicio y al término del bioensayo 1. La diferencia fue significativa (P<0.05).

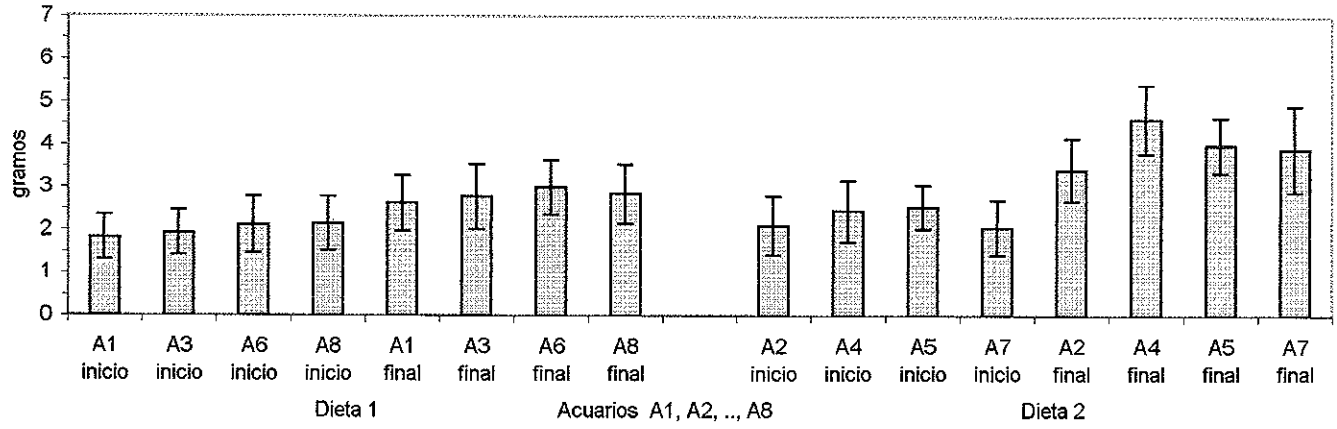


Fig 8. Comparación en cada acuario del promedio de peso al inicio y al término del bioensayo 2. La diferencia fue significativa (P<0.05).

Tabla IV. Peso promedio de los camarones *Penaeus vannamei* alimentados con las Dietas 1 y 2, al inicio y final de los bioensayos 1 y 2.

	PESO (gramos)			
	DIETA 1		DIETA 2	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Bioensayo 1	2.91±0.84	3.33±1.04	2.94±0.93	4.39±1.00
Bioensayo 2	2.00±0.58	2.82±0.68	2.29±0.66	3.98±0.89

III.2 Actividad enzimática

III.2.1 Actividad Proteolítica Total

La concentración de proteina mg/ml en los extractos crudos de hepatopáncreas, en los dos bioensayos se presenta en la Tabla V. La actividad de los extractos sobre azocaseina no presentó diferencia (P>0.05) entre los grupos alimentados con las Dietas 1 y 2, en los dos bioensayos, Tabla VI.

Tabla V. Promedio de concentración de proteina en los extractos crudos de hepatopáncreas en los bioensayos 1 y 2.

	Proteina en extractos (mg/ml)	
	DIETA 1	DIETA 2
Bioensayo 1	0.137±0.012	0.141±0.012
Bioensayo 2	0.138±0.006	0.131±0.008

Tabla VI. Promedio de Actividad Proteolítica Total sobre azocaseina de los extractos crudos de hepatopáncreas en los bioensayos 1 y 2.

	Actividad Proteolítica Total ($U\ mg^{-1}$ proteína)	
	DIETA 1	DIETA 2
Bioensayo 1	14.570±0.999	14.834±1.911
Bioensayo 2	13.628±1.650	14.408±1.775

III.2.2 Actividad Carboxipeptidasa A

En los dos bioensayos, la actividad del extracto crudo de hepatopáncreas sobre hippuril-L-Phe no presentó diferencia entre los grupos alimentados con las Dietas 1 y 2 (P>0.05). Los

datos obtenidos en el segundo bioensayo no cumplieron con la condición de homogeneidad de varianzas (homosedasticidad) requerida para realizar el análisis paramétrico, por lo que se utilizó la prueba de Mann-Whitney para determinar si habia diferencia entre medias, Figs. 9, 10 y Tabla VII

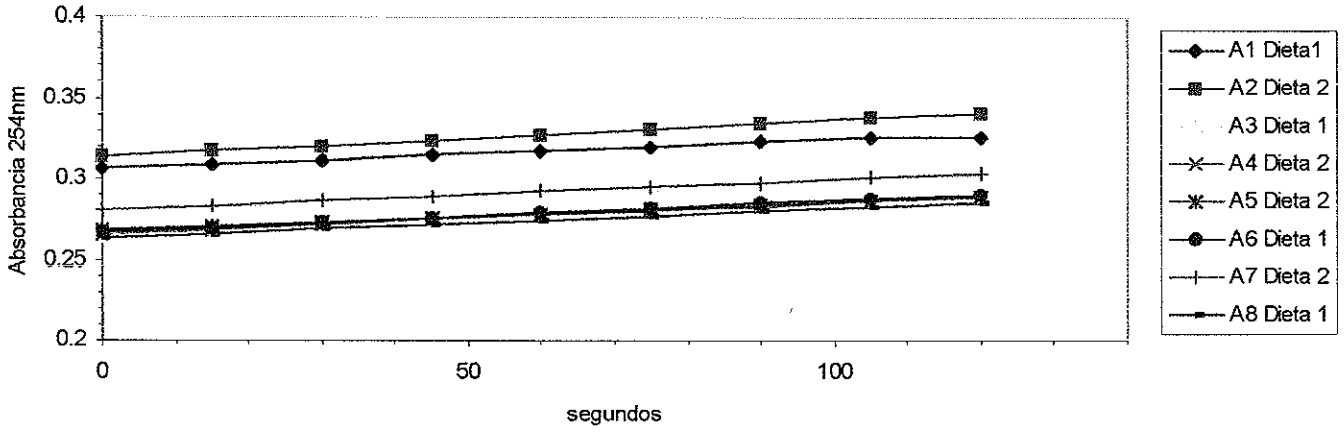


Fig. 9 Cinética de la Carboxipeptidasa A del extracto crudo de hepatopáncreas. Bioensayo 1.

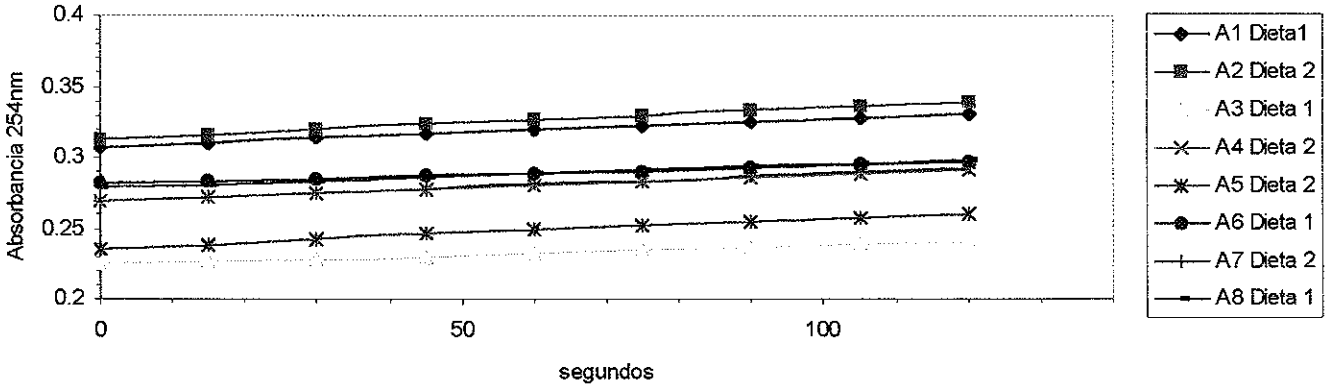


Fig 10. Cinética de la Carboxipeptidasa A de extracto crudo de hepatopáncreas. Bioensayo 2.

Tabla VII. Actividad Carboxipeptidasa A de el extracto crudo de hepatopáncreas en los bioensayos 1 y 2.

	Actividad Carboxipeptidasa A (U mg^{-1} proteína)		
	Dieta 1	Dieta 2	Diferencia
Bioensayo 1	23.76±0.85	23.64±1.87	No
Bioensayo 2	19.38±4.32	26.27±1.74	No K-W

III.2.3 Actividad Carboxipeptidasa B

En los dos bioensayos, la actividad del extracto crudo de hepatopáncreas sobre hippuril-L-Arg no presentó diferencia entre los grupos alimentados con las Dietas 1 y 2 ($P>0.05$), Figs. 11, 12 y Tabla VIII.

III.2.4 Actividad quimotrípsina

En el primer bioensayo la actividad quimotrípsica fue mayor en la dieta vegetal ($P<0.05$). En el segundo bioensayo la actividad fue igual para ambas dietas ($P>0.05$), Figs. 13, 14 y Tabla IX.

III.3 Purificación de proteasas

La fracción con 80% de sulfato de amonio presentó las actividades más bajas. Las fracciones con 40% y 60% presentaron actividades similares y mayores que la fracción con 80%, Figs. 15, 16, 17, 18 y Tabla X.

III.4 Efecto de la temperatura sobre la Actividad Proteolítica Total

Después de mezclar las fracciones que precipitaron con 40% y 60% de sulfato de amonio se pasaron por una columna de Sephadex G25 y se colectó la mezcla en 30 viales eppendorf para cada dieta y con 20 gotas cada uno. A cada vial se le determinó la presencia de proteinas con un espectrofotómetro a 260 y 280 nm. Los viales numerados del 5 al 10 para cada Dieta, presentaron las lecturas mayores en el espectro (Fig 19), por

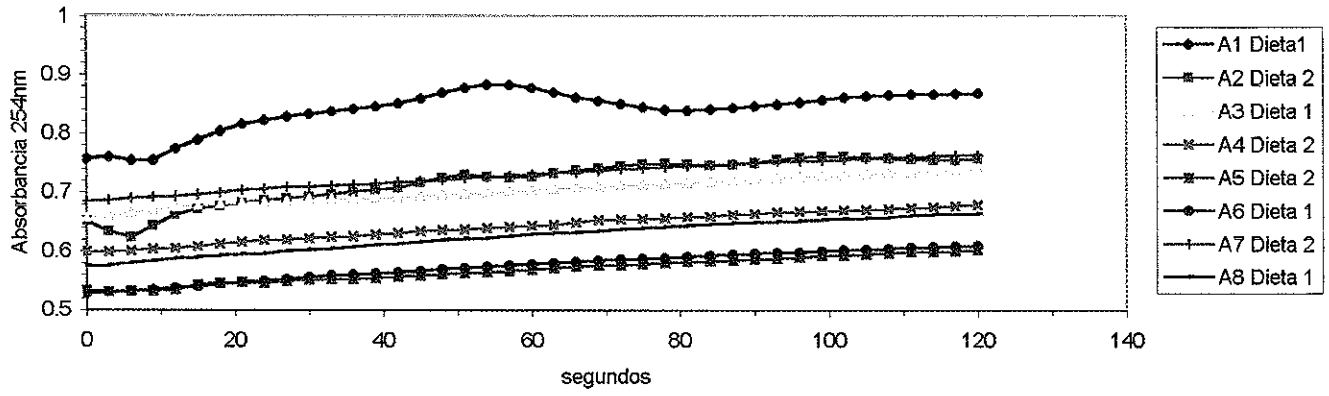


Fig. 11 Cinética de la Carboxipeptidasa B de extracto crudo de hepatopáncreas. Bioensayo 1.

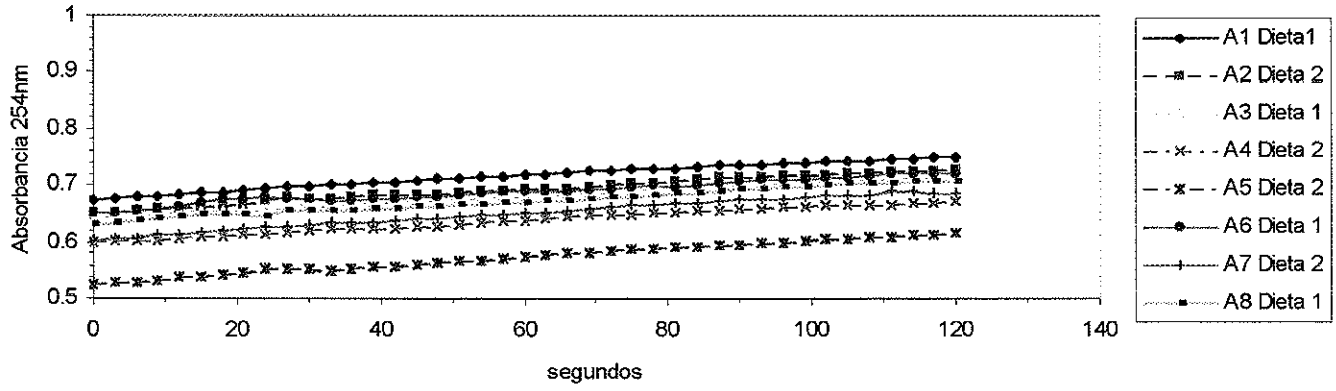


Fig. 12 Cinética de la Carboxipeptidasa B de extracto crudo de hepatopáncreas. Bioensayo 2.

Tabla VIII. Actividad Carboxipeptidasa B de el extracto crudo de hepatopáncreas, en los bioensayos 1 y 2.

	Actividad Carboxipeptidasa B ($U\ mg^{-1}$ proteína)		
	Dieta 1	Dieta 2	Diferencia
Bioensayo 1	88.87±13.71	90.33±20.64	No
Bioensayo 2	85.49±14.36	88.66±12.09	No

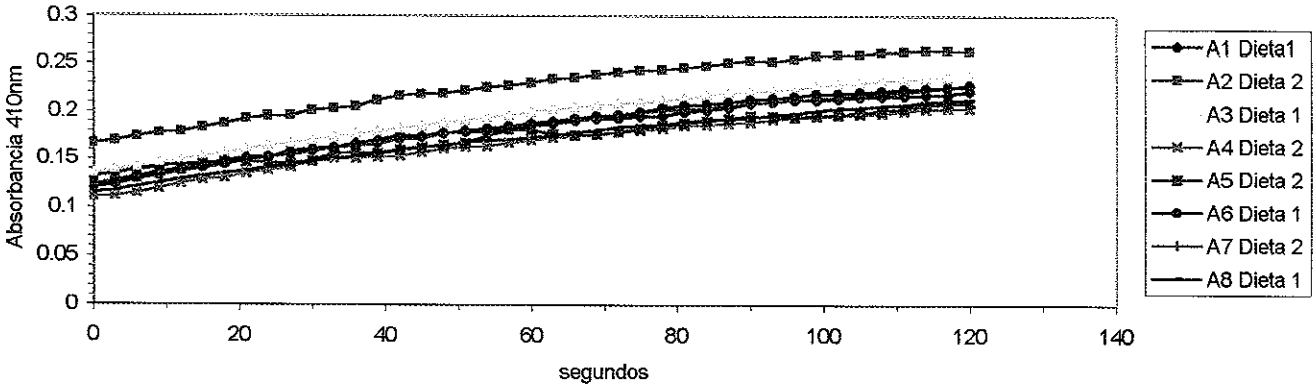


Fig 13. Cinética de la Quimotripsina de extracto crudo de hepatopáncreas. Bioensayo 1.

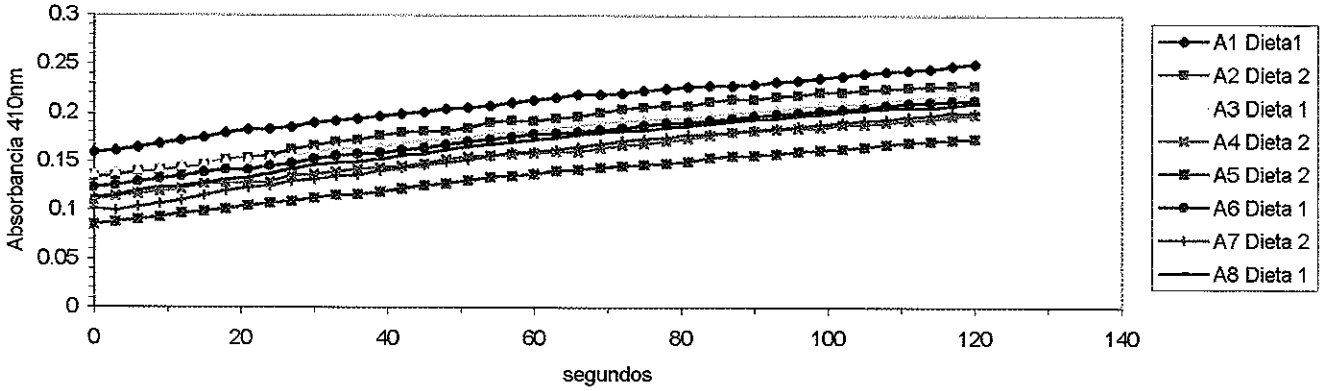


Fig 14. Cinética de la Quimotripsina de extracto crudo de hepatopáncreas. Bioensayo 2.

Tabla IX. Actividad Quimotripsina obtenida en las dos dietas ensayadas.

	Actividad Quimotripsina* (U mg^{-1} proteína)		
	Dieta 1	Dieta 2	Dif
Bioensayo 1	4.18±0.12	3.83±0.16	SI
Bioensayo 2	3.75±0.39	4.15±0.53	NO

*Actividad específica de la Quimotripsina con SAPNA (ΔAbs_{410nm})

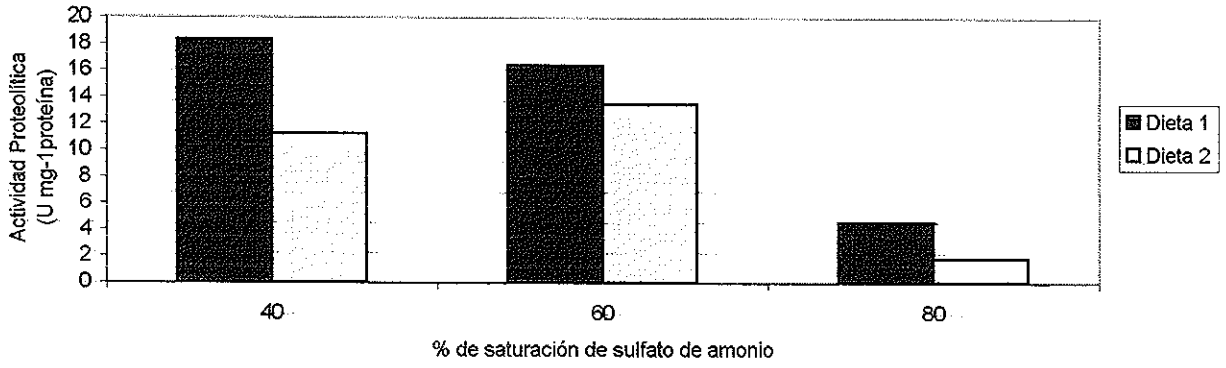


Fig 15 Actividad Proteolítica de las fracciones de extracto crudo de hepatopáncreas separadas con diferentes concentraciones de sulfato de amonio.

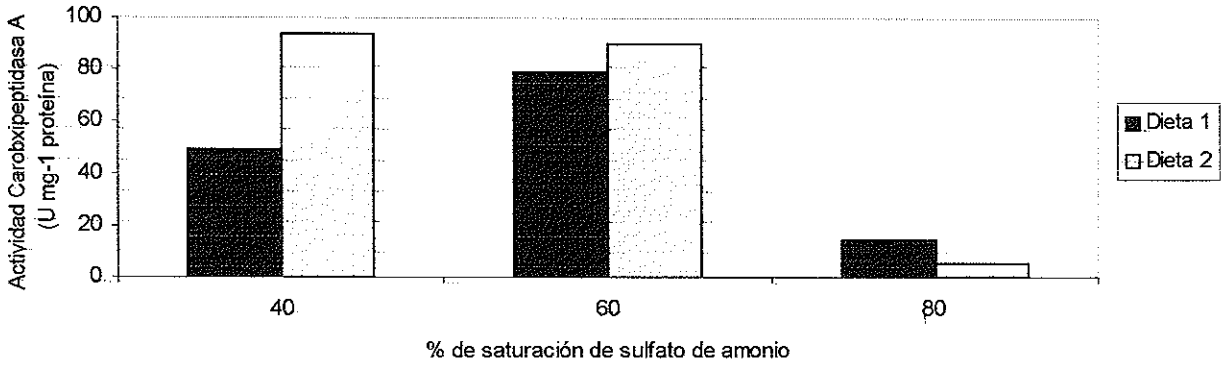


Fig 16 Actividad Carboxipeptidasa A de las fracciones de extracto crudo de hepatopáncreas separadas con diferentes concentraciones de sulfato de amonio.

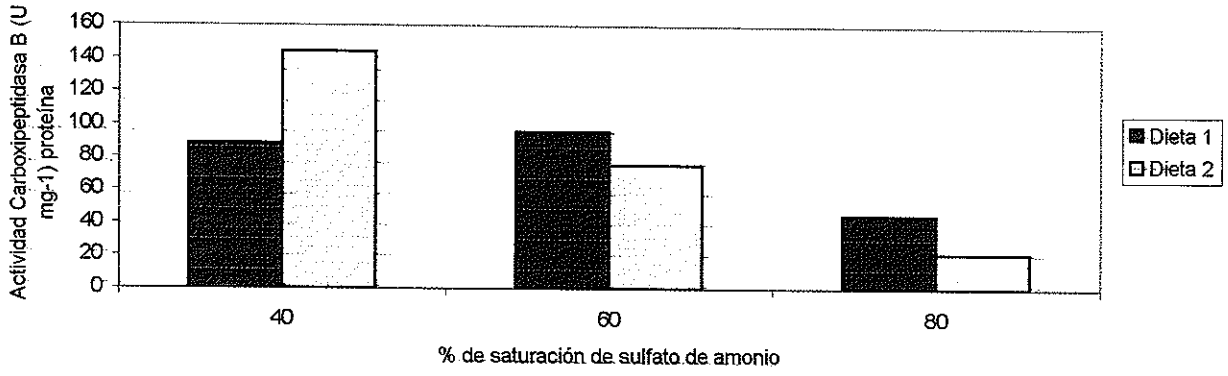


Fig 17 Actividad Carboxipeptidasa B de las fracciones de extracto crudo de hepatopáncreas separadas con diferentes concentraciones de sulfato de amonio.

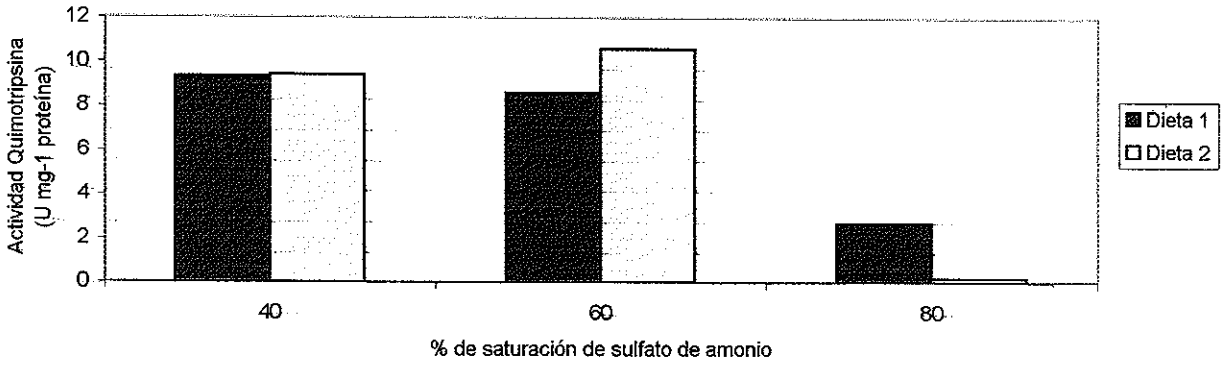


Fig 18 Actividad Quimotripsina de las fracciones de extracto crudo de hepatopáncreas separadas con diferentes concentraciones de sulfato de amonio.

Tabla X. Determinación de Actividad después de fraccionar los extractos crudos de hepatopáncreas de cada dieta con $(NH4)_2$ SO4 con tres porcentajes de saturación, 40%, 60% y 80%.

Dieta 1	Proteína Mg/ml	Actividad Proteolítica, U mg^{-1} proteína	Actividad Carboxipeptidasa A U mg^{-1} proteína	Actividad Carboxipeptidasa B U mg^{-1} proteína	Actividad Quimotripsina U mg^{-1} proteína
40%	0.125	18.4	49.6	87.802	9.34
60%	0.240	16.37	79.015	95.373	8.6
80%	0.088	4.55	14.55	44.40	2.69
Dieta 2					
40%	0.098	11.25	93.82	144.25	9.24
60%	0.152	13.50	90.16	75.01	10.6
80%	0.039	1.81	5.76	21.25	0.182

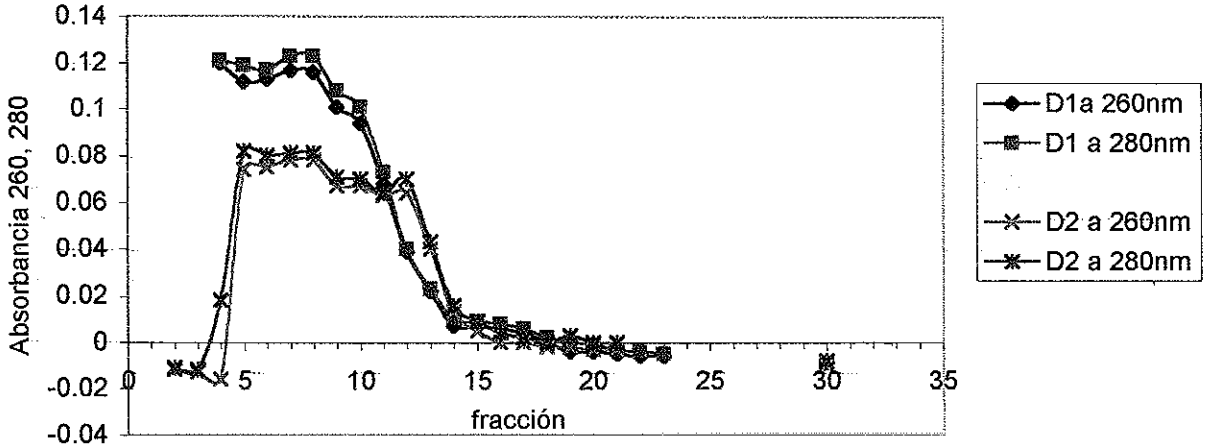


Fig 19. Determinación de proteína de las fracciones eluidas de la columna de Sephadex G25

lo que se separaron, mezclaron y se les determinó la actividad proteolítica. El cambio de Absorbancia 366 nm a 20°C min^{-1} fue de 0.042 para la D1 y 0.024 para D2. El Δ Abs_{366} a 40°C para la D1 fue 0.143 y para la D2 fue 0.091. El Δ Abs_{366} a 45°C para D1 fue 0.181, para D2 fue 0.131. El Δ Abs_{366} a 50°C para D1 fue 0.201, para D2 fue 0.141, El Δ Abs_{366} a 60°C fue 0.201, para D2 0.170. El Δ Abs_{366} a 70°C fue 0.015, para D2 0.007.

La actividad específica proteolítica incrementa al aumentar la temperatura hasta los 50°C en la Dieta 1 que llega a 197 U mg^{-1} proteína y hasta los 60°C a 239 U mg^{-1} proteína en la Dieta 2. A 70°C no hubo actividad proteolítica, Figs 20, 21,22, 23, 24, 25 y 26

III.5 Determinación de la Estabilidad Térmica de la Actividad Proteolítica Total a 40, 50 y 60°C

A 40°C la actividad se mantuvo estable en el tiempo hasta 100 minutos. A 50°C la actividad fue mayor que a 40°C pero disminuyendo paulatinamente al transcurrir el tiempo. A 60°C la actividad fue similar a la que se obtuvo a 50°C pero en este caso disminuyó rapidamente hasta llegar casi a nulificarse a los 100 minutos Fig. 27

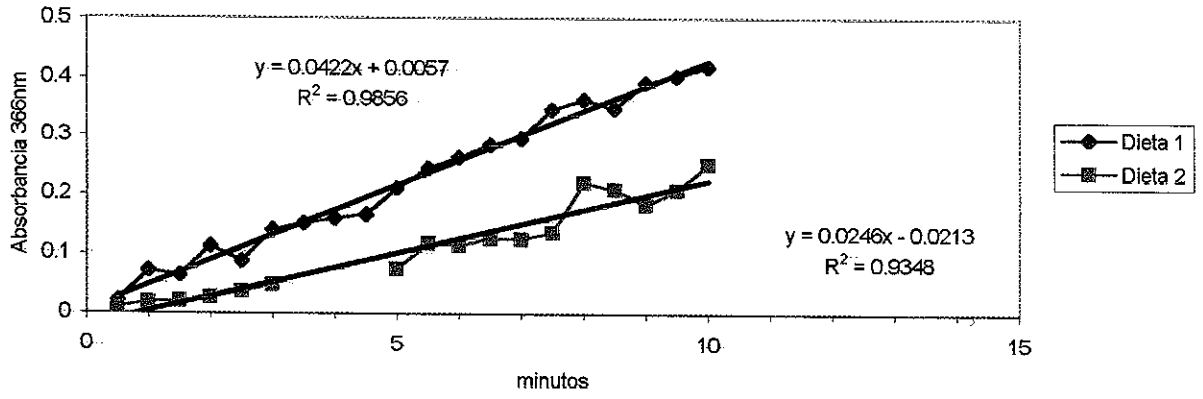


Fig 20. Cinética a 20 °C de la Actividad Proteolítica Total de extracto crudo de hepatopáncreas.

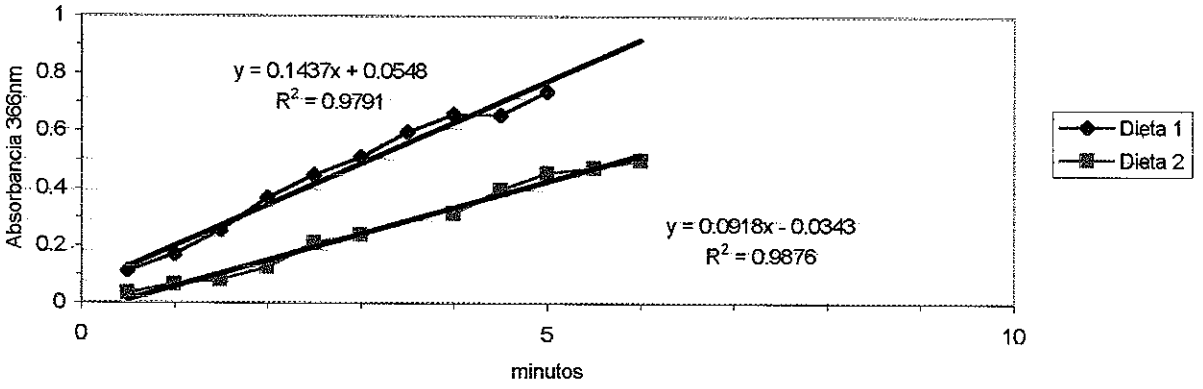


Fig 21. Cinética a 40 °C de la Actividad Proteolítica Total de extracto crudo de hepatopáncreas.

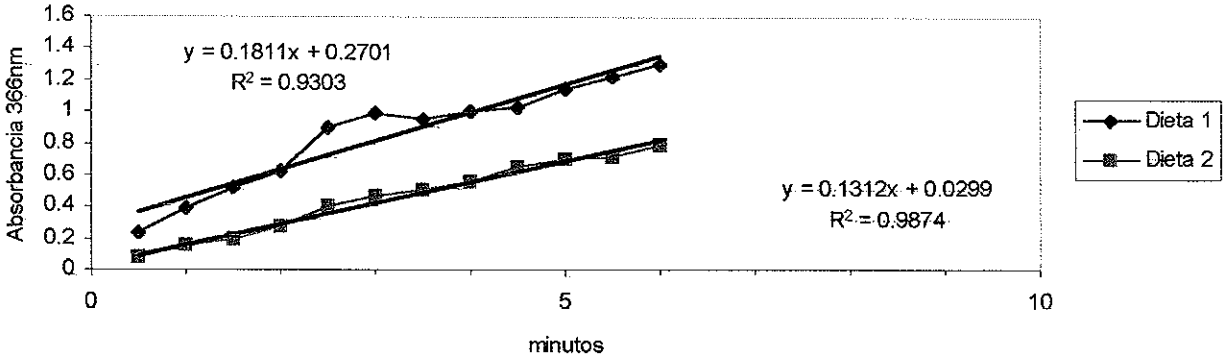


Fig 22. Cinética a 45 °C de la Actividad Proteolítica Total de extracto crudo de hepatopáncreas.

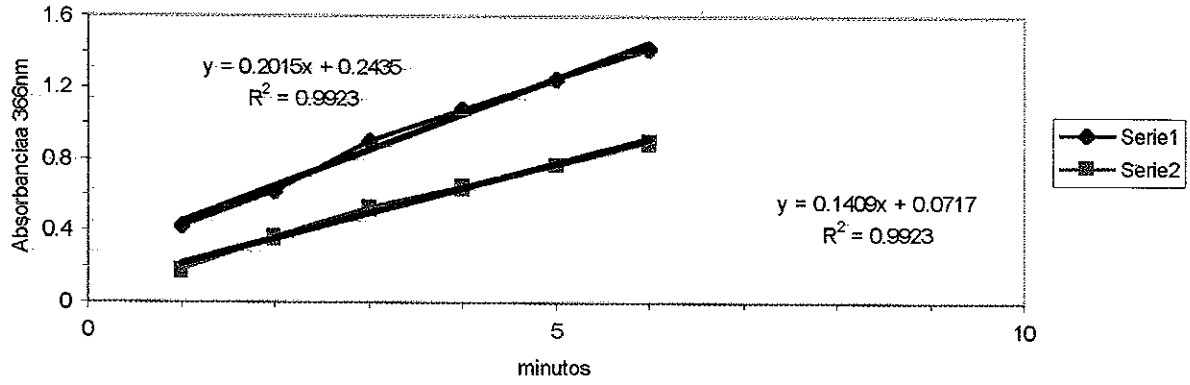


Fig 23. Cinética a 50 °C de la Actividad Proteolítica Total de extracto crudo de hepatopáncreas.

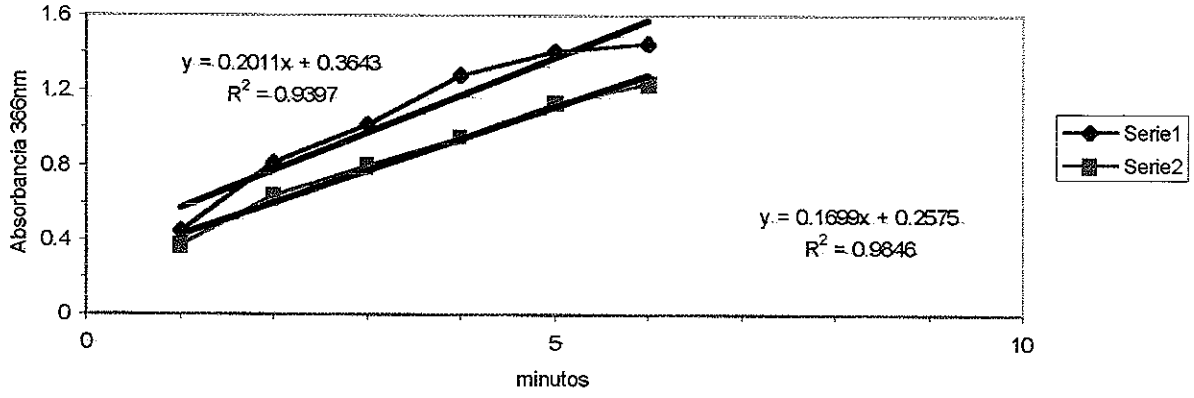


Fig 24. Cinética a 60 °C de la Actividad Proteolítica Total de extracto crudo de hepatopáncreas.

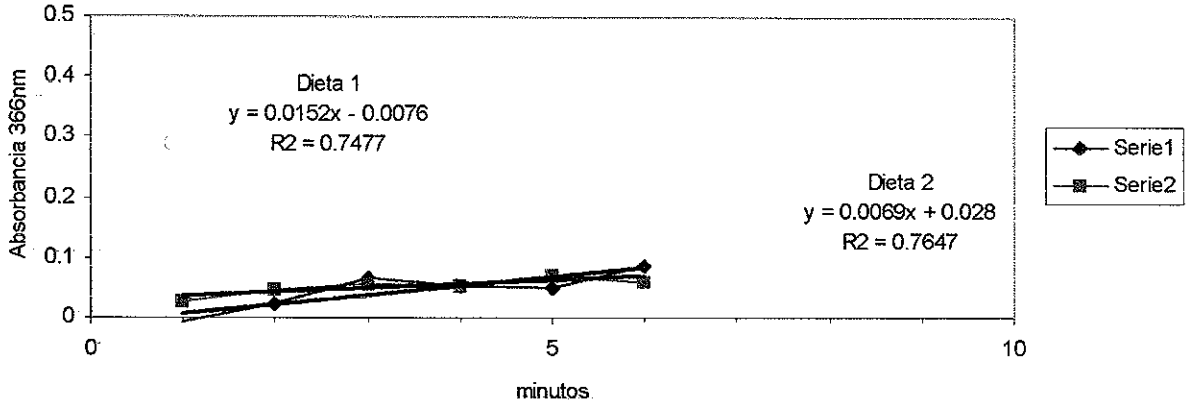


Fig 25. Cinética a 70 °C de la Actividad Proteolítica Total de extracto crudo de hepatopáncreas.

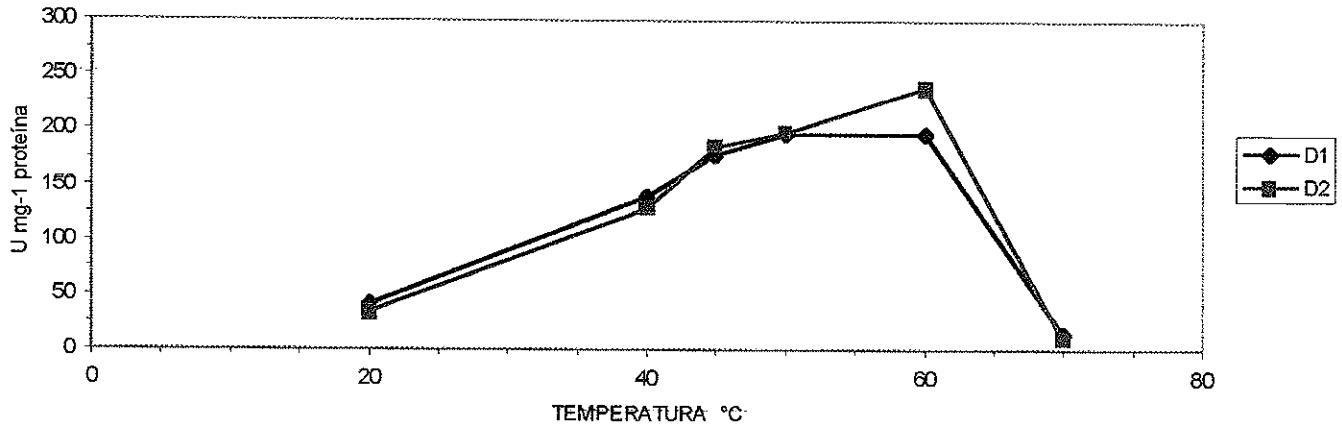


Fig 26 Efecto de la temperatura sobre la Actividad Proteolítica Total de extracto de hepatopáncreas a diferentes temperaturas

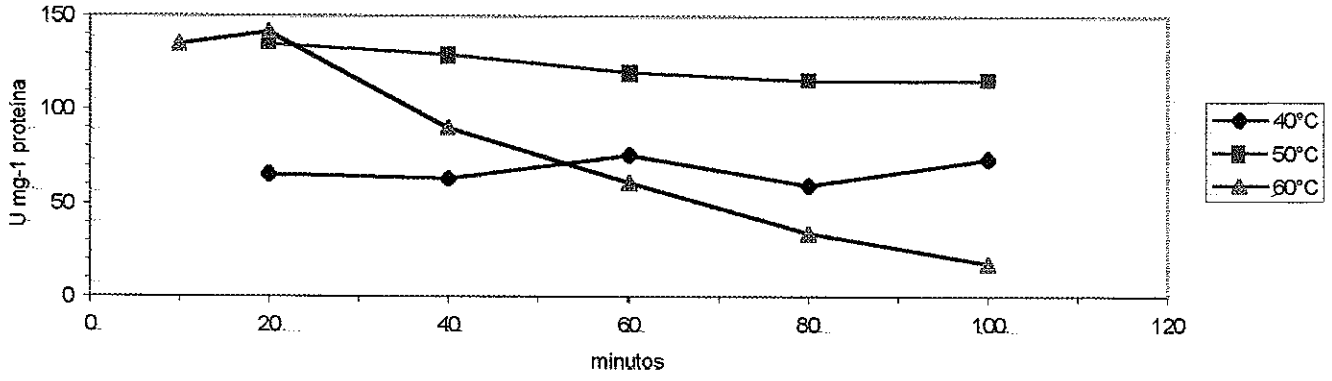


Fig 27 Estabilidad a diferentes temperaturas de la Actividad Proteolítica Total del extracto crudo de hepatopáncreas de los camarones alimentados con la Dieta 2.

IV DISCUSIÓN

Hay abundantes evidencias que señalan que la dieta puede ser usada para manipular la Actividad Enzimática en crustáceos, al menos durante los estadios larvales. En las últimas etapas larvales de peneidos, carideos y brachiuros, se observa una gran flexibilidad en la respuesta a dietas de diferente composición, especialmente en la Actividad Trípsica que se eleva cuando en la dieta las algas son substituidas por *Artemia*. En el medio natural los herbívoros presentan una alta tasa de ingestión de alimento y un tiempo corto de retención en el intestino, por lo que tienen una alta Actividad Enzimática, para poder extraer la proteína necesaria para propiciar el crecimiento, en las especies omnívoras y carnívoras hay en general, una menor Actividad Trípsica compensada con un mayor tiempo de retención del alimento, las larvas de estas especies, carecen de la capacidad de elevar el nivel de enzimas en respuesta a la dieta proporcionada (Jones, 1997).

No siempre un cambio en la Actividad Proteolítica es directamente atribuible a la dieta, la regulación endocrina o factores ambientales pueden modificarla. Biesiot, *et al.* (1990), reportan en larvas de *Homarus americanus* una disminución de la Actividad Proteolítica al llegar al estadio V, comparada con la que presenta en estadios anteriores. La causa de esta disminución es desconocida y se asume que puede deberse al cambio de hábitat de plancton a bentos, al cambio en el comportamiento alimenticio o a la disminución en la frecuencia de alimentación de tres veces al dia a una vez al dia, no relacionan la disminución de la Actividad Proteolítica con la dieta ya que se mantuvo la misma durante

todo el periodo de experimentación. Garcia-Carreño (1992), observa que la composición de las proteinas con Actividad Proteolítica en el hepatopáncreas de la langostilla *Pleuroncodes planipes* fue similar en animales alimentados y no-alimentados y concluye que las enzimas no son inducidas, son parte constitutiva del organismo.

En este estudio, el crecimiento de los camarones de los cuatro acuarios alimentados con la Dieta vegetal fue similar entre si. Lo mismo ocurrió con el crecimiento de los alimentados con la Dieta animal. Este resultado nos muestra, que la posición del acuario dentro de el área de experimentación no tuvo ninguna influencia sobre el crecimiento. El diferencial en el incremento en talla longitudinal y peso que tuvieron los camarones alimentados con la Dieta animal con respecto a los alimentados con la Dieta vegetal, puede ser consecuencia de una menor ingestión de la Dieta vegetal, ya que no fue lo suficientemente atractiva para los camarones o un indicador de la bondad de la Dieta animal, ya que en quince dias se logró obtener una diferencia significativa en talla y peso, posiblemente porque la calidad de esta dieta fue mejor, y en consecuencia mejor asimilada y metabolizada por los camarones, aunque tenian la misma concentración de proteina en el hepatopáncreas que el grupo alimentado con la Dieta Vegetal. La diferencia en crecimiento es atribuible a que la composición de las Dietas utilizadas en los bioensayos y su aprovechamiento fueron diferentes, ya que algunos parámetros que pudieran tener efecto sobre la Actividad Enzimática como: la frecuencia de alimentación, ciclos de luz-obscuridad y temperatura, se mantuvieron constantes.

En este estudio, los extractos crudos de hepatopáncreas de los camarones alimentados con la Dieta Vegetal y la Dieta Animal presentaron Actividades iguales para las Carboxipeptidasas A y B y para la Actividad Proteolítica Total, únicamente la Actividad de la Quimotripsina en el primer bioensayo tuvo una diferencia significativa ($P<0.05$) siendo mayor la Actividad Quimotripsina del grupo alimentado con la Dieta Vegetal, la que aparentemente si fue inducida por la Dieta ingerida en concordancia con el experimento realizado por Ezquerra, *et al.* (1997) con juveniles de *P. vannamei* a los que alimentaron durante 30 dias con siete diferentes dietas y concluyeron que si la dieta contiene proteina de baja calidad de acuerdo a la composición de aminoácidos (Dieta Vegetal), entonces la Actividad de la Tripsina y Quimotripsina es estimulada, pero no se afecta la capacidad de los extractos de hepatopáncreas para hidrolisar la caseína.

La diferencia que se obtuvo en la Actividad Quimotripsina no se presentó en el segundo bioensayo por lo que no podemos aseverar en forma concluyente que si fue una consecuencia de las dietas utilizadas, es necesario realizar más bioensayos. Lee, *et al.* (1984) experimentaron varias dietas en *Penaeus vannamei* de diferentes tamaños, variando la relación proteina de origen animal : proteína de origen vegetal, asi como el porcentaje total de proteína en la dieta. Encontraron que el porcentaje total de proteina en la dieta tuvo un efecto mayor en los camarones grandes (17-30 g) y la fuente de proteina tuvo un efecto mayor en los camarones pequeños (< 10 g), siendo mayores las Actividades Proteolíticas en los camarones alimentados con un porcentaje mayor de proteina animal. En este estudio la

Actividad Quimotripsina mayor se presentó en el grupo alimentado con la Dieta Vegetal. Las dietas utilizadas por Lee, *et al.* (*op cit.*) contenian componentes animales y vegetales, en este estudio todos los componentes de la Dieta fueron de origen vegetal, es decir la calidad de la proteina era menor y por lo tanto podría pensarse que por esta causa indujo una secreción mayor de enzimas proteolíticas en concordancia con Rodríguez *et al.* (1994), quien en su estudio encuentra que la poca proteina disponible en la dieta vegetal estimula la secreción de tripsina.

Si en el hepatopáncreas las proteinas son secretadas tan rápido como son sintetizadas, es decir si no hay un almacenamiento de las mismas, para ser secretadas cuando se presenta un estimulo adecuado, entonces un cambio en la Actividad Proteolítica se presentará sólo cuando haya un cambio en la tasa de síntesis (Biesiot, *et al.* 1990); la que no parece alterarse con las Dietas ensayadas en este estudio. Los resultados obtenidos en las determinaciones de las Actividades Proteolíticas parecen indicar que en camarones pequeños de *Penaeus vannamei* no se almacenan las enzimas en el hepatopáncreas como sucede en mamiferos según la hipótesis de la exocitósis (Palade, 1975), que explica el proceso de la secreción de las enzimas digestivas en el páncreas.

La precipitación de los extractos de hepatopáncreas con sulfato de amonio nos permitió concentrar las proteinas con mayor actividad en las fracciones con 40 y 60% de sulfato de amonio. Como un segundo paso en el proceso de purificación, el extracto de hepatopáncreas se pasó a través de una columna de Sephadex G25, este polisacárido

permite retardar el paso de las moléculas con menor peso. Las proteinas con mayor Actividad Proteolítica fueron las de mayor peso molecular, pasaron rápidamente por la columna y se colectaron en los primeros viales, logrando concentrar la proteina. Es posible que una segunda purificación con un Sephadex con una exclusión mayor nos permita separar las Carboxipeptidasas de la Quimotripsina.

Después del proceso de purificación se procedió a caracterizar el comportamiento de las enzimas al ser tratadas a diferentes temperaturas, para poder comparar estas con las enzimas proteolíticas reportadas en la literatura para otras especies. Las enzimas digestivas de los camarones trabajan normalmente a temperaturas bajas como consecuencia de su hábitat, sin embargo en los ensayos realizados a temperaturas elevadas encontramos mayor Actividad. a mayor temperatura y enzimas termoestables hasta 50 °C durante 100 minutos. A 60 °C la Actividad máxima se mantuvo solamente durante los primeros 20 minutos y a 70 °C no hubo Actividad. Este comportamiento de la Actividad Enzimática con la temperatura ha sido reportado en otros crustáceos, Garcia-Carreño *et al.* (1993) en sus resultados sobre la termoestabilidad de proteinasas en la langostilla *Pleuroncodes planipes* encuentran que la Actividad a 40 °C se mantiene inalterada durante 90 minutos, a 50 °C solo obtienen 80% de la inicial y a 70 °C la Actividad baja a menos del 30%. En el langostino *Pacifastacus astacus,* la Actividad aumenta al incrementar la temperatura de 20 a 40 °C, a 50 °C se mantiene durante 30 minutos y entonces disminuye gradualmente con el tiempo y a 70 °C la Actividad baja a menos del 30% en 10 minutos. Vega-Villasante (1995) en su estudio sobre las enzimas digestivas del camarón café *Penaeus californiensis* reporta una Actividad

Proteasa óptima a 50 °C y una inactivación irreversible a 60 °C. Inn-Ho *et al.* reporta que la Actividad de las Quimotripsinas en *P. japonicus, P. monodon y P. penicillatus* fueron inestables a temperaturas mayores de 50 °C

En peces tambien se ha reportado un comportamiento similar de las enzimas a la tempertatura, Dimes *et al*, 1994, reportan un aumento de Actividad Tripsina de salmónidos, conforme aumenta la temperatura de 25 hasta 45 °C a pH 8 y lo atribuyen a una posible conversión de Tripsinógeno residual a Tripsina, sin embargo Tsai *et al.*, 1986 realizaron un ensayo preincubando extractos crudos de hepatopáncreas con Tripsina de bovino o Enterokinasa y no detectaron un incremento en la Actividad como se esperaría si hubiera Tripsinógeno residual en el extracto crudo de hepatopáncreas.

En este estudio se detectó Actividad sobre el sustrato SAPNA como consecuencia de la presencia de Quimotripsina. Van Wormhoudt *et al.* (1992) reporta dos variantes de Quimotripsina en *Penaeus vannamei,* Hernández-Cortéz *et al.* (1997) purifica una sóla Quimotripsina en la misma especie, también en *Penaeus vannamei*, Lee *et al.* (1984) no detectaron la presencia de Actividad Quimotripsina y en *Homarus gammarus,* Glass *et al.* (1994) no detectan ninguna Actividad Quimotripsina. La diferencia en los resultados de los estudios anteriores plantea la posibilidad de que la secreción de la Quimotripsina no se almacene y no sea constante a lo largo del dia, por lo que al muestrear los organismos pudieran tener o no tener presencia de Quimotripsina o que su Actividad sea inhibida fácilmente por inhibidores naturales contenidos en la dieta.

La hidrólisis del sustrato hippuryl-L-arginina e hippuryl-L-phe nos confirma la presencia de las Carboxipeptidasas A y B en *Penaeus vannamei*, las que ya se habian reportado anteriormente por Lee *et al.* (1984), sin embargo ellos no detectaron la presencia de Actividad Quimotripsina y en nuestro estudio si se observó. Tsai *et al.* (1986) reportan la presencia de Tripsinas, Quimotripsinas y Carboxipeptidasas A y B en *P. monodon*, *P. penicillatus*, *P. japonicus*, *Metapenaeus monoceros* y *Macrobrachium rosenbergii*. La Actividad de las Tripsinas determinadas por Tsai *et al.* (1986) fue tan prominente como la de las Quimotripsinas. Lovett *et al.* (1990) encontraron Actividad Tripsina, Carboxipeptidasa A y B y Esterasa en todos los estadios del desarrollo de *Penaeus setiferus*. Lu *et al.* (1990) lograron purificar dos Tripsinas en el hepatopáncreas de *Penaeus monodon*. Vega-Villasante *et al.* (1995) detectaron en *Penaeus californiensis* Actividades del tipo: Tripsina, Quimotripsina, Carboxipeptidasa A y B y Leucina-Aminopeptidasa.

V CONCLUSIONES

Se confirmó la presencia de Quimotripsina en *Penaeus vannamei*.

Los experimentos sugieren que no hay una inducción en la producción de enzimas digestivas en individuos juveniles, por efecto de la dieta ingerida.

Posiblemente el aprovechamiento de las proteínas ingeridas esté determinado por la calidad de estas y no por la cantidad de enzimas digestivas.

Las enzimas proteolíticas de *Penaeus vannamei* son termoestables hasta 50 °C, presentan un máximo de Actividad entre 50-60 °C y una inactivación a 70 °C.

LITERATURA CITADA

Biesiot, P.M. and J. McDowell. 1990. Changes in digestive enzyme activities during early development of the American lobster *Homarus americanus* Milne Edwards. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., Vol 136, pp. 107-122.

Burkenroad, M, D. 1981. The higher taxonomy and evolution of Decapoda (Crustacea). Transactions of the San Diego Natural History Society, 19(17):251:268.

Cahu, C.L.. J.L. Zambonino Infante, A. Péres, P. Quazuguel, M.M. Le Gall. 1998. Algal addition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture 161: 479-489.

Cook, H. L., Linder. 1970. Synopsis of biological data on the brown shrimp *Penaeus aztecus* Pérez Farfante. FAO Fish. Rep., (57) vol. 4: 1471-97.

Cook, H. L. and A. Murphy, 1971. Early developmental stages of the brown shrimp. *Penaeus aztecus* Ives, Reared in the laboratory, Fish. Bull. 69 (1):23:39

Das, K.M. and S. D. Tripathi. 1991. Studies on the digestive enzymes of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). Aquaculture, 92:21-32.

Diaz, M., F. J. Moyano, F. L. García-Carreño, F. J. Alarcón and M. C. Sarasquete. 1977. Substrate SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. Aquaculture International. 5, 461-471

Ezquerra, J. M., F. L García-Carreño. Effects of feed diets on digestive proteases from the hepatopancreas of white shrimp (*Penaeus vannamei*). Journal of Food Biochemistry

21:401-419.

Garcia-Carreño, F. L. 1993. The digestive proteases of langostilla (Pleuroncodes planipes, Decapoda): Their partial characterization, and the effect of feed on their composition. Comp. Biochem. Physiol. Vol 103B, No 3 pp. 575-578.

Garcia-Carreño, F. L. 1996. Proteinase inhibitors. Trends in Food & Technology. Vol 7.

Garcia-Carreño, F. L., Haard N. F. 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. Journal of Food Biochemistry 17:97-113.

Garcia-Carreño, F. L., Haard N. F. 1994a. Preparation of an Exopeptidase-Enriched Fraction from the Hepatopancreas of Decapods. Process Biochemistry 29 663-670.

Garcia-Carreño, F.L., Hernández-Cortés M.P., Haard N.F. 1994b. Enzymes with Peptidase and Proteinase Activity from the Digestive Systems of a Freshwater and a Marine Decapod. J. Agricul. Food Chem. 42: 1456-1461.

Garcia-Carreño, F. L., Navarrete del Toro M., 1997a. Classification of Proteases Without Tears. Biochemical Education 25 (3).

Garcia-Carreño, F. L., Navarrete del Toro A., Ezquerra M., 1997b. Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility in vitro. I: Effect of protease inhibitors in protein ingredients. J. Mar. Biotechnol 5:36-40.

Glass, H. J., J. R. Stark. Protein digestion in the European lobster, *Homarus gammarus* (L.). Comp. Biochem. Physiol. Vol 108B No2:225-235.

Gonzalez-Ortiz, M. 1981. Enzimas para alimentos en México. Tésis Licenciatura. Facultad. de Quimica, U.N.A.M. México.

Hernández-Cortés, P., Whitaker, J. R., García-Carreño F. L., 1997. Purification and Characterization of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (Crustácea: Decapoda). Journal of Food Biochemistry 21: 497-514.

Hernández-Santoyo, A., Hernández-Arana, A., Arreguín-Espinoza, R., Rodriguez-Romero, A.. 1998. Purification and characterization of several digestive proteases from the blue abalone, *Haliotis fulgens*. Aquaculture 159 203-216.

Inn-Ho T., C. Kuei-Lien and J. L. Chuang. 1986. Chymotrypsins in digestive tracts of crustacean decapods (shrimps). Comp. Biochem. Physiol. Vol 85B No 1:235-239.

Jones, D. A., M. Kumlu, L. Le Vay, D. J. Fletcher. 1997. The digestive physiology of hervibororus omnivorous and carnivorous crustacean larvae: a review. Aquaculture 155: 285-295.

Le Vay, L., A. Rodríguez, M.S. Kamarudin and D. A. Jones. 1993. Influence of live and artificial diets on tissue composition and trypsin activity in *Penaeus japonicus* larvae. Aquaculture, 118:287-297.

Lee-Shing F., L. Bon-Ning. 1992. Ontogenic change of digestive enzymes in *Penaeus monodon*. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 103B No 4:1033-1037.

Lee P. G., L. L. Smith, A. L. Lawrence. 1984. Digestive proteases of Penaeus vannamei Boone: relationship between enzyme activity, size and diet. Aquaculture 43:225-239.

Lehninger, A, L. 1975. Biochemistry. 2ed, Worth Publishers, Inc.

Lovett, D. L., D. L. Felder, 1990. Ontogenetic Change in Digestive Enzyme Activity of Larval and Postlarval White Shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Biol. Bull. 178:144-159.

Lu P. J., H. C. Liu, I. H. Tsai. 1990. The Midgut of Shrimp (*Penaeus monodon*) High Efficiency Toward Native Protein Substrates Including Collagenus. Biol. Chem. Hoppe-Seyler Vol. 371. pp. 851-859.

Marte C. L., 1980. The food and the feeding habits of *Penaeus Monodon* F. collected from Makao river, Aklan, Philippines (Decapoda Natantia). Crustaceana, 38 (3):225-236.

Mohd. Muzaffar Bazaz and P. Keshavanath, 1993. Effect of feeding different levels of sardine oil on growth, muscle composition and digestive enzyme activities of mahseer, *Tor khudree*.

Palade, G. E., 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. Science, vol 189, pp. 347-358.

Pérez Farfante, I. & Kensley, B. F., 1997. Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the world, Keys and Diagnoses for the Families and Genera. Mém. Mus. Natn. Hist. Nat., 175:1-233. Paris ISBN: 2-85653-510-0.

Rodríguez, A., L. Le Vay , G. Mourente, D. A. Jones. 1994. Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. Marine Biology 118:45-51.

Rodríguez M. F., Reprieto J. G., 1991. El cultivo del camarón azul *Penaeus stylirostris* (Stimpson). Sygma Gráfica S. A de C. V., Hermosillo Son., México.

Rosenberg, R., Root, C., and Gray, H.: Electronic Spectral and Magnetic Susceptibility Studies of Ni(II) and Co(II) Carboxypeptidase A Complexes, J. Am. Chem. Soc., 97, 21. (1974a).

Rosenberg, R., Root, C., Bernstein, P., and Gray, H.: Spectral Studies of Copper (II)

Carboxypeptidase A and Related Model Complexes, J. Am. Chem. Soc., 97, 2092 (1974b).

Tsai, I., K. Chuang, J. L. Chuang. 1986. Chymotrypsins in digestive tracts of crustacean decapodos (shrimps). Comp. Biochem. Physiol. Vol. 85B No 1 pp, 235-239.

Vega-Villasante, F., H. Nolasco, 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, 123-129.

Walsh, K. A., Wilcox, P. E., 1970. Serine proteases. In: Perlmann, G. E. Lorand L. (Eds.) Meth. Enzymol., Vol. 19, Academic Press, New York, pp. 31-111.

Wikins j. f., 1976, Prawn biology and culture. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev., 14, 435-507. In H. Barnes Ed. aberdeen University Press.

Wormhoudt, A. V., P. Le Chevalier and D. Sellos. 1992. Purification, biochemical characterization and n-terminal sequence of a serine-protease with chymotrypsic and collagenolytic activities in a tropical shrimp, *Penaeus vannamei*. Comp. Biochem. Physiol. Vol 103B No 3:675-680.

Zar. J. H., 1980. Biostatistical Analysis. Second Edition. Prentice Hall Inc. New Jersey, USA. 718 pp.