

IV. ENZIMAS DIGESTIVAS Y ESTUDIOS SOBRE DIGESTIBILIDAD PARA ORGANISMOS ACUATICOS

Contenido

DIGESTION EN CAMARON Y SU RELACION CON FORMULACION Y FABRICACION DE ALIMENTOS BALANCEADOS	207
CARACTERIZACION DE LAS TRIPSINAS Y AMILASAS DE PENAEUS VANNAMEI (CRUSTACEA DECAPODA): ADAPTACION A LA COMPOSICION DEL REGIMEN ALIMENTICIO	233
UTILIZACION DE TIERRA DE DIATOMEAS LAVADAS EN ACIDO COMO RELLENO NO NUTRITIVO PARA CAMARONES PENEIDOS	267

DIGESTION EN CAMARON Y SU RELACION CON FORMULACION Y FABRICACION DE ALIMENTOS BALANCEADOS

L. Elizabeth Cruz Suárez

**Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas,
Programa Maricultura, Ciudad Universitaria
Ap. Post. F56, San Nicolás de los Garza, Nuevo León
C.P. 66450, México.
Tel+Fax: (8) 352-63-80
E-mail: lucruz@ccr.dsi.uanl.mx**

INTRODUCCION

El alimento puede llegar a constituir hasta un 60% de los costos de producción de camarón por acuicultura. Una vez superados los problemas de suministro de semilla de buena calidad y problemas de tecnología de cultivo, la optimización debe estar enfocada a la selección y el manejo adecuado de los alimentos balanceados que se suministran.

De manera general, el costo relacionado con el alimento se puede reducir potencialmente por: 1) el uso de alimentos apropiados, 2) la determinación de la ración más efectiva en costo, y 3) la reducción del desperdicio del alimento.

La capacidad para optimizar las tasas de conversión alimenticia y la reducción de los problemas asociados a la acumulación de desechos orgánicos que degradan la calidad del suelo y del agua de los estanques, depende de la acción conjunta de los fabricantes de alimentos (selección de materias primas, formulación y tecnología usada en la fabricación del alimento) y de los usuarios (forma de almacenamiento, manejo y distribución del alimento). En ambos casos, es fundamental tener un buen conocimiento de la fisiología y del comportamiento alimenticio del camarón .

HABITOS ALIMENTICIOS-ALIMENTACION NATURAL

En condiciones naturales los camarones peneidos juveniles son considerados omnívoros o detritívoros. En estudios del contenido estomacal, que se han hecho en diferentes especies, se han encontrado, de manera general pequeños crustáceos, poliquetos, algas y detritos. Algunas especies son más vegetarianas y otras más carnívoras (Wikins, 1976).

Existen evidencias que las preferencias alimenticias cambian con la edad y el estado fisiológico, por ejemplo en la época de maduración *Penaeus monodon* como una proporción mayor de moluscos que de crustáceos, lo inverso sucede en etapa de crecimiento (Marte, 1980).

FISIOLOGIA DE LA DIGESTION DE CRUSTACEOS DETECCION DEL ALIMENTO

Las antenas y las anténulas intervienen en la quimiorrecepción, búsqueda y reconocimiento del alimento, a través de quimiorreceptores llamados astetascos, que se encuentran en el flagelo lateral de las anténulas, comunicados por el nervio antenular al lóbulo olfatorio del protocerebro de los crustáceos. Los movimientos de las antenas tienen como función aumentar la exposición de los astetascos a los químicos propiciando la circulación del agua.

Además de estos receptores (de distancia) asociados al sentido del olfato, hay otro tipo de quimiorreceptores sensitivos localizados en los apéndices masticadores y a las partes bucales que funcionan como el sentido del gusto (receptores de contacto). Así tenemos que, el camarón tiene la capacidad de detectar el alimento a distancia, mediante los receptores antenales, y una vez que se ha dirigido a él, por contacto, lo degusta con los receptores presentes en pereopodos y apéndices bucales, dando como respuesta la aceptación o el rechazo del alimento. (Mendoza et al., 1996).

La capacidad de percibir la presencia y detectar el “sabor” del alimento, representa una estrategia energética, que permite minimizar el tiempo de búsqueda y maximizar la proporción neta de energía o de ingredientes ingeridos, **estrategia que puede ser utilizada eficazmente tanto en el diseño de los alimentos balanceados como en la forma de distribución.**

Sin embargo, es importante señalar que tanto la decisión de alimentarse como el nivel de alimentación o consumo son afectados por otros factores tanto internos (grado de inanición, dominancia social, sexo, estatus reproductivo, estado de muda), como externos (presencia de predadores, competidores, nivel energético de la dieta, condiciones de medio ambiente como temperatura, nivel de oxígeno, cantidad de luz etc.) por lo que todos estos factores deben ser considerados al momento de definir los programas de alimentación.

Los quimiorreceptores son sensibles a mezclas de moléculas disueltas en el agua liberadas de los alimentos naturales o artificiales. Estos compuestos son moléculas muy solubles en agua y son de bajo peso molecular como: aminoácidos, compuestos cuaternarios de amonio, trimetilamina, betaína, nucleótidos, aminas biogénicas y ácidos orgánicos. De hecho, muchas de estas sustancias se liberan de los organismos cuando mueren por descomposición de las proteínas, siendo éste uno de los mecanismos como un detritívoro reconoce a su presa.

El uso de sustancias atrayentes permite que los alimentos sean localizados y consumidos más rápido por los animales. Estos compuestos son generalmente extraídos de organismos marinos, aunque también pueden utilizarse moléculas orgánicas como: aminoácidos libres o

ciertas bases nitrogenadas que tienen un efecto attractante. De manera comercial se encuentran disponibles en el mercado extractos o solubles de diferentes organismos marinos como: calamar, krill, pescado incluyendo aceites de pescado y de calamar. La manera de aplicar estos attractantes en los alimentos balanceados puede ser mezclado como aditivo con los demás ingredientes de la fórmula, o por aspersión sobre los pellets terminados. Lo importante es que sean liberados inmediatamente que los pellets entren en contacto con el agua.

La capacidad attractante de un alimento va estar en función de los attractantes y deterrentes, presentes en los ingredientes utilizados en la fórmula, y de los attractantes agregados de forma suplementaria. La harina, los solubles y aceites de pescado, moluscos o crustáceos funcionan como excelentes attractantes.

CONTROL DE CALIDAD 1. LA ATRACTANCIA Y LA PALATABILIDAD DEL ALIMENTO

Un alimento balanceado nutricionalmente es de poco valor si no es consumido por el camarón. Entonces la attractabilidad y la palatabilidad del alimento son críticos. El alimento con buena attractabilidad va a atraer al camarón hacia el alimento. Cuando el camarón empieza a comer el alimento debe ser palatable, por lo tanto, el camarón deberá continuar comiendo sin interrupción. Esto se puede comprobar con el uso de charolas o viendo a los camarones comer en un acuario o en una cubeta, en menos de dos minutos de que el alimento haya sido dado los camarones deben volverse activos y buscar el alimento. Si el camarón no responde al alimento, este no es attractable y no debe de usarse.

Después de 30 minutos la vena del camarón debe estar llena, esta observación confirma que el alimento es consumido. Si los camarones toman el alimento, pero luego lo sueltan sin consumirlo, el alimento es attractante pero no es palatable, y no debe de usarse.

OJO: Hay que considerar que también se puede dar el caso opuesto, es decir una sobreestimulación e incitación al consumo que produzca un incremento en la TCA, sobre todo si se alimenta a saciedad sin correlacionar el consumo con la tasa de crecimiento.

La alimentación a saciedad, para un máximo crecimiento puede optimizar el uso de la infraestructura en términos de producción, pero se requiere de un control cuidadoso para evitar el desperdicio.

Contrariamente, la alimentación racionada puede reducir los problemas de desperdicio, pero con el riesgo de cierta pérdida de crecimiento y de producción. Las decisiones efectivas concernientes al tamaño de la ración deben estar basadas en un conocimiento de las relaciones crecimiento-ración para cada granja particular.

INGESTION DEL ALIMENTO

En los decápodos los apéndices próximos a la boca (localizada en posición cefálica ventral) están especializados para la alimentación, estos apéndices son las mandíbulas, las maxilas y las maxilulas que rodean la boca y con ellas rompen los alimentos antes de que estos sean introducidos al esófago. Los tres pares anteriores de apéndices torácicos están transformados en maxilípedos y con ellos retienen el alimento contribuyendo a su manipulación y desintegración. Los apéndices torácicos restantes (pereiópodos) tienen una función locomotora.

Este comportamiento alimenticio es de importancia trascendental y tiene grandes implicaciones en la formulación y fabricación de alimentos, porque favorece la pérdida o desperdicio de nutrientes en el agua. Estos apéndices como el resto del cuerpo están cubiertos por un exoesqueleto quitinoso, que se renueva durante el proceso de la muda, lo que provoca un periodo de alto estrés fisiológico en el animal, ya que además de hacerlo más vulnerable, éste deja de alimentarse hasta que se vuelven a endurecer éstos apéndices especializados.



Teniendo en cuenta la forma como los camarones atrapan el alimento; se puede deducir la necesidad de una presentación adecuada del mismo, en términos de: forma, homogeneidad de molienda y de mezclado, consistencia y tamaño; para que los crustáceos puedan manipularlos fácilmente con la ayuda de sus apéndices y permanecer en el agua un tiempo suficientemente largo, sin deshacerse antes de ser consumidos.

Para ello es necesario que la planta de alimentos cuente con tecnología adecuada, es decir molinos pulverizadores capaces de dar un grado de molienda adecuado de 250 micras (malla US

60) a 177 micras (malla US 80) de los ingredientes, mezcladora que permita un buena homogeneidad de mezclado y en conjunto se de una buena compactación de los ingredientes. Esto aunado al uso de aglutinantes que permitan mantener reunidas las harinas componentes del alimento.

CONTROL DE CALIDAD 2. APARIENCIA

Como el camarón come por quimioatracción el color del alimento es irrelevante. Sin embargo, **el alimento debe ser uniforme en color**, las variaciones de color del pellet, indican un mezclado de los ingredientes inadecuado, y/o una variación en el cocimiento de los alimentos en la peletizadora. Una mezcla inadecuada resulta en una distribución de los nutrientes no homogénea en el alimento. Un sobrecocimiento puede destruir muchos nutrientes, por ejemplo: vitaminas, aminoácidos y volver al alimento indisponible. Un subcocimiento puede resultar en una baja estabilidad del alimento en el agua. Los alimentos para camarón **no deben de contener partículas grandes de ingredientes**. Los camarones pueden segregar las partículas grandes del alimento. Dado que los alimentos están formulados para ser nutricionalmente balanceados, si las partículas grandes no son ingeridas, el alimento consumido no será nutricionalmente adecuado.

Un tamaño de partículas desigual en el alimento, es también un indicador de un mal procesamiento del mismo.

Los alimentos para **camarones no deben de presentar ningún tipo de fracturas y deben ser uniformes en textura**. Estas fracturas, van a permitir que el agua penetre en el pellet y reduzca la estabilidad en el agua. La variación en la textura del pellet indica un procesamiento pobre que reducirá su estabilidad en el agua.

Los alimentos para camarón no deben de adherirse entre ellos, la adhesión o aglomeración del alimento indica un insuficiente secado antes de empacar, o que los alimentos se mojaron. El valor nutricional de un alimento mojado se puede deteriorar rápidamente.

Los alimentos para camarón debe **no de contener un máximo de 2% de finos** o polvos. Excesivos niveles de finos es el resultado de un procesamiento y un manejo inadecuado. Estos finos resultan en un desperdicio del alimento, ya que no serán consumidos por los camarones y van a contribuir a un problema de contaminación del agua.

CONTROL DE CALIDAD 3. ESTABILIDAD EN EL AGUA

La formulación de alimentos no sólo tiene que llenar los requerimientos de los animales; debe también producir un alimento muy estable en el agua porque los camarones se alimentan lenta y continuamente. La estabilidad en el agua es de suma importancia en la alimentación de camarón, ya que una gran cantidad de nutrientes se disuelven en las primeras dos o tres horas después de su distribución y todo el beneficio de una perfecta formulación se puede perder. El alimento necesita mantener su integridad en el agua, hasta que el alimento entero sea consumido.

Los alimentos que no son estables en el agua y que se desintegran rápidamente van a

producir un desperdicio de alimento (una pobre tasa de conversión) y una contaminación del agua.

La lixiviación o la disolución de atrayentes es necesaria para el consumo del alimento y todos los atrayentes deben disolverse en una o dos horas. Si los atrayentes ya no están presentes, el alimento no será consumido, entonces el alimento para camarón necesita ser estable en el agua, por al menos 2 y media horas.

El peletizado de los alimentos se puede obtener por tres procesos: peletizado clásico con o sin vapor, peletizado húmedo y extrusión-cocción. La fórmula que permite la mejor estabilidad no es la misma para todos los procesos: en el peletizado húmedo se requiere generalmente la adición de gluten de trigo; con la extrusión-cocción la estabilidad puede ser obtenida por texturización de proteínas o por gelatinización de almidones, finalmente con el peletizado clásico, donde la estabilidad es más difícil de obtener, deben utilizarse aglutinantes especiales que pueden o no tener valor nutricional.

Sin embargo, la estabilidad óptima en el agua es dependiente del manejo del alimento, por ejemplo si los camarones son alimentados varias veces (6 o más veces) por día y en cada alimentación todo el alimento es consumido en 30 minutos, se requiere una estabilidad del alimento de sólo una hora.

CONTROL DE CALIDAD 4. TAMAÑO DEL ALIMENTO PARA CAMARÓN

“El tamaño del alimento para camarón, no está relacionado con el tamaño de la boca. Sin embargo, el camarón necesita llevar las partículas del alimento, mientras comen y a menudo estarán nadando con el alimento. Entonces, el pellet necesita ser lo suficientemente pequeño para poder ser llevado a la boca y permitir al camarón cargarlo mientras nada.

El tamaño del alimento recomendado para el camarón se presenta en la Tabla 1. El camarón no requiere más de 3 tamaños de alimento. Sin embargo, mientras menor sea el tamaño del alimento, mayor va a ser el número de partículas disponible por unidad de peso, por lo tanto, alimentará un mayor número de camarones.

Tabla 1. Tamaños de pellet recomendados para camarón (Akiyama and Chwang, 1989)

Camarones (g)	Tamaño del alimento
0-3	1 mm migaja
3-15	2 mm x 4 mm
15-40	2.5 mm x 5 mm

DIGESTION

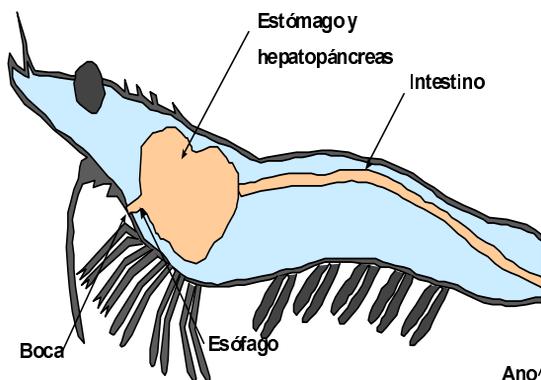


Figura 1. Anatomía general del tubo digestivo del camarón

El tubo digestivo de los decápodos se divide en tres partes: intestino anterior o estomodeo, intestino medio o mesenterón y el intestino posterior o proctodeo. El estomodeo y el proctodeo están cubiertos de quitina, y este recubrimiento se pierde en cada exuviación o muda (Figura 1).

En seguida de la boca se encuentra el esófago y luego el estómago, en el cual se pueden distinguir dos partes: cardiaca o anterior, separada por una válvula cardio-pilórica de la parte pilórica o posterior. La primera sirve de receptáculo de los alimentos ingeridos y presenta una gran elasticidad, en la parte posterior se encuentran una serie de piezas calcáreas, sedas, espinas y filtros, así como repliegues y sillones por los cuales pasan los alimentos en el transcurso de sucesivas moliendas. Las partes posteriores del estómago cardiaco y pilórico están reforzadas y soportadas por un conjunto de piezas calcáreas articuladas, las placas y los oscículos, que son zonas de espeso revestimiento quitinoso de este órgano (Figura 2).

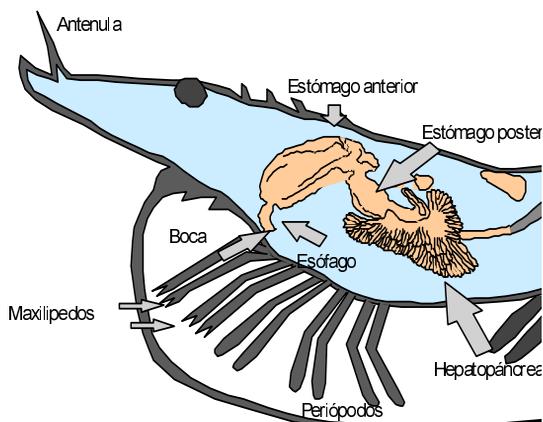
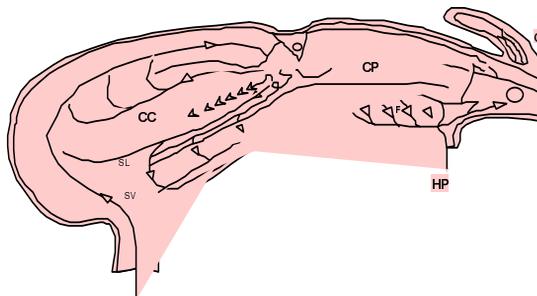


Figura 2. Anatomía detallada del aparato digestivo del camarón (Tomado de Ceccaldi, 1986)

Las piezas masticadoras del estómago (molino gástrico) son manipuladas por músculos propios, exteriores a la pared del estómago, controlados por un conjunto de elementos nerviosos. Estas piezas más o menos calcificadas tienen disposiciones y formas muy diversas de unos grupos de crustáceos a otros.

El estómago está provisto de elementos duros u oscículos, con una función trituradora. La eficiencia del estómago está ligada a su complejidad, y ésta varía de manera inversa a la complejidad de las mandíbulas.

Los alimentos se desplazan por el tubo digestivo, las partículas de gran tamaño se quedan en la bolsa cardiaca y son dirigidas por movimientos musculares hacia la parte dorsal de la bolsa, en donde son tratadas por el molino gástrico. Las partículas suficientemente pequeñas pasan al saco pilórico y son finalmente filtradas por sedas muy cerradas entrando a la glándula del intestino medio o hepatopáncreas. Las partículas más gruesas son retenidas por un filtro a la entrada de la glándula y son dirigidas posteriormente hacia el intestino, donde son cubiertas por una membrana de mucopolisacáridos: membrana peritrófica, dando lugar a las heces fecales. Estas últimas son a menudo reingeridas por los mismos camarones (Figura 3).



Tomado de: Ceccaldi, 1989

Figura 3. Circulación de los fluidos digestivos en el estómago de crustáceos peneidos.

La bolsa pilórica presenta movimientos de contracción, sucesivos y coordinados que aseguran la filtración y permiten la progresión del alimento hacia el intestino medio y posterior. En virtud de la presencia de múltiples filtros, principalmente en los crustáceos decápodos, se pueden considerar como filtradores intensos (**de ahí la importancia de una buena molienda de los insumos en los alimentos balanceados**).

En el estómago los alimentos son transformados en una papilla líquida y se inicia la digestión química.

DIGESTION QUIMICA

La degradación química de los alimentos se realiza gracias a la acción de enzimas digestivas procedentes principalmente de la glándula del intestino medio o hepatopáncreas. Este órgano tiene tres funciones principales: secreción y síntesis de enzimas digestivas, retención temporal y cíclica de reservas y la absorción de nutrientes, productos de la digestión (Gibson y Barker, 1979).

El hepatopáncreas es un órgano compacto que ocupa una gran parte de la cavidad cefálica posterior a la cavidad cardíaca del estómago. Tiene 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 varios tipos: células de absorción y de acumulación, células secretoras, células embrionarias y células fibrilares (Figura 4).

Las células embrionarias se diferencian en los otros tipos de células. Las células secretoras o células B (del alemán blasenzellen) presentan un núcleo basal y grandes vacuolas citoplásmicas llenas de un 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 (Loizzi, 1971).

Las células fibrilares sintetizan las enzimas digestivas y las guardan en reserva en una vacuola supranuclear. Esta última se agrandará por pinocitosis capturando nutrientes de la luz tubular hasta originar una célula B típica. El mecanismo de vertido de enzimas no es bien conocido, pero se considera que hay una digestión intracelular y otra extracelular que se lleva a cabo en el lumen de los túbulos del hepatopáncreas (Figura 5).

Las células B, cuando están repletas, son las más voluminosas de las células de la glándula del intestino medio. Contienen una vacuola central única que representa al menos los 4/5 del volumen celular. Se piensa que la secreción es de tipo merocrino o apocrino en condiciones fisiológicas normales pero, que en caso de estimulación interna la secreción puede ser holócrina.

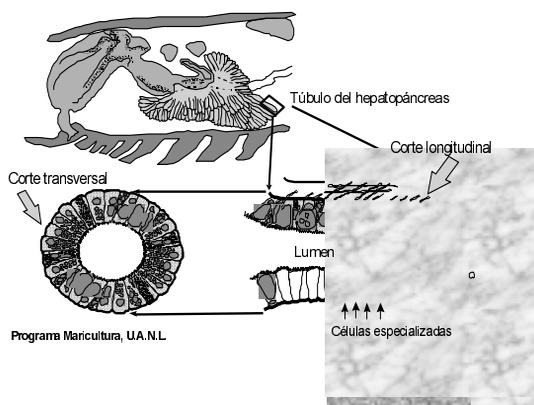


Figura 4. Anatomía del hepatopáncreas

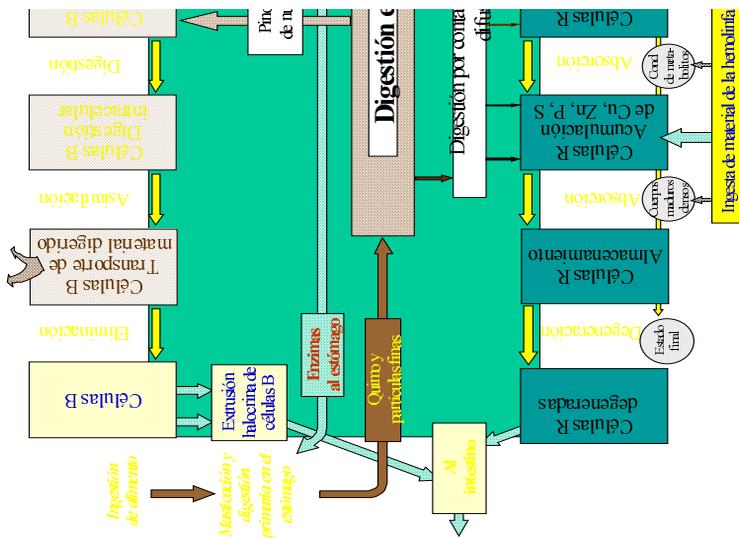


Figura 5. Diagrama del túbulo del hepatopáncreas mostrando las funciones de las células epiteliales durante el ciclo digestivo (Tomado de Al-Mohanna y Noh, 1987).

ENZIMAS DIGESTIVAS PROTEASAS

El conjunto de las enzimas proteolíticas está constituido de dos grupos: 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 dipeptidos. En los crustáceos la digestión química de proteínas comienza en la cavidad cardiaca del estómago y continúa en los túbulos del hepatopáncreas. El modelo de degradación de proteínas es en grandes líneas, similar al de los vertebrados: ruptura de las proteínas ingeridas por las endopeptidasas, degradación de los peptidos por las exopeptidasas y absorción a nivel de células especializadas del hepatopáncreas. Sin embargo, hay diferencias importantes que modifican ese modelo general como son: ausencia de acidificación del medio estomacal durante la digestión, poca actividad quimiotripsica, ausencia de elastasa y existencia de una colagenasa digestiva y de una proteasa de bajo peso molecular.

En los camarones peneidos se han encontrado actividades análogas a la tripsina, carboxipeptidasas A y B (Gates y Travis, 1969, 1973; Galgani, 1985). Aminopeptidasas y dipeptidasas (De Villez, 1965; De Villez y Buschlen, 1967; Lee, 1980; Muramatsu y Morita, 1981).

También existe una proteasa particular muy activa de bajo peso molecular 11000 Daltons (Pfleiderer et al. 1967, Zwilling et al., 1981) esta enzima sólo parece existir en los decápodos. Tiene un papel similar al de la pepsina, estando ésta última ausente en el hepatopáncreas.

La tripsina representa por sí sola el 60% de la actividad proteásica del hepatopáncreas en los crustáceos peneidos. La importancia relativa 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 utilizan en su alimentación, en este caso un alimento balanceado. Estas proteínas deben contener los aminoácidos esenciales en cantidad óptima, pero también los aminoácidos que permitan una hidrólisis rápida de las proteínas. Por otro lado, el efecto de inhibidores naturales de la tripsina presentes en los ingredientes de base utilizados para la fabricación de alimentos balanceados, tal como el inhibidor tripsico de la soya, es muy marcado en los crustáceos Peneidos debido a la importancia de la enzima.

Hay evidencias de una actividad quimiotripsica en varias especies de crustáceos, pero es generalmente débil (Brun y Wojtowicz, 1976; Trellu y Ceccaldi, 1977). En *Palaemon serratus* la quimiotripsina tiene una actividad media y aparece desde la embriogénesis.

En algunos crustáceos como *Penaeus japonicus* existe una actividad colagenolítica baja. Se han detectado en varias especies algunas enzimas capaces de hidrolizar el colágeno puro. (Grant et al., 1981; Galgani, 1985)

CARBOHIDRASAS

También existen enzimas que digieren los glúcidos: amilasas, maltasas, sacarasas, algunas veces celulasas. En *Palaemon serratus* se han encontrado la beta-glucosaminidasa, la beta-glucosidasa, la alfa-manosidasa, la beta fructofuranosidasa y la alfa-fucosidasa, tres glucuronidasas (Van Wormhoudt, 1980; Trellu y Ceccaldi, 1977).

Existen quitinasas que permiten la digestión de la quitina que constituye el exoesqueleto de los artrópodos: los crustáceos consumen su propia quitina y a veces depredan otros crustáceos. De manera general se sabe que los peces y los crustáceos tienen una baja capacidad para utilizar los glúcidos.

LIPASAS

La digestión de los lípidos está asegurada por las lipasas y esterasas. Los lípidos alimenticios deben sufrir dos tipos de transformaciones para poder ser absorbidos: -una emulsificación, que conduce a una micro-emulsión y una hidrólisis. Las lipasas actúan sobre los lípidos emulsionados y las esterasas continúan la digestión enzimática sobre los productos hidrosolubles obtenidos. En los crustáceos los compuestos emulsificantes que desempeñan el mismo papel que la bilis de los mamíferos, es decir, la de dispersar las grasas antes de su digestión, son derivados de la taurina y de los ácidos cólico y desoxicólico.

OTRAS

Así mismo se han encontrado en crustáceos enzimas como la desoxirribonucleasa, la ribonucleasa y fosfatasa alcalinas.

El pH óptimo para las actividades de estas enzimas es bastante variable desde 5.5 a 9. La actividad tripsica tiene un pH óptimo de 8.3, la carboxipeptidásica A de 7.5 y la B de 9.2. La alfa amilasa muestra un pH óptimo de 6.3 a 6.8.

VARIACIONES DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DIGESTIVAS

Las actividades enzimáticas digestivas varían en función de: ciclo de muda, ciclo circadiano, desarrollo (larvario, de crecimiento, de reproducción), tipo de alimento y factores ambientales.

REGULACION ENDOCRINA DE LA SINTESIS DE LAS ENZIMAS DIGESTIVAS

La gastrina presente en las paredes del estómago, en las células neurosecretoras y en la glándula del sinus, aumenta la síntesis de enzimas digestivas y en particular de la alfa-amilasa. Provoca un aumento de la síntesis proteica del hepatopáncreas.

Los ecdisteroides secretados por el órgano "Y" estimulan la síntesis de enzimas digestivas. La colesistoquinina ó CCK, y la secretina, hormonas peptídicas, presentes igualmente en las

células neurosecretoras y la glándula del sinus del pedúnculo ocular, aumentan la síntesis de enzimas digestivas.

La hormona inhibidora de la muda presente en los pedúnculos oculares, inhibe la síntesis proteica por bloqueo de ecdisteroides en el órgano Y.

INGREDIENTES PARA LA FORMULACION DE ALIMENTOS

Teniendo conocimiento del equipo enzimático podemos deducir qué ingredientes podrán ser utilizados en la fabricación de alimentos balanceados.

En cuanto a fuentes de proteína, dada la importancia de la tripsina, mientras más aminoácidos básicos tenga la proteína, la capacidad de hidrólisis será mayor y por lo tanto, la digestibilidad y la eficiencia alimenticia. Los ingredientes cuyas proteínas son ricas en arginina, lisina e histidina son excelentes fuentes de proteína, ejemplo: harinas de pescado, de cabeza de camarón, harina de calamar, harina de krill, pasta de soya etc.

Evidentemente estas proteínas deben de contener un perfil de aminoácidos que comprenda aquellos esenciales para el camarón. La complementación de proteínas con aminoácidos puros no es recomendable en organismos acuáticos por su gran solubilidad en el agua.

Pasando a las fuentes de glúcidos, se ha demostrado que la glucosa pura disminuye el crecimiento y la sobrevivencia, y que el uso de polisacáridos o disacáridos da los mejores resultados. Aunque, como vimos anteriormente, el camarón tiene la capacidad enzimática de degradar polímeros, como el almidón de los granos, el glucógeno de origen animal, y la quitina del exoesqueleto, su capacidad de utilización es muy reducida comparada con las proteínas (hay menos amilasas que proteasas). Sin embargo, su uso es muy aconsejado (30 a 40% de la materia seca del alimento) para disminuir los requerimientos de proteínas como fuente de energía.

Son buenas fuentes de carbohidratos las harinas de trigo, maíz, sorgo, mijo, arroz etc. La digestibilidad del almidón varía según su origen, proporción de extracción de cereales y grado de gelatinización. La disponibilidad de los almidones se incrementa con algunas tecnologías de fabricación de los alimentos como son la cocción y la extrusión.

Los lípidos son importantes fuentes de energía y se han determinado requerimientos esenciales de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Las fuentes de lípidos usadas deben contener ácidos grasos linoleicos y linolénicos en su composición. Como ejemplos tenemos: el aceite de pescado, el aceite de hígado de bacalao, aceite de calamar y como fuente de fosfolípidos: la lecitina de soya. Es importante considerar el aporte en lípidos de los otros ingredientes de la formulación, lo que disminuye la adición de fuentes puras de lípidos generalmente al orden de 34% de la dieta seca.

Los ingredientes constituidos por organismos unicelulares, como: levaduras, bacterias etc. también pueden ser digeridos eficientemente por los camarones peneidos. Tienen la capacidad

de lisar la pared celular y de digerir sus componentes, que de cierta forma están encapsulados y protegidos, hasta antes de la ingestión, de la lixiviación. Estos ingredientes son fuentes de ácidos nucleicos y desoxirribonucleicos y vitaminas del complejo B, entre otros.

Sería muy pretencioso tratar de hacer una revisión extensa de ingredientes propios para la formulación, en este artículo, sin embargo, consideramos que la comprensión de la forma de alimentación de los crustáceos, y su fisiología digestiva permite resaltar la importancia no sólo de la composición del alimento, sino también de su forma, tamaño y estabilidad en el agua. Puntos igualmente importantes a considerar en el momento de seleccionar el equipo o la tecnología que se usará para la fabricación de los alimentos.

REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

En la actualidad miles de toneladas de alimento para camarón son fabricadas en el sudeste de Asia, América Latina, etc. Sin embargo, estas dietas aún no son formuladas con el detalle que son formulados los alimentos para porcinos o aves, donde los conocimientos de requerimientos nutricionales son muy avanzados. La nutrición de camarón comparada con éstas especies, apenas está despertando.

El conocimiento científico de la nutrición de crustáceos se está incrementando regularmente, los requerimientos nutricionales de los camarones peneidos son aproximadamente conocidos, pero el conocimiento generado es muy variado debido a diferencias en la metodología de investigación y a la ausencia de una dieta experimental estándar. Variables como: especie, edad, fuente y estado fisiológico del camarón, condiciones ambientales, diseño experimental, instalaciones experimentales y forma, composición y procesamiento de las dietas a menudo hacen inválidas las comparaciones. Sin embargo, éstos estudios han sido la base para dar los conceptos principales usados para la formulación de alimentos comerciales.

Aunque los principios nutricionales son similares para todos los animales, la cantidad de nutrientes requeridos varía con las especies. Hay aproximadamente 40 nutrientes esenciales requeridos por peces y animales terrestres. Aparentemente estos nutrientes esenciales son similares para camarón y podrían incluir aminoácidos, ácidos grasos, energía, vitaminas, minerales. Estos nutrientes son provistos en cierto grado por los alimentos procesados y el medio natural de cultivo (Akiyama y Dominy, 1989). La mayoría de los requerimientos no toman en cuenta la disponibilidad de nutrientes, el método y las condiciones del cultivo, las pérdidas por procesamiento y almacenamiento.

Para condiciones sub-óptimas de cultivo, los niveles de nutrientes requeridos son mayores que los publicados y por el contrario los niveles de nutrientes pueden ser menores si se considera la disponibilidad de alimento natural y la biomasa de los organismos cultivados.

CONTROL DE CALIDAD 5. COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD APARENTE

Existe un indicador de la calidad del alimento muy importante y útil que hasta la fecha por falta de conocimiento no se ha solicitado a los fabricantes de alimentos y es la digestibilidad o la disponibilidad de nutrientes contenidos en los alimentos.

Desafortunadamente los ingredientes más digestibles, de mejor calidad nutricional, son los más caros y eso hace automáticamente subir el costo del alimento. Sin embargo, también es cierto que si el alimento es más digestible, se necesita menos para cubrir los requerimientos de crecimiento, lo cual puede compensar con beneficios la inversión inicial. Esto está claramente reflejado en el factor de conversión alimenticia, que se evalúa a lo largo del cultivo en la granja.

COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD APARENTE

Esa disponibilidad o digestibilidad de nutrientes depende por una parte, de la calidad de la materia prima, el proceso y la forma y el tiempo de almacenamiento, y por otra parte del equipo enzimático del animal y de la eficiencia de su funcionamiento. Eficiencia que a su vez, depende de la edad, del estado de salud del camarón y de las condiciones ambientales.

La digestibilidad aparente de un alimento o de un ingrediente se puede evaluar con camarones en medio controlado, de tal manera que a diferencia de los bioensayos en granja, se evalúa la digestibilidad única y exclusivamente del alimento en cuestión.

Esta determinación, consiste en evaluar el porcentaje de alimento o de nutrientes del alimento (por ejemplo de proteína) que se retiene o se absorbe en el tubo digestivo del animal. Para ello se evalúa la cantidad de alimento consumido y la cantidad de heces emitido. La diferencia entre los nutrientes que entraron (alimento) y los que salieron (heces) da como resultado el porcentaje de digestibilidad aparente.

Como ese porcentaje del alimento es el que realmente estará disponible para el crecimiento del camarón, la unidad de costo de un alimento o de ingrediente se podría fijar por gramo de peso de alimento digestible o por punto de TCA en lugar de por punto o porcentaje de proteína.

Las determinaciones de digestibilidad aparente se realizan en diferentes Instituciones de investigación en México. El uso de estos indicadores permitirá a las cooperativas de productores, tener una clasificación continua de los alimentos comerciales y tener mejores bases para hacer la mejor elección.

La información sobre digestibilidad es esencial para evaluar la calidad de un ingrediente. Aunque el perfil de nutrientes de un ingrediente aparentemente sea bueno, si sus nutrientes no son digeridos, absorbidos y utilizados, serán de poco valor para el animal.

Akiyama et al. (1988) determinaron la digestibilidad aparente de materia seca (Tabla 2) proteína y aminoácidos de varios ingredientes para camarón. Estos ingredientes fueron: caseína,

almidón de maíz, gelatina, proteína de soya, gluten de trigo, harina de pescado, salvado de arroz, harina de camarón, harina de soya y harina de calamar. En términos de materia seca, las dietas conteniendo ingredientes puros ricos en proteínas: caseína, gelatina, proteína de soya y gluten de trigo, fueron más digestibles que la dieta rica en carbohidratos conteniendo almidón de maíz (Tabla 2). Esto sugiere que las proteínas son más eficientemente digeridas por el camarón que los carbohidratos. En general la proteína de ingredientes de origen animal marino es de mejor calidad que la proteína de ingredientes de origen vegetal.

Tabla 2. Digestibilidad aparente de materia seca y proteína para *Penaeus vannamei*

Ingrediente principal en la dieta	Digestibilidad aparente de materia seca	Digestibilidad aparente de proteína
Ingredientes Puros		
Caseína	91.4	99.1
Gluten de trigo	85.4	98.0
Proteína de soya	84.1	96.4
Gelatina	85.2	97.3
Almidón de maíz	68.3	81.1
Ingredientes prácticos		
Harina de calamar	68.9	79.7
Harina de pescado	64.3	80.7
Harina de camarón	56.8	74.6
Harina de soya	55.9	89.9
Salvado de arroz	40.0	76.4

Akiyama *et. al.*, 1988.

La digestibilidad aparente de minerales también fue determinada por Akiyama. En general, la harina de camarón parece ser la mejor fuente de minerales. La harina de calamar contiene fósforo muy digestible.

Los valores de disponibilidad en suplementos de fósforo no han sido determinados para camarón, sin embargo, se cree que son similares a los de la carpa común que no tiene estómago verdadero con secreción ácida. La acidez del sistema digestivo de crustáceos es mínima, ya que el pH es aproximadamente 5-7. Los valores estimados de fósforo se presentan en la Tabla 3 (Akiyama et al. 1988).

Tabla 3. Valores estimados de disponibilidad de fósforo para varios ingredientes.

Ingredientes	Porcentaje de disponibilidad
productos vegetales	30
rodutos animales	30
productos microbianos	90
Fuentes inorgánicas:	
—fosfato monosódico	95
—fosfato monocalcico	95
—fosfato dicalcico	45
—fosfato tricalcico	15

Akiyama y Dominy, 1989.

PROTEINAS

La calidad de las proteínas se resume esencialmente en dos características: coeficiente de utilización digestiva y valor biológico (equilibrio de aminoácidos esenciales o indispensables y principalmente del valor relativo del aminoácido esencial menos abundante con respecto a los requerimientos: aminoácido limitante)

Otros factores tales como la disponibilidad del aminoácido limitante, nivel atractante o apetante de la proteína, presencia de factores antinutricionales etc. deben tomarse en cuenta. En general, se admite que las fuentes proteicas cuyo balance en aminoácidos esenciales es semejante al que presenta la proteína de los animales a alimentar, son las de mejor calidad y promueven un crecimiento más rápido.

En la práctica, en alimentación animal estas nociones son muy utilizadas y se trata generalmente de suplementar las proteínas con aminoácidos puros (no eficaz en acuicultura por la solubilidad de aminoácidos en el agua) o por medio de combinaciones de proteínas que presentan perfiles de aminoácidos complementarios.

Los aminoácidos esenciales han sido estudiados en 10 especies de crustáceos (arginina, metionina, treonina, valina, isoleucina, leucina, lisina, histidina, fenilalanina y triptofano) pero los requerimientos de cada uno de los aminoácidos aún no se conocen; por el momento estos son estimados en base a la composición de la carne de los camarones.

La relación lisina-arginina más eficiente según Hew, 1983, se sitúa entre 1.5 y 2 para *Penaeus japonicus*, en otras especies no se ha demostrado, sin embargo Akiyama y Dominy (1989) reportan una relación 1:1 o 1:1.1.

Como se mencionó anteriormente el uso de aminoácidos sintéticos no es recomendado en alimentos para camarón, principalmente por el lento comportamiento alimenticio del camarón,

que permite la lixiviación de nutrientes del alimento antes de que sea consumido, pudiendo causar además problemas de contaminación del medio.

FUENTES

La nutrición proteica es, realmente, la nutrición aminoacídica; así las fuentes proteicas de la fórmula deben ser elegidas para satisfacer los requerimientos en aminoácidos esenciales de la especie determinada.

Las proteínas de origen animal son las más usadas en alimentación de camarón. La **harina de pescado** se encuentra en casi todas las dietas comerciales, debido a que es muy atractante, muy digesta y rica en aminoácidos esenciales, principalmente lisina y otros aminoácidos básicos. Sin embargo se debe tener mucho cuidado con su calidad; una buena harina de pescado deben tener pocos lípidos y cenizas, un bajo índice de peroxidación de lípidos y no debe contener histamina. Aún las mejores harinas de pescado no deben de ser incluidas en niveles que excedan un 40% (en el caso de dietas para *Penaeus vannamei*), para que no haya una depresión del crecimiento. Las razones de este efecto no son bien conocidas. Se puede obtener un efecto benéfico de otras fuentes de proteínas como son: los solubles o concentrados proteicos de pescado, las harinas de camarón y de calamar. En el caso de esta última se ha encontrado que su efecto sobre el crecimiento del camarón se debe a que contiene un factor de crecimiento que actualmente está siendo purificado (Cruz Suárez, 1987).

El uso de proteínas de origen animal tales como harina de carne y sangre está limitado principalmente por su contenido en ácidos grasos saturados.

Las **proteínas vegetales** son usadas en menor grado en las dietas para camarón porque son menos atractantes, y su composición en aminoácidos es menos balanceada. También contienen ácidos grasos de cadena más corta que los productos marinos, a menudo de las series N6, y muchas contienen productos tóxicos como el factor antitripsico de la soya, el gossypol del algodón etc. aflatoxinas u otros hongos muy tóxicos. Debido a esto la proteína vegetal debe seleccionarse con mucho cuidado. En la práctica sólo las mejores proteínas vegetales conocidas son usadas para ciertas especies, por ejemplo la harina de **pasta de soya**. Las **levaduras** desprovistas de factores antinutricionales y las bacterias fermentadoras de alcoholes son otra buena fuente de proteína para crustáceos. Substituciones de hasta un 30% se han revelado eficaces, mientras que porcentajes mayores requieren suplementación con aminoácidos libres.

CARBOHIDRATOS

Los conocimientos actuales sobre la nutrición glucídica son muy fragmentarios. Desde el punto de vista aplicado aún no se conoce el valor nutritivo real de innumerables fuentes de polisacáridos vegetales o animales.

Los carbohidratos pueden usarse como **fuentes de energía**, como reserva de glucógeno, en la síntesis de quitina, ácidos nucleicos y en la formación de esteroides y de ácidos grasos. Se ha

demostrado en peneidos que la glucosa obtenida de digestión de polisacáridos es mejor asimilada que la glucosa pura. La mayoría de las especies de camarón no son capaces de asimilar grandes cantidades de carbohidratos por su limitada digestión de almidones. Pero aún para las especies más carnívoras el uso de carbohidratos es recomendable, ya que puede ser una buena fuente de energía ahorrando cantidades substanciales de proteína. Algunos tipos de almidones son también usados como agentes aglutinantes.

El aporte de glucosamina que se utiliza en la síntesis de quitina en una proporción de 0.53% de la dieta aumenta la tasa de crecimiento.

FUENTES

Las principales fuentes de carbohidratos son **harina de maíz, trigo, arroz y sorgo** así como sus **subproductos**. Según el país estos cereales son usados en función de su precio y disponibilidad. Sin embargo, el trigo es el mejor aglutinante no por la naturaleza de su almidón sino por su contenido en gluten.

La digestibilidad de los almidones de los cereales o granos es mejorada por tratamiento térmico, principalmente durante el proceso de extrusión-cocción.

La glucosamina, monómero de la quitina ha sido considerada como nutriente esencial y adicionada en dietas puras; pero generalmente la fuente de glucosamina es la misma quitina, uno de los constituyentes principales de la harina de camarón.

LIPIDOS

Con respecto a la nutrición lipídica se sabe que los crustáceos usan generalmente bien las grasas como fuente de energía y como una fuente de ácidos grasos esenciales, necesarios para el crecimiento normal y la sobrevivencia de los animales.

Los lípidos sirven además como vehículos de las vitaminas liposolubles y proveen otros compuestos, como esteroides y fosfolípidos, que son esenciales para el buen funcionamiento metabólico del camarón. Los requerimientos cuantitativos de lípidos no han sido bien determinados y varían según la especie, pero en general la mayoría de los autores dan valores entre 4 y 9% de la dieta. Se ha observado, para diferentes especies de camarón, que un contenido mayor del 15% de lípidos en la dieta produce un retardo en el crecimiento, además de producir un problema de orden tecnológico, ya que esos altos niveles impiden la compactación de las harinas, disminuyendo la estabilidad del alimento en el agua. Tacon (1987), recomienda un porcentaje mínimo de 10% de lípidos y una relación 5:1 de lípidos de origen marino y vegetal. Los ácidos grasos poliinsaturados linoleico (18:2n6), linolénico (18:3n3), ecosapentaenoico (20:5n3) y docohexaenoico (22:6n3) (Kanazawa et al.; Jones et al., 1979) no pueden ser sintetizados y por lo tanto son considerados como esenciales. Los niveles de ácidos grasos esenciales recomendados por Akiyama y Dominy (1989) para dietas comerciales de camarones son del orden de 0.4 por ciento de la dieta de cada uno de ellos.

Los fosfolípidos son muy importantes y deben ser considerados en la selección de fuentes de lípidos para la dieta, su carencia disminuye el crecimiento y la sobrevivencia; son esenciales porque se requieren para el transporte de colesterol y triglicéridos en camarón.

El colesterol también es indispensable para crustáceos. Una concentración de 0.5-1.0 % en la dieta promueve el crecimiento y una concentración mayor de 5% lo retarda.

FUENTES

Los lípidos son componentes menores en las dietas para camarón. Las dietas comerciales a menudo contienen de 4 a 9 % de extractos etéreos, de los cuales 3 a 4% provienen de las fuentes de carbohidratos o de proteínas (cereales, pastas, harinas animales) y el 4 a 5 % son adicionados en forma de aceites. Las fuentes más usadas son los aceites de pescado. El aceite vegetal rico en ácidos grasos insaturados N-6 debe ser usado en cantidades limitadas por ejercer un efecto antagónico.

Los fosfolípidos juegan un papel esencial en los crustáceos y 0.5 a 3 % de **lecitina de soya** es incorporada en la mayoría de las dietas formuladas. La adición de colesterol generalmente no es necesaria en las dietas compuestas para engorda ya que la mezcla de ingredientes principalmente de origen marino cubre el requerimiento; aún algunos ingredientes vegetales contienen ciertos esteroides que el camarón puede convertir en sus propios esteroides o esteroides.

Otras fuentes excelentes de lípidos y fosfolípidos aparte del aceite de pescado, son el aceite de hígado de bacalao y aceite de calamar.

ENERGIA

Los requerimientos de energía metabólica en el camarón están influenciados por varios factores como son: la temperatura del agua, la especie, la edad, la actividad, la condición física y las funciones corporales. Otros parámetros como: concentración de oxígeno, pH y salinidad pueden afectar también los requerimientos energéticos.

En general se considera que los organismos acuáticos tienen requerimientos energéticos menores que los animales terrestres, debido a varios factores: son poiquiloterms, requieren menos energía para mantener su posición y para moverse en el agua en comparación con los animales terrestres y además los desechos nitrogenados son excretados en forma de amoníaco en vez de urea o ácido úrico, perdiendo menos energía en el catabolismo proteico y en la excreción de desechos nitrogenados.

La energía digestible de ingredientes no ha sido determinada para camarones.

Los camarones utilizan preferentemente la proteína como fuente de energía, pero conociendo el requerimiento de cada especie existe la posibilidad de utilizar los carbohidratos, además de los lípidos como fuente de energía en la dieta. Un método simple para proveer niveles adecuados de

energía en alimentos para camarón es mantener una proporción proteína:lípidos de aproximadamente 6:1 (Akiyama y Dominy, 1989).

Existen muy pocos datos acerca de los requerimientos energéticos de los peneidos; se ha encontrado que los niveles óptimos para engorda de *Penaeus stylirostris* fueron 4.0 kcal/g de energía total y 28% de proteína en la dieta.

OTRAS CARACTERISTICAS DEL ALIMENTO A CONSIDERAR

Otro punto que tiene que ser considerado antes de formular una dieta es el nivel de **utilización del alimento**. En cultivos extensivos poco o ningún alimento es distribuido, cuando algo es suministrado este puede ser consumido por los camarones directamente o convertirse en comida natural a través de la cadena alimenticia. Por otro lado, en un cultivo intensivo la única fuente de nutrientes es constituida por el alimento suministrado a los camarones y por lo tanto debe ser de muy buena calidad. Entre estos extremos existe un amplio rango de métodos de cultivo: semi-intensivo o semi-extensivo etc. En consecuencia, los extranutrientes originados por el plancton, animales ó plantas pueden contribuir de manera muy variable en la nutrición del camarón. Teóricamente mientras más abundante sean estos extranutrientes más simple puede ser la fórmula.

Desafortunadamente el grado de contribución del alimento natural es muy difícil de estimar cuantitativa y cualitativamente. Algunas dietas pueden dar muy buenos resultados de crecimiento cuando son usadas en cultivos semi-extensivos y son claramente deficientes cuando se usan en cultivos intensivos. La simplificación de una fórmula calculada para cultivo intensivo, con la finalidad de disminuir su precio y utilizarla en cultivo semi-extensivo es factible.

A pesar de la falta de conocimiento de los requerimientos nutricionales de los camarones, en los últimos diez años ha habido un gran progreso en la definición de una fórmula eficiente y en la selección de ingredientes para promover el crecimiento del camarón. En la Tabla 4 se da un ejemplo de una dieta balanceada así como el rango de variación en la utilización de esos ingredientes. Desde el punto de vista tecnológico, en el mundo se producen pellets de buena calidad a nivel industrial.

Aunque la mayoría de los sistemas de producción son semi-intensivos, donde la productividad natural es más o menos abundante y satisface parte de los requerimientos de los animales, la principal meta de los nutricionistas es la alimentación en sistemas intensivos.

Muchos ingredientes no convencionales pueden volverse útiles en la nutrición de crustáceos, en un futuro próximo, cuando los requerimientos nutricionales de las especies cultivadas y la aceptabilidad de los ingredientes sean mejor conocidos. En este aspecto es necesario hacer investigación tanto básica como aplicada.

Tabla 4. Ejemplo de la composición de una dieta balanceada para camarón (rango de variación de utilización de los ingredientes)

Ingrediente	%	%
Harina de pescado	(10-40)	20
Harina de soya	(5-25)	5
Harina de camarón	(5-15)	13
Levadura	(4-10)	5
Gluten de trigo	(5-15)	15
Almidón	(3-8)	3
Cereales o subproductos (arroz)	(10-15)	22
Mezcla de vitaminas	(2-5)	3
Mezcla de minerales	(2-6)	4
Aceite de pescado y lecitina	(1.5 a 3.5)	3.5
Concentrado de alfalfa (carotenos)	(2-4)	2
Soluble de pescado	(2-4)	4

MÉTODOS PARA ESTABLECER LA TASA DE ALIMENTACION

En el caso del camarón, aunque ya se presentan ciertas tablas de alimentación, si se quieren tener buenos resultados en la planificación de la alimentación se necesita la actuación personal, ejerciendo un control permanente y continuo sobre la ración establecida, de tal manera que el técnico calificado debe integrar toda la información proveniente del cultivo, para tomar decisiones rápidas que en muchos casos modificará las previsiones o recomendaciones de las tablas: sistema de rectificación continua.

La tasa de alimentación es propia de cada especie, de su hábitat (diferente en cada estanque), de la propia calidad y rendimiento del alimento, lo cual condiciona distintas tasas de alimentación.

La tasa de alimentación está relacionada con la tasa de conversión del alimento, de tal modo que existe un nivel óptimo de ella, en donde la utilización del alimento es máxima, lo que produce un mejor índice de transformación.

Existen diferentes métodos para el cálculo de la tasa de alimentación, científicamente la ración en base al contenido energético del alimento se ha establecido por las necesidades calóricas de un individuo, lo que está relacionado con su tasa metabólica y la superficie corporal.

Una forma práctica que ayuda a determinar la tasa de alimentación, es el uso de charolas o comederos en los estanques, los cuales permiten verificar si el alimento está siendo consumido, así como el estado fisiológico de los organismos (por ejemplo muda, nivel de llenado del tubo digestivo etc.)

La frecuencia de la alimentación esta relacionada con la talla, temperatura y otros factores limitantes en el cultivo, en general la práctica de distribución múltiple diaria es preferible a la de una sola comida, más aún cuanto menor sea el tamaño de los individuos.

Otro factor importante es la disponibilidad del alimento, esto es: el número de partículas de alimento por camarón en cada alimentación, por ejemplo 2/camarón. En cultivos semi-intensivos donde hay pocos camarones, si se alimenta a 2 partículas por camarón se puede alimentar sólo una vez al día, pero en intensivo se necesitan al menos 4 alimentaciones. Considerando lo anterior se pone en evidencia la necesidad de poder disponer de diferentes tamaños de partículas en los alimentos balanceados.

BIBLIOGRAFIA

- Akiyama D. and Dominy W. 1989. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry. American Soybean Association, 15/1/89 Vol. 3 AQ 18, 50 pp.
- Akiyama, D. and Chwang, N.L. 1989. Shrimp feed requirements and feed management. In: Akiyama, D. Proceedings of the Southeast Asia shrimp farm management workshop. Thailand and Indonesia July 26-August 11, 1989. pp. 75-82.
- Al-Mohanna, S. Y. and Noh J.A. 1987. R-cells and the digestive cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea decapoda). Marine Biology 95, 129-137.
- Brun, G. and Wojtowicz, M. 1976. A comparative study of the digestive enzymes in the hepatopancreas of jonah crab (*Cancer borealis*) and rock crab (*Cancer irroratus*). Comp. Biochem. Physiol., 53 B:387391.
- Ceccaldi H.J.1986. Digestion et sécrétions digestives chez les Crustacés. Oceanis, Vol. 12, Fasc. 1, pp.3149
- Chow, K.W. 1980, Fish feed technology. Rome, FAO, report No. ADCP/REP/80/11 2 pp.
- Davis, A. and Gatlin III D.M, 1991. Dietary mineral requirements of fish and shrimp. In. Proceedings of the aquaculture feed processing and nutrition workshop. Thailand and Indonesia September 19-25, 1991. pp. 49-68.
- De Villez, E.J.1965. Isolation of the proteolytic enzymes from the gastric juice of the crayfish *Orconectes virilis* (Hagen). Comp. Biochem. Physiol., 14: 577586.
- De Villez, E.J. and Buschlen, K.; 1967. Survey of tryptic digestive enzyme in various species of crustacea. Comp. Biochem. Physiol., 21;541546.
- Galgani, F. 1985. Etude des Proteases Digestives de Crevettes *Peneides* (Crustacea Decapoda).

- Gates, B. and Travis, J. 1969. Isolation and comparative properties of shrimp trypsin. *Biochemistry*, 8 (11): 4483-4489.
- Gates, B. and Travis, J. 1973. Purification and characterization of carboxypeptidases A & B from the white shrimp *Penaeus setiferus*. *Biochemistry*, 12 (10): 1867-1874.
- Gibson, R. and Barker, P.L. 1979. The Decapod hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 17:285-346
- Grant, G.; Eisen, A. and Bradshaw, R.: 1981. Collagenolytic serine protease from fiddler crab (*Uca Pugilator*). *Meth. Enzymol.*, 80:722-753.
- Lee, P.; Blake, N. and Rodrick, G. 1980. A quantitative analysis of digestive enzymes for the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Proc. World Maric. Soc.*, 11; 392-402.
- Loizzi, R.F. 1971. Interpretation of crayfish hepatopancreatic functions based on fine structural analysis of epithelial cell lines and muscle network. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 113:420-440.
- 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.
- Martínez- Millan L. 1987. Métodos de evaluación, control y racionamiento en la alimentación práctica. In. *Alimentación en Acuicultura*. CAICYT. J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta (Editores) pp 295-325.
- Mendoza, R., Montemayor, J. y Aguilera, C. 1996. Quimioatracción en crustáceos: papel de moléculas homólogas. In: Eds. Cruz Suárez, L.E., Rique Marie, D. y Mendoza, R. *Memorias del 3er. Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. Monterrey, N.L. 11-13 noviembre, 1996. 1-35 p.
- Muramatsu, T. and Morita, T. 1981. Anionic trypsin-like enzymes from the crab *Enriocheir japonicus* De Haan, active in more acidic media. *Comp. Biochem. Physiol.* 70 B:527-533.
- Pfleiderer, G.; Zwilling, R. and Sonneborn, H. 1967. Eine protease vom molecular gewicht 11.000 und eine trypsinahuiliche fraktion aus *Astacus fluviatilis* Hoppe Seyler's A. *Physiol. Chem.*, 348:1319-1331.
- Rosenberry, B. 1991. *World shrimp farming 1991*. *Aquaculture Digest*, San Diego California. 45 pp.
- Tacon, A.C.J. 1987. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp - A training manual. 1. The essential nutrients. *FAO Field Document*, Project GCP/RLA/075/ITA, Field Document No.2, Brasilia, Brazil, 117 p.

- Tacon, A.C.J. 1987. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp -A training manual. 2. Nutrient sources and composition. FAO Field Document, Project GCP/RLA/075/ITA, Field Document No. 5/E, Brasilia, Brazil, 117 p.
- Trellu, J. and Ceccaldi, H. J. 1977. Variation des activités enzymatiques de l'hépatopancréas et du muscle de *Palaemon serratus* au cours du cycle d'intermue. C. R. Soc. Biol., 171 (1):115121.
- Van Wormhoudt, A. 1980. Régulation de l'activité de l'alfa-amylase a différentes températures d'adaptation en fonction de l'ablation des pédoncules oculaires et du stade de mue chez *Palaemon serratus*. Biol System. Ecol., 8:1931203.
- Zwilling, R. Dorsam, H.; Torff, H. and Rodl, J. 1981. Low molecular mass protease. Evidence for a new family of proteolytic enzymes. FEBS Lett., 127 (1): 7578.
- Wikins, J.F., 1976., Prawn biology and culture. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev., 14, 435-507. In H. Barnes Ed. Aberdeen University Press.

CARACTERIZACION DE LAS TRIPSINAS Y AMILASAS DE PENAЕUS VANNAMEI (CRUSTACEA DECAPODA): ADAPTACION A LA COMPOSICION DEL REGIMEN ALIMENTICIO

Alain Van Wormhoudt, G. Le Moullac, B. Klein y D. Sellos.

Station de Biologie Marine du Muséum National d'Histoire Naturelle et du Collège de France, BP 225, 29200, Concarneau.

E-mail: avw@sb-roscoff.fr

Traducción: Denis Ricque Marie y José María Viader

RESUMEN

Las tripsinas, entre las proteasas, y las amilasas, entre las carbohidrasas, son las enzimas más activas en *Penaeus vannamei*, un camarón de interés comercial, especialmente en Latinoamérica. Estas enzimas y sus cDNAs fueron caracterizados. En lo que respecta a las tripsinas, se reconocieron cinco isoformas y se analizaron sus cDNAs correspondientes, los cuales codifican una preproenzima de 225 aminoácidos conteniendo un supuesto precursor peptídico de 14 residuos y una secuencia señal altamente hidrofóbica de 14 aminoácidos. Dentro de la secuencia del zimogeno, se detectaron algunos sitios autocatalíticos (Int. J. Biochem. Cell Biol. 1996, 28, 551-563). Con respecto a las amilasas, dos isoformas fueron purificadas y caracterizadas; se hizo una selección en una biblioteca de cDNAs hepatopáncreaticos fue "cribada", y se aisló y determinó la secuencia completa de los dos cDNAs correspondientes. Se caracterizó una preenzima de 511 residuos conteniendo una señal hidrofóbica de 16 aminoácidos (J. Mol. Evol., 1996, 42, 543-551).

Se produjeron anticuerpos específicos para estas enzimas, los cuales permitieron determinaciones cuantitativas y estudios inmunocitoquímicos. Las enzimas estuvieron presentes en las células F y B, pero solo las células F parecen ser capaces de sintetizarlas.

Se estudió la adaptación al nivel de caseína dietarias en larvas y adultos, y los resultados obtenidos dependen de parámetros fisiológicos, especialmente el estadio de muda, de las condiciones de cultivo y de la relación de proteínas/carbohidratos en las dietas. En premuda, se encontró una estimulación de la síntesis de tripsina cuando la caseína aumentaba y los carbohidratos quedaban constantes; al contrario se encontró una inhibición cuando el incremento de la caseína era compensado por una disminución del almidón. No se observó respuesta con otras fuentes proteicas (gelatina, proteína de calamar o concentrado de solubles de pescado).

Respecto a las amilasas, una disminución de actividad se midió cuando la caseína dietaria aumentaba. Un resultado similar se obtuvo cuando el aumento de la caseína fue compensado por una disminución del almidón, sugiriendo que el nivel de proteína es igual de importante que el nivel de carbohidratos en el control de la actividad a-amilasica.

Se presentaron dos isoformas mayores cuando la dieta contenía 25% de proteína, y una sola cuando 40%. Para establecer el nivel de polimorfismo, un fragmento de 378 pares de bases se obtuvo por RT-PCR y fue secuenciado en los dos experimentos. Una posición discriminante mostró, en el caso de la dieta con 25% de caseína, que adenosina o guanosina eran presentes, dando asparagina o ácido aspártico y una diferencia en la carga eléctrica de las dos isoformas. Sin embargo, en la dieta con 40% de caseína, la adenosina fue encontrada en 100% de los cDNAs, lo que podría explicar la presencia de una sola isoforma (J.Exp. Mar. Biol. Ecol., 1996, en prensa).

Para entender los mecanismos de tales regulaciones, los genes correspondientes fueron estudiados. Los primeros resultados se obtuvieron con respecto a la caracterización de las secuencias de genes y confirmaron la existencia de dos familias, como sugerido por el análisis de las enzimas y de sus cDNAs, y la presencia de solo dos intrones. Los estudios sobre los promotores darán información sobre los elementos regulatorios presentes en los genes.

INTRODUCCION

La a-amilasa y la tripsina son las dos enzimas digestivas más importantes en el camarón *Penaeus vannamei*, cada una con su especificidad. La a-amilasa cataliza la hidrólisis del enlace α -1-4 de los azúcares. La tripsina, endoproteasa de la familia de las serin-proteasas, se caracteriza por un mecanismo catalítico común, implicando tres residuos aminoacídicos (histidina, ácido aspártico y serina) hidrolizando el enlace peptídico del lado carboxílico de la arginina o de la lisina. En los vertebrados esta enzima es sintetizada bajo la forma de un zimógeno inactivo, pero ningún zimógeno ha sido caracterizado en crustáceos.

La caracterización de las secuencias de ARN mensajeros codificando para estas enzimas en *Penaeus vannamei*, permite entender mejor la estructura, la función y la evolución de estas moléculas pero igualmente disponer de herramientas para estudiar la evolución de esos ARN mensajeros a lo largo de los ciclos biológicos y en particular en función de la adaptación nutricional. En los vertebrados, esta adaptación está muy bien establecida (Howard y Yalkim, 1963; Puigserver et al. 1985; Dagorn, 1986. Scheele, 1993). El efecto inductor de la caseína en la síntesis de la tripsina ha sido demostrado (Johnson et al., 1977): este efecto se sitúa a nivel de la transcripción (Lhoste et al., 1994). Asimismo, respecto a la amilasa, el efecto inductor del almidón se ha demostrado en la rata (Reboud et al., 1961; Johnson et al., 1977; Wicker et al., 1983; Giorgi et al., 1994). En los crustáceos, una adaptación de este tipo ha sido descrita en el camarón (Van Wormhoudt et al., 1980; Lee et al., 1984; Lee y Lawrence, 1982-1985; Moreau et al., 1993; Le Vay et al., 1993; Rodríguez et al., 1994). Sin embargo, este efecto es controvertido, y en la langosta no se ha podido poner en evidencia ninguna adaptación (Hoyle, 1973). Hemos retomado este trabajo con *Penaeus Vannamei*. La elección de la caseína como una buena fuente

de proteína fue evidente (Boghen et al., 1982; Aquacop, 1990; Cuzon et al., 1994) así como la selección del almidón soluble como una fuente de glucidos (Cruz-Suárez et al., 1994).

MATERIALY MÉTODO

En un primer experimento se alimentaron juveniles de *P. vannamei*, haciendo variar la tasa de caseína del alimento de un 25 a un 40%, mientras la tasa de glucidos se mantuvo constante. En un segundo experimento, se probó la calidad de proteína y dos concentraciones de ésta (25 y 40%), utilizando gelatina, harina de calamar, hidrolizado concentrado de pescado y caseína como referencia. La actividad específica de la tripsina y de las amilasas se midió al fin de la premuda (D1^{''}-D2) y al inicio de la misma (estadio D0) con substratos específicos y por inmunoelectroforesis. A nivel molecular, la cantidad de ARN mensajero de tripsina fue estimada por hibridación en mancha (dot-blotting) y el polimorfismo de los ARN mensajeros de la amilasa fue estimado por ensayos de retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y posterior secuenciación.

Los camarones *P. vannamei*, se cultivaron en el centro Ifremer del Pacífico (Tahiti) y los experimentos se realizaron en Concarneau (ver Le Moullac et al., 1996). La temperatura del agua marina fue de 25°C. La composición de las dietas se presenta en la Tabla 1. El experimento tuvo una duración de 21 días y al final los camarones se seleccionaron de acuerdo a su estado de muda (Drach y Tchernigotzveff, 1967), se pesaron y sus hepatopáncreas fueron muestreados 15 horas después de la última alimentación.

Tabla 1: Ingredientes incluidos en las dietas usadas para probar el efecto del nivel de caseína sobre la adaptación de las enzimas digestivas

Ingredientes (%)	CAS25	CAS31	CAS40	CAS48
Caseína	25	31	40	48
DL-metionina	0.8	1	1.3	1.5
L-Arginina	0.4	0.5	0.7	0.9
L-Lisina	0.6	0.75	1	1.25
Almidón	17	17	17	17
Celulosa	22.7	16.2	6.7	0
Otros	33.3	33.3	33.3	33.3
Energía teórica ^a (kcal/100g)	254	281	324	357

Otros ingredientes: aceite de hígado de bacalao 4%; lecitina de soya 4%; colesterol 0.7%; colina 0.2%; glucosamina 0.5%; sacarosa 3.5%; vitaminas* 2.6%; vitamina C 0.08%; minerales* 5.1%; fosfato disódico 7%; gelatina 3% (aglutinante); agar agar 3% (aglutinante).

*Kanazawa et al., 1977

^aChow, 1980

ANALISIS BIOQUIMICOS E INMUNOQUIMICOS

Los hepatopáncreas fueron homogeneizados con un Ultraturrax a 4C en un buffer de fosfatos 10 mM, pH7.5, y centrifugados 20 min a 55000g. Las proteínas del sobrenadante fueron cuantificadas por el método de Folin (Lowry et al., 1951), las tripsinas por el método de Erlanger et al. (1981) con BAPNA (N-Benzoil-L-Arginina-naphtyl amida) como sustrato y la amilasa con glucógeno como sustrato (Bernfeld, 1955). Los métodos de purificación ya han sido descritos (Le Moullac et al., 1996; Van Wormhoudt y Sellos, 1996). Se obtuvieron anticuerpos específicos de cobayo para tripsina y de conejo para amilasa. La dosificación inmunológica se realizó con el método de Weeke (1975) en “rocket”.

“TAMIZAJE” DEL BANCO DE CDNA Y ANALISIS DE PCR

El banco de cDNA utilizado contiene 5.8×10^6 fagos independientes y a sido construido en el vector lamda-ZAP II (Stratagene). El tamizaje con oligonucleotidos fue descrito tanto para la amilasa (Van Wormhoudt y Sellos, 1996) como para la tripsina (Klein et al., 1996).

Los ARN fueron extraídos a partir de muestras individuales de hepatopáncreas. Los ensayos de PCR se realizaron con la TaqPfu polimerasa y los fragmentos obtenidos se clonaron en el vector PCR-script (Stratagene). La secuencia de los fragmentos así clonados se analizó utilizando el kit USB de secuenciación doble cadena.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Caracterización de la a-amilasa

La a-amilasa fue purificada a partir de la glándula digestiva de *Penaeus vannamei*. Dos isoformas estuvieron presentes en iguales cantidades así como otra isoforma débilmente representada (Figura 1b). Con el fin de obtener información sobre sus secuencias, se realizó un hidrolizado tripsico y se determinó la secuencia de un peptido mayor. Un oligonucleótido degenerado permitió entonces al tamizaje de un banco de cDNA de hepatopáncreas previamente construido en el vector lamda-Zap. Aproximadamente un 0.2% de los clones se hibridaron con esta sonda, y los fragmentos más largos obtenidos fueron secuenciados. La a-amilasa madura se presenta bajo la forma de una cadena de 495 aminoácidos para las 3 isoformas secuenciadas (Figura 2). Diez nucleótidos y cuatro aminoácidos difieren entre la isoforma a y la isoforma b. En contraste, la isoforma c presenta 145 cambios nucleotídicos y 57 aminoácidos diferentes (Van Wormhoudt y Sellos, 1996), sugiriendo una evolución más antigua. Los tres aminoácidos del sitio catalítico (Asp, Glu, Asp.) están presentes así como 10 cisteínas. Un análisis por agrupamiento de los aminoácidos hidrófobos (HCA) demostró que la zona catalítica (zona A) se presenta bajo la forma de un barril de 8 hojas b paralelas rodeadas de 8 hélices a. Esta estructura es común para todas las glucosidasas y fue confirmada por cristalografía de rayos X en enzimas porcinas. Una comparación de las secuencias y un análisis filogenético muestra que la a-amilasa de camarón presenta el mismo grado de identidad con la porcina o de drosófila,

sugiriendo una antigua divergencia. Un anticuerpo específico permitió localizar la amilasa en las células F (Figura 3a y b).

2. Caracterización de la tripsina

La actividad de la tripsina presente en el jugo gástrico fue revelada con un sustrato específico (BAPNA). Tres isoformas mayores y dos menores se encontraron de este modo (Figura 1c). La enzima fue purificada por cromatografía de afinidad (Klein et al., 1996), y representa aproximadamente el 10% de la actividad proteasica total. El peso molecular, determinado por electroforesis con SDS (dodecilsulfato de sodio), se encuentra entre 31 y 31 kDa. La enzima se inactiva a pH inferior a 5 y el calcio le afecta poco, en contraste con la enzima de los vertebrados. La K_m medida con los BAPNAs como sustrato es de 0.01 mM aproximadamente, muy inferior a la del salmón (0.05 mM) o del res (0.5 mM). La eficiencia catalítica, medida por la relación kat/K_m , es de 300 mM/sec aproximadamente y es mucho más fuerte que para la tripsina de vertebrado.

Una secuencia consenso incluyendo los residuos 212 a 219 permitió definir un oligonucleótido y tamizar el banco de cDNA. El 1% de los clones fueron positivos. Después de varios tamizajes (Klein et al., 1996), cinco variantes fueron aisladas y secuenciadas. El inserto secuenciado más largo contiene una secuencia codificante completa de 801 pares de bases (pb) incluyendo el codón de iniciación y de terminación, así como una secuencia 3' de 51 pb no traducible (Figura 4). Esta parte 3' es común para las 3 variantes, aunque las otras dos son muy diferentes. Todas contienen el sitio de poli-adenilación AT(T/A)AA.

La parte traducible contiene 256 aminoácidos incluyendo el codón de iniciación de la metionina, un péptido señal de 14 aminoácidos y una secuencia zimógena de 14 residuos. El peso molecular deducido es de 25kDa, inferior a lo encontrado por electroforesis con SDS, lo que sugiere que la proteína es glicosilada. Todas las pepsinas presentan los aminoácidos del sitio catalítico, histidina 57, aspartato 102 y serina 195. También están presentes el ácido aspártico 189 importante para la fijación del sustrato y los residuos glutamato 70, asparagina 72, valina 75, glutamato 77 y glutamato 80 los cuales participan en la fijación del calcio. Se caracterizaron ocho cisteínas mientras solo seis fueron encontradas determinadas en *Astacus* y 12 en los vertebrados.

La comparación de las secuencias sugiere que las tripsinas secuenciadas pueden ser divididas en dos familias. La composición difiere entre las dos familias por 23 aminoácidos, mientras que dentro de una misma familia solo seis aminoácidos varían.

La secuencia señal presenta el mismo carácter hidrofóbico que todas las secuencias señal, así como un residuo lisina, ubicado inmediatamente después de la metionina, y un residuo alanina que precede a la secuencia zimógena. Esta secuencia se caracteriza por la presencia de dos parejas arginina-lisina y arginina-arginina que podrían responder a sitios de autocatalisis. No se detectó ninguna secuencia Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, de las que pueden ser reconocidas por enterocinasas en vertebrados. Las únicas homologías con la secuencia zimógena de un vertebrado conciernen la presencia de una prolina en segunda posición, así como el sitio de corte

lisina-isoleucina característico de la liberación de la proteína madura.

De un punto de vista evolutivo, la tripsina de *Penaeus* es muy cercana a la de *Astacus* y presenta alrededor de un 40% de similitud con la tripsina de insecto y la de vertebrado.

En lo que concierne la localización de la tripsina, el hecho sobresaliente es su presencia en las células B, al lado de las células F (Fig. 3c y d). Sin embargo, un análisis fino de la reacción permite pensar que la síntesis de la tripsina ocurre únicamente en las células F, confirmando los resultados obtenidos para la amilasa y para la astacina por Vogt. El papel de las células B consistiría en reciclar las macromoléculas y en particular ciertas enzimas fuertemente expresadas y muy estables, como es el caso de la tripsina. Eso podría explicar que el volumen de producción aparente de esas enzimas en el jugo gástrico es siempre muy elevado, y refleja lo encontrado en vertebrados, mientras la estabilidad de los ARNs mensajeros correspondientes es corta (Fig.5).

3.Adaptaciones nutricionales

La estabilidad sobresaliente de las enzimas digestivas en el jugo gástrico y la nueva interpretación del papel de las células B nos llevaron a utilizar, a parte de la medida de la actividad específica (que puede variar independientemente de la concentración de enzima) y de la medida de la cantidad de enzima por inmunodosificación (que mide tanto las enzimas nuevamente producidas como todas las presentes en las células del hepatopáncreas), la medida de la cantidad de ARN mensajero específico la cual, ella si, refleja la cantidad de enzima susceptible de ser sintetizada rápidamente.

En lo que concierne la α -amilasa, la disminución de la actividad y de la cantidad observada (Figura 6 a y b), cuando la cantidad de caseína aumenta de 25 a 40% en la dieta, corresponde a la desaparición de una isoforma (Fig. 6c). Se observan dos isoformas principales para un nivel de caseína de 25%, mientras una sola para un nivel de 40%. Con el fin de determinar el nivel al cual se establece esta regulación, los ARN mensajeros fueron extraídos en las dos condiciones experimentales. Un fragmento de 378 pares de bases fue obtenido usando oligonucleótidos consenso en ensayos de PCR. La clonación y la secuenciación de los clones obtenidos permitió mostrar que en el caso de las dietas conteniendo 25% de caseína, 1/3 de los clones incluyen una adenosina en posición 8 (Fig.2) y 2/3 una guanosina, mientras en el caso de las dietas con 40% de caseína, todos tienen una adenosina en esta posición. El cambio de una base genera un cambio de aminoácido entre ácido aspártico y aspargina, y conlleva un cambio de carga correspondiente a una isoforma de la amilasa. Con cualquier proteína utilizada, siempre se observa esta expresión diferencial (Le Moullac et al., 1996).

En lo que concierne a la tripsina, la actividad específica aumenta con el contenido en caseína de la dieta, aparentemente .sin ningún cambio en las diferentes isoformas. Esos cambios también son medidos por inmunoelectroforesis (Figura 7 a y b). La cantidad de los ARN mensajeros también es proporcional a la actividad específica lo que confirma que se trata de un efecto transcripcional (Figura 7c). Sin embargo, esas variaciones son pequeñas comparadas con las encontradas en los vertebrados. Además, en el estadio D0, se observa un efecto negativo (Figura

8) e igualmente en el fin de la pre-muda cuando el regimen se mantiene isoenergético haciendo variar el nivel de almidón (Le Moullac et al., 1996).

Así, en el caso de un cambio nutricional de larga duración (21 días), la medida de la actividad específica de las enzimas digestivas si refleja lo que pasa a diferentes niveles de regulación. Cuando se trata de una adaptación a corto plazo, conviene sin embargo utilizar la medida de la cantidad de ARN mensajero en lugar de la actividad enzimática para estimar la tasa de variación. En los crustáceos, también la elección del estado de muda es primordial, como ya lo vimos, y podría explicar los resultados diferentes obtenidos por varios autores de experimentos de adaptación nutricional.

4. Caracterización del gen de la tripsina

Con el fin de ir más lejos en el conocimiento de los mecanismos de regulación, un estudio de los genes es indispensable. Este estudio ya fue iniciado para la tripsina de *P. vannamei*, el conjunto de la parte codificante del gen de la tripsina corresponde a tres exons y dos introns muy cortos, mientras que en la rata, corresponde a cinco intrones. Esta particularidad se encuentra también en los insectos en donde dos intrones se observan en *Choristoneura* y ninguno en la drosófila. Además, en el camarón las dos familias se caracterizan por intrones de diferente tamaño (Figura 9). Se están desarrollando experimentos para investigar la parte reguladora con el fin de estudiar los mecanismos de control.

REFERENCIAS

- Aquacop (1990). Influence of the quality of protein on growth and survival of three penaeid species. In "Proc. Adv. Tropical Aquaculture, Tahiti, Feb-20-March-4th 1989, IFREMER, p 9.
- Bernfeld P. (1955). Sur une méthode de dosage des amylases a et b. In "Methods in Enzymology" Colowick, Kaplan ed., Acad. Press N.Y.,1 : 149-154.
- Boghren A.D., Castell J.D., Conklin D.E. (1982). In search of a reference protein to replace "vitamin-free casein" in Lobster nutrition studies. *Can. J. Zool.*, 60 : 2033-2038.
- Chow K.W. (1980). Nutritional bioenergetics in feedstuffs. in "Fish Feeds Technology" ADCP eds., FAO Rome, 80/11, 22-27 ; 113-168.
- Cruz-Suarez L.E., Ricque-Marie D., Pinal-Mansilla J.D., Wesche-Ebelling D. (1994). Effect of different carbohydrate sources on the growth of *Penaeus vannamei*; economical impact. *Aquaculture*, 123 ; 349-360.
- Cuzon G., Guillaume J., Cahu C. (1994). Composition, preparation and utilization of feeds for Crustacea. *Aquaculture*, 124 : 253-267.
- Dagorn J.C. (1986). Mechanism of pancreatic adaptation to diet. *Biochimie*, 68 : 329-331.

- Davis B.J. (1964). Disc electrophoresis-II : method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121 : 404-427.
- Drach P., Tchernigovtzeff C. (1967). Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. *Vie et Milieu*, 18 ; 595-617.
- Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W. (1961). The preparation and properties of two chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 95 : 271-278.
- Giorgi D., Bernard R., Lapointe R., Dagorn J.C. (1984). Regulation of amylase messenger RNA concentrations in rat pancreas by food content. *The Embo J.* , 3 (7) ; 1521-1524.
- Howard F., Yarkin J. (1963). Effect of dietary change upon the amylase and trypsin activities of the rat pancreas. *Brit. J. Nutr.*, 17 ; 281-294.
- Hoyle J. (1973). Digestive enzyme secretion after dietary variations in the American lobster (*Homarus americanus*). *J. Fish. Res. Board Canada*, 30 : 1647-1653.
- Johnson A., Hurwitz R., Kretchmer N. (1977). Adaptation of rat pancreatic amylase and chymotrypsinogen to changes in diet. *J. Nutr.*, 107 ; 87-96.
- Kanazawa A., Teshima S., Tokiwa S. (1977). Nutritionnal requirements of prawn. VII Effect of dietary lipids on growth. *Nippon Suisan Gakkaiashi*, 43 : 849-856.
- Klein B., Le Moullac G., Dellos D., Van Wormhoudt A. (1996). Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda): use in assessing gene expression during the moult cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 28 ; 551-563.
- Lee P.G., Lawrence A.L. (1982). A quantitative analysis of digestive enzymes in penaeid shrimp; influence of diet, age and species. *Amer. Physiol.*, 25 : 241-249.
- Lee P.G., Smith L., Lawrence A. L. (1984). Digestive protease of *Penaeus vannamei* Boone : relationship between enzyme activity, size and diet. *Aquaculture*, 42 : 225-239.
- Lee P.G., Lawrence A.L. (1985). Effects of diet and size on growth, feed digestibility and digestive enzyme activities of the marine shrimp, *Penaeus setiferus* Linnaeus. *J. World Maricul. Soc.*, 16 ; 275-287.
- Le Moullac G., Van Wormhoudt A., AQUACOP (1994). Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fiber levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapoda). *Aquat. Living Resour.* 7 : 203-210.
- Le Moullac G., Klein B., Sellos D., Van Wormhoudt A. Adaptation of trypsin, chymotrypsin

- and α -amylase to casein and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). (1996) *J Exp. Mar Biol Ecol.* (en prensa)
- Le Vay L., Rodriguez A., Kamarudin M.S., D.A. Jones (1993). Influence of live and artificial diets on tissue composition and trypsin activity in *Penaeus japonicus* larvae. *Aquaculture*, 118 : 287-297.
- Lhoste E.F., Fiszlewicz M., Gueugneau A.M., T. Corring (1994). Adaptation of exocrine pancreas to dietary proteins: effect of the nature of protein and rat strain on enzyme induction and messenger mRNA levels. *J. Nut. Biochem.*, 5 : 84-94.
- Lowry O., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.S. (1951). Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275.
- Moreau G., Henocque Y., Van-Wormhoudt A., Martin B.J., Ceccaldi H.J. (1985). Adaptations biochimiques à des aliments composés et croissance chez le homard juvénile, *Homarus americanus* L. : résultats préliminaires. *Aquaculture*, 48 ; 313-321.
- Puigserver A., Wicker C., Gaucher C. (1985). Aspects moléculaires de l'adaptation des enzymes pancréatiques et intestinales au régime alimentaire. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 25 ; 787-802.
- Reboud J.P., Ben Abdeljlil A., Desnuelle P. (1961). Variation de la teneur en enzymes du pancréas de rat en fonction de la composition des régimes. *Bioch. Biophys. Acta*, 58: 326-337.
- Rodriguez A., Le Vay L., Mourente G., Jones D.A. (1994). Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. *Mar. Biol.*, 118: 45-51.
- Scheele G.A; (1993). Regulation of pancreatic gene expression in response to hormones and nutritional substrates in " The Pancreas : Biology, Pathology and disease. " II edition, Vay Liang W., GO et al, Raven Press N.Y. ; 103-119.
- Van-Wormhoudt A., Ceccaldi H.J., Martin B. (1980). Adaptation de la teneur en enzymes digestives de l' hépatopancréas de *Palaemon serratus* (Crustacea Decapoda) à la composition d' aliments expérimentaux. *Aquaculture*, 21 ; 63-78.
- Van-Wormhoudt A., Sellos D. (1996). Molecular cloning and sequencing of three cDNAs that encode amylase in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *J. Mol. Evol.* 42, 543-551.
- Weeke B. (1975). Rocket immunoelectrophoresis. In *A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis*. Oslo University. (Edited by Axelsen N., Kroll J. and Wechen B.), 37-46.
- Wicker C., Scheele G., Puigserver A. (1983). Adaptation au régime alimentaire du niveau des

ARNm codant pour l'amylase et les protéases à sérine pancréatique chez le rat. C.R. Acad. Sc., 297 : 281-284.

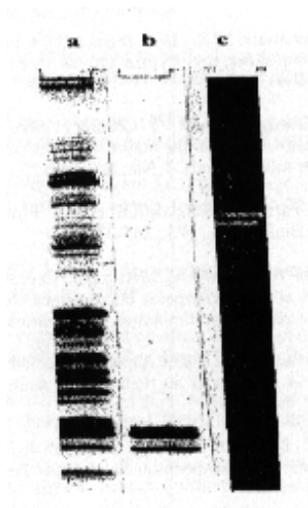


Figura 1. Caracterización de las proteínas del hepatopáncreas (a), de la tripsina (b), y de la alfa-amilasa (c) de *Penaeus vannamei*.

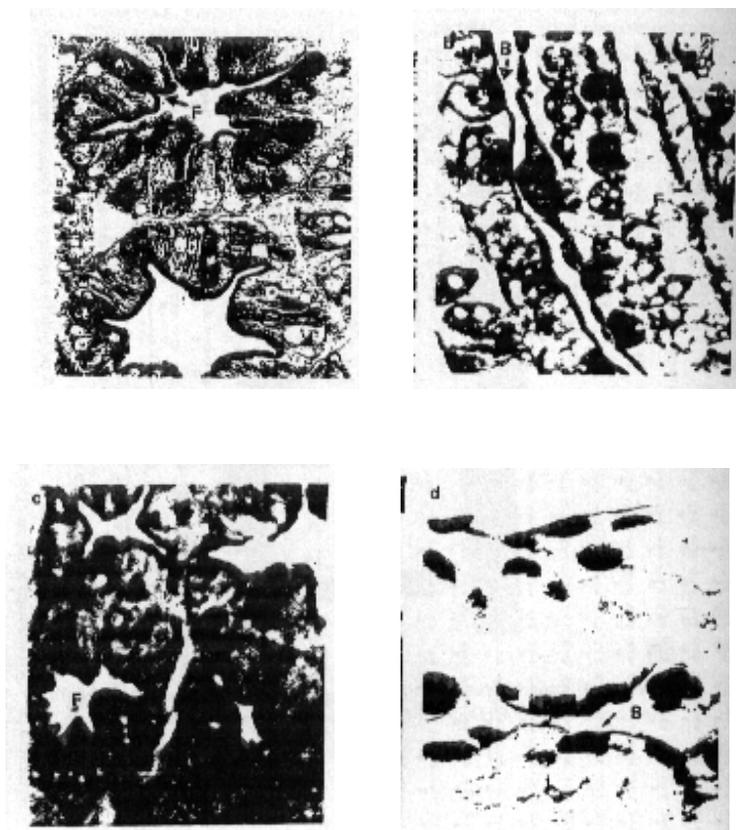


Figura 3. Localización inmunocitoquímica de la alfa-amilasa y de la tripsina en *Penaeus vannamei*.

- a) Corte transversal de los túbulos del hepatopáncreas mostrando la existencia de numerosos gránulos en las células F gracias al anticuerpo anti-amilasa.
- b) Corte longitudinal idem a.
- c) Corte transversal de túbulos del hepatopáncreas mostrando la existencia de numerosos granulos en las células F con el anticuerpo anti-tripsina.
- d) Corte longitudinal idem c: algunas células B muestran una fuerte reacción inmunocitoquímica en donde se distingue rastros de fusión de lisozomas con vesículas de endocitosis.

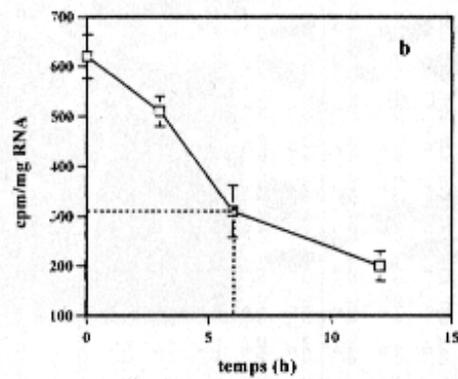
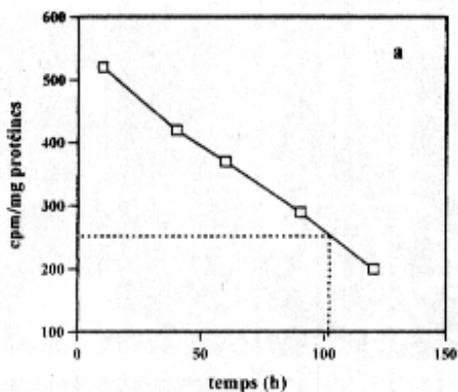


Figura 5. Estabilidad de las proteínas del hepatopáncreas y de los ARN mensajeros de la tripsina del camarón.

a) Proteínas: después de haber marcado las proteínas a saturación con leucina triada, las proteínas son extraídas y la radioactividad medida a diferentes tiempos (“temps”).

b) ARN mensajero: después de haber inyectado actinomicina D, los ARN totales son extraídos, hibridados con una sonda específica de la tripsina y denominados.

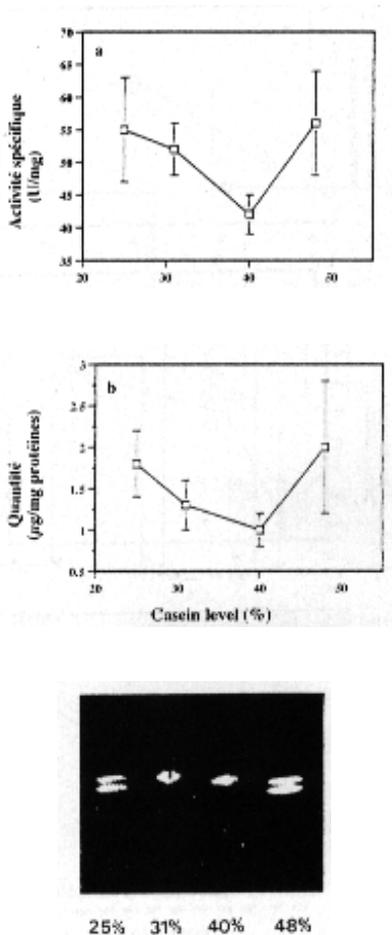


Figura 6. Efecto de diferentes concentraciones de caseína del régimen alimenticio sobre la alfa-amilasa de *Penaeus vannamei* en estadio D2 del ciclo intermuda.

- a) Actividad específica.
- b) Cantidad medida por inmunoelectroforesis.
- c) Isoformas reveladas por electroforesis (Van Wormhoudt y Sellos, 1996).

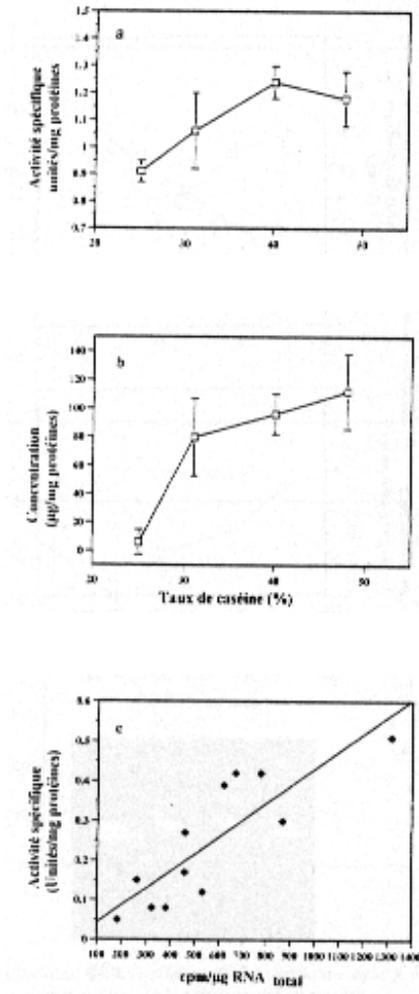


Figura 7. Efecto de diferentes concentraciones de caseína (%) en la dieta sobre la tripsina de *Penaeus vannamei* en el estadio D2 del ciclo de intermuda.

- a) Actividad específica.
- b) Cantidad medida por inmunoelectroforesis
- c) Relación entre la actividad específica y la cantidad de ARN mensajeros específicos.

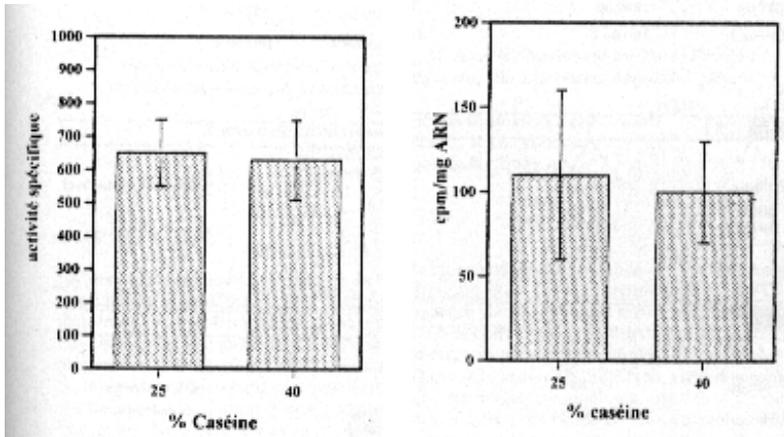


Figura 8. Efecto de diferentes concentraciones de caseína en el régimen alimenticio sobre la tripsina de *Penaeus Vannamei* en estadio D0 del ciclo de intermuda.

a)Actividad específica; b)Cantidad de ARN mensajeros.

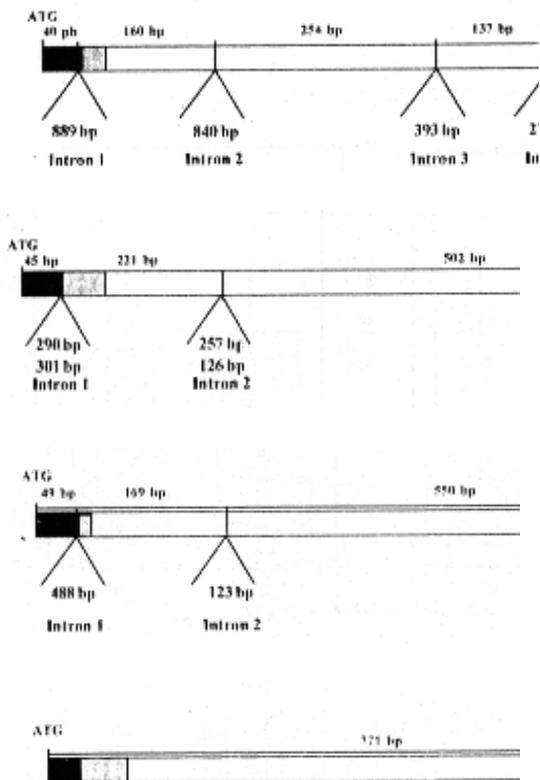


Figura 9. Estructura comparada de los genes de la tripsina en diferentes especies.

TECNOLOGIA ENZIMATICA EN ACUICULTURA

Fernando Luis García-Carreño, M. Angeles Navarrete del Toro, Patricia Hernández-Cortés, J. Marina Ezquerro, Elisa Serviere, Alejandro Maeda.

**Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
AP 128, La Paz, BCS. México
E-mail: fgarcia@cibnor.mx**

INTRODUCCION

La tecnología enzimática, una rama de la biotecnología ha resultado de gran utilidad para la acuicultura (Díaz *et al.* 1995, García-Carreño *et al.* 1996, Ezquerro *et al.* 1996). La enzimología es importante porque la vida depende de una compleja red de reacciones químicas catalizadas por enzimas específicas. La enzimología se ha desarrollado rápidamente durante los últimos años debido a su importancia para un gran número de ciencias como la: bioquímica, microbiología, genética, zoología, zootecnia, nutrición, ciencia y tecnología de alimentos, farmacología, patología, fisiología, inmunología, medicina y biología molecular. Investigadores en universidades, institutos y centros de investigación, industria privada, granjas de cultivo, etc. de todo el mundo dedican atención a aspectos básicos y aplicados de la enzimología. La enzimología ha avanzado a niveles de conocimiento como: estructura estereoquímica de sitios catalíticos y accesorios en la molécula de la enzima, mecanismos de estabilización de la cadena polipeptídica (ingeniería de proteínas), afinidad y especificidad por el sustrato, mecanismos de inhibición, eficiencia catalítica, actividad molecular, mecanismos de catálisis, etc. La aplicación del conocimiento sobre enzimología para resolver problemas prácticos es lo que conocemos como tecnología enzimática. La única forma de controlar los fenómenos que rigen una actividad productiva: pasar de la artesanía a la tecnología es conociendo estos fenómenos a el mayor detalle posible. De donde se deduce uno de los principios que rigen nuestra investigación: la única enzimología aplicada es la enzimología básica.

Los organismos en cultivo toman componentes de la dieta y los utilizan para formar las moléculas de construcción de su cuerpo. Otras son usadas como combustible para dar energía a actividades como movimiento, reproducción, defensa contra parásitos y depredadores, etc. (catabolismo). La síntesis de moléculas para la construcción del cuerpo del organismo se realiza utilizando la energía derivada del catabolismo (anabolismo). Catabolismo y anabolismo forman el metabolismo. Este está dirigido y modulado por enzimas específicas para cada una de las reacciones químicas.

El conocimiento de las reacciones involucradas en cada uno de los aspectos de interés para el acuicultor beneficiará a la actividad. Algunos ejemplos son: 1) conocimiento del sistema digestivo para identificar mejores formulaciones, presentación de las dietas, reducción de efectos indeseables como compuestos antifisiológicos presentes en los ingredientes de la formulación, inclusión de factores promotores del crecimiento, 2) fisiología bioquímica de la reproducción, 3) mecanismos de defensa contra agentes infecciosos, 4) endocrinología, 5) mecanismos de patogénia, 6) biología molecular y mejoramiento genético, etc. En todos los ejemplos los estudios sobre enzimología y otras ciencias repercutirá en transformar la acuicultura de una actividad artesanal a una actividad tecnificada. Esto gracias a la posibilidad de conocer la forma como los organismos realizan sus funciones y con el uso de este conocimiento modificar y controlarlas para beneficio de la actividad productiva.

El componente más importante en una dieta para acuicultura es la proteína, debido a: 1) el costo de los ingredientes protéicos y 2) el requisito nutricional de los organismos. En este documento se abordará la experiencia que el grupo de enzimología del CIBNOR ha realizado sobre el uso del conocimiento sobre enzimología, principalmente enfocado a proteinasas y un enfoque general del estado del conocimiento en enzimología de nutrición en acuicultura y perspectivas de la investigación. Se han estudiado a la fecha 1) decápodos como la langostilla (*Pleuoncodes planipes*) de la costa occidental de la península de Baja California, crayfish (*Pacifastacus astacus*) del río Sacramento en California, camarón blanco (*Penaeus vannamei*) del pacífico sur de México y camarón café (*Penaeus californiensis*) del pacífico norte de México, y recientemente crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) de Suecia, 2) peces como la dorada (*Sparus aurata*) del mediterráneo y cabrilla (*Paralabrax maculatufasciatus*) del pacífico mexicano y 3) moluscos como abulón (*Haliotis fulgens*) de la costa occidental de la Baja California.

Los estudios sobre enzimas en nutrición se han dedicado principalmente a reconocer que enzimas se encuentran presentes en el sistema digestivo de los organismos en cultivo. Sin embargo, la mayoría de los estudios solamente hacen una descripción de la presencia de enzimas particulares. Otros estudios, por fortuna los menos, solo son descripciones de actividades que ellos llaman actividad proteolítica total en extractos crudos. Estos estudios son muy superficiales y adolecen de que generalmente están enfocados a buscar condiciones óptimas de actividad de la(s) enzimas o extractos enzimáticos crudos. Esta información solamente es útil cuando es la parte experimental preliminar y busca definir condiciones operacionales de evaluación en el laboratorio, principalmente para aumentar la sensibilidad de los ensayos y minimizar el consumo del extracto enzimático, que en algunos casos es crítico, como en los estudios en larvas. Si estos estudios no se continúan y tratan de entender la participación de las enzimas en la fisiología, como mejorar su participación y tecnificar cada proceso fisiológico, no aportan nada al conocimiento. Un ejemplo típico es la búsqueda de la mal llamada temperatura óptima de actividad de una enzima. La temperatura máxima a la que una enzima trabaja es solamente una condición operacional porque 1) es fuertemente dependiente del tiempo que dura el ensayo de evaluación de la actividad (Stauffer 1989 y Whitaker 1994). La Figura 1 muestra como la “temperatura óptima” es función del tiempo que tarda la reacción. En el caso de la medición de actividad de proteinasas “totales” generalmente se utiliza un substrato protéico. Estos ensayos son de los llamados de punto final y generalmente duran varios minutos. Así, la temperatura

máxima encontrada no es una propiedad intrínseca de la enzima sino impuesta por el ensayo. Desafortunadamente este no es el único ejemplo de malinterpretación de las evaluaciones a propiedades de enzimas y el problema radica en la pobre preparación en enzimología formal de los investigadores. La mayoría de los interesados jamás cursaron una materia en enzimología y lo más cercano fue una bioquímica general. Por otro lado, la aparente simplicidad de los ensayos para evaluar actividad enzimática entusiasma a los legos a involucrarse en estudios, que al no ser adecuadamente interpretados no contribuyen al conocimiento.

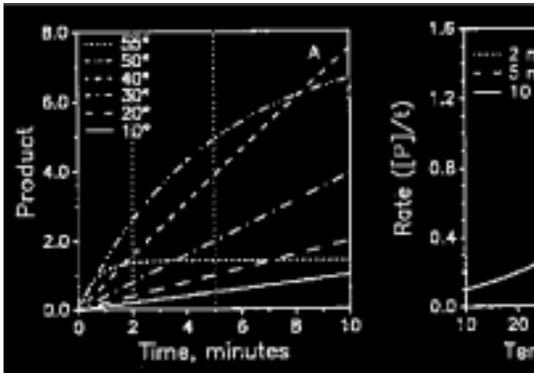


Fig. 1 Efecto del tiempo de reacción en la “temperatura óptima”.
Modificado por Stauffer (1989).

TÉCNICAS EN EL ESTUDIO DE PROTEINASAS

Técnicas para la detección y cuantificación de la actividad de proteinasas y de inhibidores de proteinasas es una necesidad creciente. Una variedad de metodologías han sido implementadas, incluyendo un número creciente de sustratos. En esta revisión incluimos técnicas que han sido implementadas en el Laboratorio de Enzimología del CIBNOR y que han sido empleadas en una variedad de organismos: crustáceos, moluscos y peces. Inhibidores en leguminosas han sido también evaluados por esta técnica (García-Carreño *et al.* 1996).

El sustrato más usado en la evaluación de la actividad proteolítica en preparaciones biológicas es la caseína o alguno de sus derivados como la azocaseína. Caseína y sus derivados son usados a pHs neutros y alcalinos. Para enzimas con actividad a pH ácido, la hemoglobina es el sustrato, dada la insolubilidad de la caseína a pHs menores a 6.0. Un método sencillo para la cuantificación de actividad enzimática se da en la Tabla 1 (ver detalles de esta técnica en García-Carreño 1992). Además da información para conocer la clase a la que pertenece la proteinasa, empleando inhibidores sintéticos clase-específicos. La Tabla 1 también puede ser usada cuando se desee evidenciar la presencia de inhibidores de proteinasas. Usando una enzima de cada clase y enzimas específicas se podrá identificar la especificidad del inhibidor.

Tabla 1. Ensayo para actividad de proteinasas e inhibidores

Número de tubo	1-3 ¹	4-6 ²	7-9 ³	10-12 ⁴
Amortiguador ⁵ extracto enzimático	500µL	500µL	500µL	500µL
Solución de inhibidor	5-20µL	5-20µL	5-20µL	5-20µL
Solvente de inhibidor	10µL	—	—	—
		—	—	10mL
Incubación		10-60 min a 25-65 °C ⁶		
TCA ⁷	—	—	0.5 ml	—
Substrato ⁸	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Incubación		10-60 min a 25-65 °C ⁶		
TCA ⁸	—	—	—	0.5 ml
Centrifugar		6500 g 5 min		
registrar absorbancia a 366nm		lecturas		

Nota: ¹ ensayo de inhibición; ² actividad; ³ control del extracto enzimático (algunos extractos crudos absorben a 366 nm por la presencia de carotenoides u otras sustancias amarillas); ³ control del solvente del inhibidor (algunos solventes para los inhibidores pueden modificar la actividad enzimática); ⁵ generalmente 50 mM Tris/HCl, pH 7.8; ⁶ el tiempo y la temperatura de incubación depende de la termoestabilidad de la enzima y el periodo en el cual la reacción es lineal. La temperatura para enzimas de organismos termófilos puede ser hasta 65°C; ⁷ 20 % ácido tricloroacético; ⁸ 1.5% azocaseína en 50 mM Tris/HCl, pH 7.8.

La evaluación de las propiedades cinéticas de proteinasas es complicada por dos hechos: 1) la naturaleza del sustrato: una proteína y 2) a la especificidad de la enzima. Las proteinasas reconocen el lado carboxilo de un residuo de amino ácido específico, formando el enlace peptídico a hidrolizar. Cada vez que la enzima hidroliza un enlace peptídico, la concentración molar del sustrato aumenta, en lugar de disminuir, como en la mayoría de las reacciones enzimáticas. Por esta razón, se requiere de sustratos sintéticos que imitan las estructuras involucradas en un enlace peptídico. Generalmente son residuos de aminoácidos específicos para cada proteinasa, que tienen bloqueado el extremo amino por algún grupo químico que simula la continuación de la proteína. En el extremo carboxilo se une, químicamente, un grupo cromógeno como *p*-nitroanilida o uno fluorescente, lo que genera el enlace peptídico a hidrolizar y una forma fácil de detección de la hidrólisis. La hidrólisis de un sustrato sintético conocido permite la identificación de la especificidad de la enzima a estudiar y con un juego de varios sustratos e inhibidores se puede clasificar a una enzima. El uso de sustratos sintéticos da otra ventaja. Con ellos es posible realizar ensayos de actividad del tipo cinéticos; esto es aquellos que permiten seguir el curso de la reacción conforme esta está ocurriendo. Estos son los métodos más precisos de evaluación de actividad enzimática ya que permiten calcular propiedades cinéticas de las enzimas como *km*, *keat*, eficiencia catalítica, etc. Estas propiedades son importantes por que definen a una enzima y en el caso de organismos poiquiloterms, como los usados en acuicultura, fuertemente influenciadas por la temperatura.

El estudio de reducción de la actividad enzimática por inhibidores de proteinasas, como los encontrados en leguminosas y otros ingredientes de dietas es posible con ensayos sencillos. La Tabla 1 da una rutina de ensayo. Esta evaluación debe ser incluida en los estudios de nutrición dado el efecto de los inhibidores sobre el sistema digestivo.

pHSTAT

La hidrólisis de enlaces peptídicos en una proteína por una proteinasa es una de las formas de modificación enzimática postraduccional a la proteína. Si bien el ejemplo típico es la digestión de proteína para aprovechar los aminoácidos de la proteína de la dieta, el fenómeno es más general y se presenta en la activación de proenzimas y hormonas proteicas. La detección de la hidrólisis de una proteína no es posible de ser realizado por ensayos cinéticos espectrofotométricos, razón por la que se ha buscado alternativas. La pérdida de viscosidad de una solución proteica y la evaluación de los péptidos producto de la hidrólisis no son precisos y demandan equipo adicional como HPLC. La solución al problema es la detección de los carboxilos liberados por la hidrólisis enzimática. El grupo carboxilo a pH alcalino se disocia y es titulado por una bureta automática. El dispositivo se conoce como pHstat ya que al titular mantiene el pH constante durante la reacción, con la ventaja adicional de evitar cambios en el pH que desnaturalicen a la enzima. Su aplicación está restringida a enzimas con actividad a pH alcalino. Si el equipo esta conectado a una computadora, la información se captura automáticamente y genera una gráfica que representa el consumo de la solución de NaOH, necesaria para mantener el pH constante. El mismo programa transforma estos datos digitalizados en una gráfica de “grado de hidrólisis” (GH) que es una medida del progreso de la hidrólisis de la proteína. El programa usa el algoritmo a continuación para calcular el GH.

$$GH = (1 / a \times \text{htot}) \times (B \times Na / MP) \times 100\%$$

donde B = álcali estandar (L) requerido para mantener constante el pH de la mezcla de reacción a 8.0; Na = normalidad de la base; MP = la masa (kg) de la proteína; a = $10 \text{ pH-pK} / 1 + 10 \text{ pH-pK}$ (AdlerNissen, 1986).

El GH es una medida del porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados, así que teóricamente un GH de 4 significa que cuatro de cada cien enlaces en la molécula de proteína han sido hidrolizados. Esta técnica ha sido usada por nosotros para predecir la digestibilidad de proteína en camarón blanco (Ezquerro et al. 1996). Los ensayos de digestibilidad de proteína en organismos acuáticos demandan tiempo y son caros dado que se requiere instalaciones que permitan evaluar un número significativo de organismos, al menos por triplicado para dar validez estadística al ensayo y los resultados son afectados por factores ambientales. Además, a lo mas que se puede aspirar es a evaluar una digestibilidad aparente. Nuestro trabajo fue diseñar una técnica de laboratorio que tuviera una buena correlación con la digestibilidad aparente in vivo. Para esto seleccionamos una técnica muy sensible de detección de la hidrólisis de la proteína en combinación con el empleo del mismo grupo de enzimas digestivas del camarón. Para fines comparativos, incluimos una serie de ensayos con enzimas comerciales. La técnica predijo mejor la digestibilidad cuando se usaron enzimas del camarón que una mezcla de enzimas comerciales ($r_2 = 0.77$ y $r_2 = 0.71$, respectivamente). La Figura 2 muestra el GH de proteína en diferentes fuentes por enzimas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*). La Figura 3 muestra la comparación de digestibilidad aparente con digestibilidad in vitro usando la técnica de pHstat.

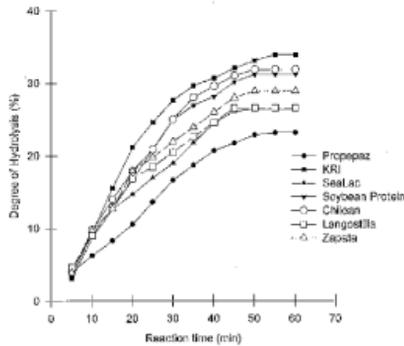


Figura 2. Grado de hidrólisis de ingredientes protéicos por enzimas de camarón blanco. Modificado de Ezquerro et al. 1996

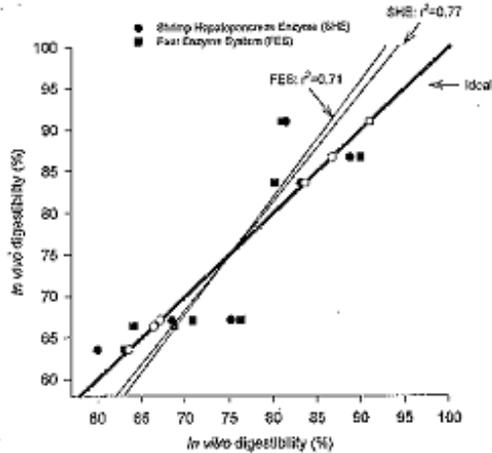


Figura 3. Correlación entre digestibilidad aparente in vivo y digestibilidad in vitro (grado de hidrólisis). Modificado de Ezquerro et al. 1996.

La técnica fue sensible a la presencia de inhibidores de proteinasas en insumos proteicos (García-Carreño et al. 1996b). Inhibidores de proteinasas en semillas de leguminosas fueron probados usando enzimas comerciales y extractos de hepatopáncreas de camarón café (*Penaeus californiensis*) y blanco (*Penaeus vannamei*). Extractos de semillas de palo fierro (*Olneya tesota*), palo blanco (*Lysiloma candida*), soya (*Glycine max*), gandul (*Cajanus cajan*), palo verde (*Cercidium floridum* peninsulare), y garbanzo (*Cicer arietinum*) inhibieron desde 35 hasta 60% la actividad proteolítica del extracto de camarón blanco y desde 39 hasta 47% del de camarón café. Este estudio permitió demostrar que si bien los inhibidores en semillas de leguminosas reducen significativamente la actividad de las enzimas del hepatopáncreas de camarón, un tratamiento físico elimina drásticamente el efecto antifisiológico en las harinas de semillas.

SUBSTRATO-SDS-PAGE

Una técnica muy útil en el estudio de la composición y peso molecular de proteinasas en mezclas crudas y de pureza de fracciones purificadas es la electroforesis en gel de poliacrilamida, revelando para actividad enzimática (substrate-SDS-PAGE). Varios métodos han sido descritos. Uno de ellos evita la mayoría de los problemas técnicos y ha sido usado para el estudio de extractos de peces, crustáceos y moluscos (García-Carreño et al. 1993). La técnica consiste en revelar una placa de electroforesis en la que fue incluida una muestra biológica que contenga proteinasas. La placa se sumerge sucesivamente en una solución de sustrato, generalmente caseína y después en solución de Coomassie para teñir el sustrato no digerido.

Áreas claras sobre un fondo azul indican la(s) zona(s) en la(s) que una proteinasa migró. La comparación con bandas de proteína de peso molecular conocido permite calcular el peso molecular de las proteinasas. Todas las enzimas estudiadas han mantenido la actividad a la concentración de SDS en el gel de poliacrilamida. Esto es resultado de que todas las proteinasas conocidas, excepto los proteasomas (Hilt y Wolf 1996), son monoméricas y por lo tanto refractarias al SDS.

Esta técnica también puede ser usada para detectar inhibidores proteicos de proteinasas. Después de la electroforesis, la placa de gel es sumergida en una solución de una proteinasa, aquella para la cual se sospecha el inhibidor es específico, después en una solución de sustrato y por último en solución de tinción. La proteinasa digerirá el sustrato excepto en la zona donde el inhibidor migró. El uso de proteinasas comerciales pertenecientes a las cuatro clases da una idea de la especificidad del inhibidor. La Figura 4 muestra un diagrama de la técnica.

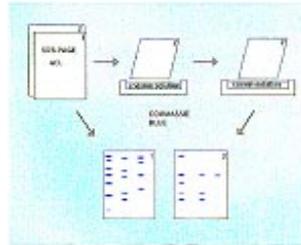
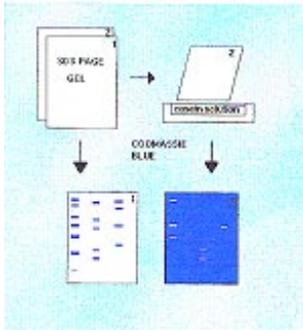


Figura 4. Diagrama de la técnica de electroforesis en poliacrilamida para actividad de proteinasas e inhibidores protéicos de proteinasas. Modificado de García-Carreño et al. 1993.

Con esta técnica se han estudiado extractos enzimáticos de crayfish, camarón, langostilla, dorada, abulón y un estudio sobre ontogénia de sistema digestivo de cabrilla esta en desarrollo. El estudio de la composición de proteínas en sistema digestivo de crayfish de California y langostilla mostró una gran complejidad (García-Carreno y Haard 1993). Proteínas desde 16000 hasta 99000 Daltones fueron detectadas en ambos organismos. Además, la técnica permitió identificar patrones especie específicos. Usando inhibidores comerciales específicos es posible clasificar proteínas hasta nivel de clase (Ver Tabla 2). La Figura 5 muestra electroforegramas de extractos enzimáticos de crayfish y langostilla.

Tabla 2. Clases de proteínas

Clase/familia	Ejemplo de enzima	Aminoácido en el sitio activo
Serino I (mamíferos)	Tripsina, quimotripsina* subtilisina	Asp(102); Ser(195); His(57) Asp(32);
Serino II (bacterias)	Papaina*, ficina	Ser(221); His (64)
Cisteino	Penicilopepsina*	Cys(25); His(159); Asp(158)
Aspártico	Pepsina, quimosina	Asp(33); Asp(213)}
Metallo (mamíferos)	Colagenasa	Zn; Glu(270); Tyr(248)
Metallo (bacterias)	Termolisina	Zn; Glu(143); His(213)

Modificado de García-Carreño 1993.

* enzima a la cual corresponde la secuencia.

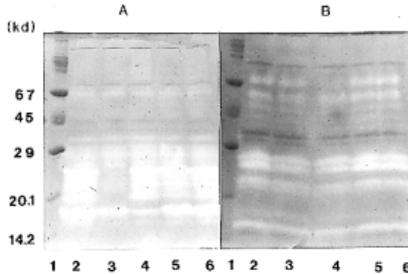


Figura 5. Zymogramas de langostilla y crayfish.

En camarón blanco, se ha estudiado la composición de enzimas del hepatopáncreas (Hernández-Cortés et al. 1996) y purificado la quimotripsina. En este estudio, a diferencia de reportes anteriores (Van Wormhoudt et al. 1992) se encontró una sola forma de quimotripsina con PM de 33200 y pI de 3.1. La Tabla 3 muestra algunas propiedades cinéticas de la quimotripsina de camarón blanco purificada por nosotros.

El estudio sobre la ontogenia de camarón blanco y la identificación de organismos para ser usados como dieta viva están siendo abordados empleando esta técnica electroforética. Los resultados muestran que el perfil o patrón de bandas de la actividad proteolítica de los extractos es especie-específico (Figs. 6 y 7). El patrón de los extractos de quistes y nauplios de *Artemia* muestra un número menor de bandas que el perfil de los extractos de adulto. Los resultados muestran también que el patrón de bandas de los extractos de machos y hembras de especies que en particular no exhibe diferencias (i.e. *S. dorotheae*, *S. texanus* y *T. mexicanus*) (Figura 7). El método Substrato-SDS-PAGE es una promisoriosa herramienta para el estudio de las proteasas durante la ontogenia así como para la caracterización y determinación de especies de crustáceos.

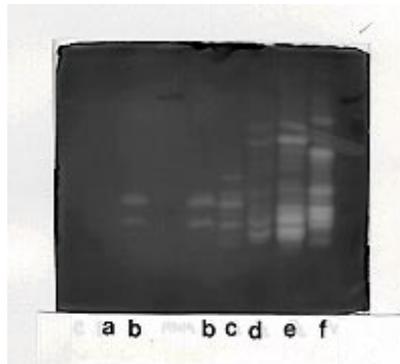


Figura 6. Zymograma de extractos de diferentes organismos.

a = quiste descapsulado de *Artemia franciscana*, b = nauplio de *A. franciscana*, c = adulto de *A. franciscana*, d = postlarva de *Penaeus californiensis*, e = hepatopáncreas de *P. californiensis*, f = hepatopáncreas de *P. vannamei*.

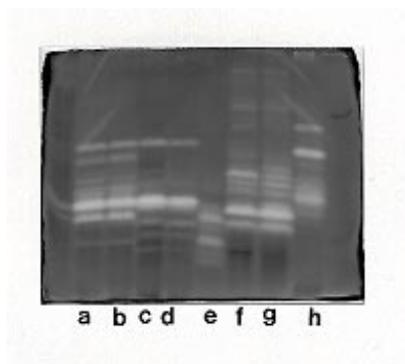


Figura 7. Comparación entre sexos de diferentes organismos.

a = adulto macho de *Streptocephalus dorotheae*, b = adulto hembra de *S. dorotheae*, c = adulto macho de *S. texanus*, d = adulto hembra de *S. texanus*, e = adulto de *Artemia franciscana*, f = adulto macho de *Thamnocephalus mexicanus*, g = adulto hembra de *T. mexicanus*, h = adulto de *Eocyzicus* sp.

El estudio del sistema digestivo en peces ha sido realizado en colaboración con los Drs Francisco Moyano y Manuel Díaz de la Universidad de Almería, España. El estudio (Díaz et al. 1995) de la ontogénia mostró que la larva de dorada produce el grupo completo de enzimas de hepatopáncreas al día seis después de la eclosión. El peso molecular de las enzimas fué de 21500 hasta 95000 Daltones. Actividad de tripsina fué detectada empleando los inhibidores específicos PMSF y SBTI. En este estudio se analizó el contenido enzimático de la dieta viva de las larvas de dorada: rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y nauplios de *Artemia* (Díaz et al. 1997). La comparación de extractos permitió demostrar que las enzimas de la dieta viva no están presentes en los extractos de la dorada, lo cual es una evidencia de que la dieta es digerida, exclusivamente por las enzimas del pez.

Tabla 3. Propiedades cinéticas hacia SAAPPNA de quimotripsinas de diferentes especies. Modificado de Hernández-Cortés et al. 1996.

Organismo	K_m mM	k_{cat} s ⁻¹	k_{cat}/K_m (10 ³) s ⁻¹ /M
<i>Haliotis rufescens</i>	0.007	32.0	4,600
<i>Penaeus monodon</i>			
P1	8.900	250.0	28
P2	0.560	7.8	14
<i>Penaeus vannamei</i>	1.600	15.5	10
Bovine	0.08	26.0	330

Diferentes órganos y fluidos de abulón azul (*Haliotis fulgens*) han sido también estudiados por esta técnica. Se ha encontrado actividad de quimotripsina a lo largo del intestino, así como otras actividades aun no identificadas. Adicionalmente hemos detectado un par de bandas de actividad en hepatopáncreas por medio de una electroforesis revelada a pH ácido. Nuestros datos contrastan con los de Groppe and Morse (1993), quienes solamente encontraron actividad de quimotripsina en la mitad distal del intestino. Estos autores confirmaron la presencia de la enzima cuando encontraron el mRNA en un extracto de la porción del intestino estudiada. La Dra. Elisa Serviere está realizando los estudios de composición de proteinasas en el sistema digestivo del abulón y el efecto de la dieta en la composición.

PERSPECTIVAS

La tecnología enzimática ha sido de gran ayuda a la acuicultura. En una revisión reciente se pudo mostrar el estado del arte del conocimiento de las proteinasas de sistema digestivo de camarón (García-Carreño 1996). Se mostró la necesidad de estandarizar técnicas de evaluación, debido a que la mayoría de los datos publicados no son comparables. Una de las metas del grupo de Enzimología del CYTED es la estandarización de técnicas empleadas en la evaluación de la digestibilidad in vitro.

Estudios sobre enzimas digestivas bajo condiciones fisiológicas permitirán entender los mecanismos de degradación de la proteína en aminoácidos y eventualmente influir en mejores digestibilidades. Para lograrlo habrá que ajustar los ensayos a condiciones lo más cercano posible a las fisiológicas. Factores aparentemente intrascendentes como la presencia de cationes en las mezclas de reacción pueden ser críticos para imitar la fisiología de los organismos en cultivo.

Es necesario abundar en el conocimiento sobre la participación de enzimas de la dieta en la digestión. A la fecha existe controversia en este tema. Si bien nosotros hemos demostrado que las proteinasas de dieta viva no son recuperadas de larvas de peces, esta información es solo una evidencia y habrá que realizar estudios inmunológicos, microbianos, de biología molecular para llegar a una conclusión que permita eficientar el aprovechamiento de la proteína de la dieta.

El estudio de dietas vivas alternativas está desarrollándose por el Dr. Alejandro Maeda del CIBNOR. Una de las metas es la formación de un banco de quistes de filópodos. Técnicas sencillas y reproducibles de identificación son necesarias. La técnica de electroforesis para actividad enzimática parece ser una opción. La información generada permitirá acceder a dietas vivas para cultivo larvario y de reproductores, una de las debilidades del cultivo de camarón.

La preparación formal de los investigadores interesados en estudios sobre enzimología es indispensable. Si bien la experiencia y el trabajo cotidiano permiten llegar a identificar los tópicos fundamentales y de vanguardia de esta disciplina, siempre será en un plazo menor si se asiste a cursos. En estos se puede abarcar la experiencia de años en un tiempo corto. También la asistencia a reuniones científicas especializadas es una buena conducta, ya que en pocos días se entera uno de los hallazgos recientes y sobre todo es posible comparar el trabajo de uno, con lo que se está realizando en el mundo. Un evento sobre proteasas e inhibidores de proteinasas es el que organiza el keystone Symposia (Drawer 1630, Silverstone, CO 80498, Email keystone@symposia.com) cada dos años. Esta es la mejor reunión sobre el tema y cuenta entre sus ponentes a premios Nobel. Cursos sobre cinética enzimática y tópicos básicos de enzimología ofrece el Dr. Mario Calcagno de la Facultad de Medicina de la UNAM. El CIBNOR ofrece un curso sobre biotecnología que incluye tecnología enzimática.

BIBLIOGRAFIA

- AdlerNissen, J. 1986. Enzymic hydrolysis of food protein. Elsevier Applied Sci. Pub. London and New York. 427 pp.
- Díaz M, Moyano F, García-Carreño FL, Alarcón J. Muñoz-Cueto J. and Sarasquete M. 1995. Determination of protease type activity by substrate-SDS PAGE through larval development in seabream (*Sparus aurata*). Larvi'95 Fish and Shellfish Larviculture Symposium. Sep 3-7, 1995. European Aquaculture Society, special publication 24. 276-280.
- Díaz M, Moyano F, García-Carreño FL, Alarcón J. Muñoz-Cueto J. and Sarasquete M. 1997. Determination of protease type activity by substrate-SDS PAGE through larval development in seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture International. In press.
- Ezquerro JM. García-Carreño FL; Civera R, and Haard N. 1996. pHstat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture. Submitted.
- García-Carreño FL; 1992. Protease inhibition in theory and practice. Biotechnology Education. 3, 145-150.
- García-Carreño FL., 1993. Student-friendly classification of proteases. Biotechnology Education. 4, 49-53.

- García-Carreño FL, and Haard N. 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *Journal of Food Biochemistry*. 17, 97-113.
- García-Carreño FL., Dimes N, and Haard N, 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry*. 214(1), 65-69
- García-Carreño FL, and Hernández-Cortés MP. 1996. Enzymes from the digestive system of shrimp: I. State of the art and future trends in protein digestion. *Red Iberoamericana sobre Cultivo de Camarone Peneidos*. CYTED, Guayaquil, Ecuador.
- García-Carreño FL, Navarrete del Toro MA, Díaz-López M, Hernández-Cortés P, and Ezquerro M. 1996a. Proteinase inhibition of fish muscle enzymes using legume seed extracts. *J. Food Protection*. 58, 1-8.
- García-Carreño FL, Navarrete del Toro A, and Ezquerro M. 1996b. Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility in vitro. I. The effect of protease inhibitors in protein ingredients. *J. Marine Biotechnology*. In Press.
- Groppe J, Morse D. 1993. Molluscan chymotrypsin-like protease: structure, localization, and substrate specificity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 305, 159-169.
- Hernández-Cortés MP, Whitaker J, and García-Carreño FL. 1996. Characterization of *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) chymotrypsin. *Biochemica et Biophysica Acta*. En preparación.
- Hilt W, Wolf D. 1996. Proteasomes: destruction as a programme. *TIBS*. 21, 96-102.
- Stauffer C. 1989. *Enzyme Assays for Food Scientists*. An Avi Book, Van Nostrand Reinhold. NY. 79-85.
- Van Wormhoudt A, Chevalier P, and Sellos D. 1992. Purification, biochemical characterization and N-terminal sequence of a serine-protease with chymotryptic and collagenolytic activities in a tropical shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 103B, 675-680.
- Whitaker J. 1994. *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. Marcel Dekker, Inc. 301-328.

UTILIZACION DE TIERRA DE DIATOMEAS LAVADAS EN ACIDO COMO RELLENO NO NUTRITIVO PARA CAMARONES PENEIDOS

Porcham Aranyakananda y Addison L. Lawrence

**Shrimp Mariculture Project, Texas Agricultural Experiment Station,
Texas A & M University System, P.O. Box Q, Port Aransas,
Tx, USA 78373**

Traducción: Roberto Mendoza Alfaro y Jesús Montemayor Leal

INTRODUCCION

Las ventajas de utilizar fuentes puras de nutrientes en lugar de ingredientes prácticos para formular dietas para la investigación nutricional, son que se puede agregar o excluir un solo nutriente de una dieta sin cambiar el resto de los nutrientes (Maynard et al. 1979). A este respecto, se ha desarrollado una dieta semi-pura en el Shrimp Mariculture Project, Texas A & M University System, para investigar los requerimientos de minerales y vitaminas para *P. vannamei* (Davis, et al. 1992a, b; He et al. 1992).

Para poder utilizar estas dietas semi-puras a fin de determinar los requerimientos de nutrientes para los camarones peneidos, todos los requerimientos dietarios deben ser mantenidos constantes a excepción de aquel nutriente cuyo requerimiento va a ser determinado. Para obtener niveles diferentes de el nutriente en cuestión y mantener los niveles del resto de los nutrientes constantes, se requiere de un relleno no nutritivo. Este relleno no nutritivo no debe afectar la disponibilidad de nutrientes para los camarones peneidos.

La celulosa purificada ha sido ampliamente utilizada como relleno no nutritivo para muchos animales. Sin embargo, Ali (1982) reportó que el polvo de celulosa utilizado como relleno no nutritivo en dietas puras afectaba la palatabilidad de las dietas para *P. indicus* y sugirió que el nivel máximo de inclusión de celulosa requería ser investigado. Borrer y Lawrence (1989) investigaron los efectos de la celulosa (0-12%) sobre la digestibilidad de nutrientes en *P. vannamei* y reportaron que la celulosa disminuía la digestibilidad de la materia seca pero no la digestibilidad proteica de las dietas puras. Estos reportes sugieren que la celulosa no debe de ser utilizada como relleno no nutritivo.

Davis, et al (1992a, b) utilizaron tierra de diatomeas lavada en ácido como relleno no nutritivo para variar los niveles de minerales en dietas experimentales para camarones peneidos.

Sin embargo, no se han llevado a cabo investigaciones de los efectos de este relleno alternativo. El objetivo de este estudio fue investigar si la tierra de diatomeas lavada en ácido puede ser utilizada como relleno no nutritivo para los camarones peneidos determinando el efecto de esta sobre la digestibilidad aparente de nutrientes de *P. vannamei*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Individuos de *P. vannamei* fueron cultivados desde postlarva en tanques, en las instalaciones de la Universidad de Texas A & M, Shrimp Mariculture Project, Port Aransas, Texas. 10 camarones (6.2 + 1.6 g de peso promedio) fueron colocados en tanques individuales rectangulares de fibra de vidrio (0.34 m² área de fondo). Estos tanques no tenían sustrato y fueron mantenidos como parte de un sistema de recirculación semicerrado de 80 toneladas métricas de agua marina. El sistema fue diseñado para mantener constantes las condiciones ambientales tales como la temperatura del agua, salinidad, oxígeno disuelto y fotoperiodo.

Una composición basal de una dieta semi-pura modificada a partir de Davis (1992a, b) y He, et al. (1992) es presentada en la Tabla 1. Un diseño factorial de 3X3 con tres niveles de proteína (25, 35 y 45%) y tres niveles de lípidos (5, 8 y 11%) fue empleado para obtener 9 dietas con diferente tasa de proteína: energía (Tabla 2). Los niveles de proteína cruda y de lípidos fueron variados remplazando la mezcla de proteína con carbohidratos y el aceite de pescado con tierra de diatomeas lavada en ácido, respectivamente. Todas las dietas contenían 0.5% de óxido crómico como marcador inerte para estimar los valores de digestibilidad aparente.

Todas las dietas fueron preparadas mezclando los ingredientes secos en una mezcladora vertical durante 20 minutos y transferidos a un mezclador de alimentos antes de adicionar el aceite de menhaden. Después de adicionar el aceite, los ingredientes fueron mezclados durante 5 minutos, tiempo después del cual se agregó agua caliente (90°C) desionizada en cantidades apropiadas, el producto resultante se agitó durante 10 minutos adicionales hasta formar una pasta. La pasta fue extruída a través de un molino de carne, utilizando un dado de 3 mm de diámetro. Los pellets fueron secados en una estufa a 60°C durante 4 horas, resultando en un contenido de humedad de 8-10%. Después de que los pellets fueron enfriados, el alimento fue reducido manualmente a la talla deseada (1 cm de largo) y congelados hasta ser utilizados.

Tabla 1. Composición de la dieta control 1

INGREDIENTE	PESO SECO (%)
Caseína ²	38.8
Gelatina ²	9.7
Almidón de trigo ²	26.5
Aceite de menhaden ³	11
Tierra de diatomeas lavada en ácido ⁴	0.5
Lecitina (refinada de soya) ²	1
Colesterol ²	0.5
Mezcla mineral AIN 76 ⁴	4
Mezcla vitamínica ²	4.5
Alfa celulosa ⁴	1
Oxido crómico ⁵	0.5
Carboximetilcelulosa ⁶	2

¹Conteniendo 45% de proteína, 12.5% de lípidos, 3% de fibra y 6% de ceniza.

²I.C.N. Biochemical Inc., Cleveland, Ohio, U.S.A.

³Zapata Haynie Corp., Reedville, Virginia, U.S.A.

⁴Sigma Chemical Company, Cleveland, Ohio, U.S.A.

⁵Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, U.S.A.

⁶United States Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio, U.S.A.

Tabla 2.- Composición de ingredientes 1 y tasas de proteína: energía para las dietas experimentales.

Número de dieta	Mezcla proteica ² (%)	Almidón de trigo	Aceite de pescado ³ (%)	Tierra de diatomeas (%)	Proteína cruda ⁴	Energía bruta (kcal/kg)	Tasa Proteína: Energía (mg/kcal)
1	48.5	26.5	5	6.5	43.9	4260	106
2	48.5	26.5	8	3.5	43.2	4414	102
3	48.5	26.5	11	0.5	43.9	4720	95
4	37.5	37.5	5	6.5	34.6	4235	83
5	37.5	37.5	8	3.5	35.5	4421	79
6	37.5	37.5	11	0.5	32.7	4749	74
7	27	48	5	6.5	25.2	4200	60
8	27	48	8	3.5	24.5	4403	57
9	27	48	11	0.5	24.2	4586	55

¹ Todos los ingredientes presentados en la Tabla 1 fueron mantenidos constantes a excepción de la mezcla proteica (Caseína y Gelatina), el almidón de trigo, el aceite de pescado y la tierra de diatomeas lavada en ácido.

² Consiste en una tasa de caseína:gelatina de 4:1.

³ Se obtuvieron diferentes niveles de aceite de pescado reemplazando cantidades equivalentes de aceite de pescado con tierra de diatomeas lavada en ácido.

⁴ Se obtuvieron diferentes niveles de proteína cruda reemplazando cantidades equivalentes de la mezcla proteica con cantidades equivalentes de almidón de trigo.

Los camarones fueron mantenidos en dos tanques durante un periodo de aclimatación de dos semanas antes de la iniciación de los bioensayos de digestibilidad. Los organismos fueron alimentados con dietas comerciales (45% de proteína) en exceso dos veces al día durante esas dos semanas. Cada dieta experimental (tres replicados por tratamiento) fue suministrada a los camarones cuatro veces al día a las 08:00, 10:00, 13:00 y 15:00 horas durante los 7 días de duración del bioensayo de digestibilidad. La colecta fecal comenzó a los 30 minutos después de cada alimentación durante los últimos 4 días, pero la primer colecta fecal de cada día fue eliminada. Las muestras fecales fueron lavadas con agua desionizada y congeladas inmediatamente para análisis subsecuentes. Las muestras fecales de cada día y de cada tratamiento fueron reunidas y liofilizadas.

El alimento y las muestras fecales fueron analizados para determinar el oxido crómico por el método de McGinnis y Kasting (1964). El nitrógeno fue determinado por el método de micro-Kjeldahl descrito por Ma y Zuazago (1942). La proteína cruda fue estimada multiplicando el valor de nitrógeno por un factor de 6.25. El contenido de energía bruta fue determinado utilizando una microbomba calorimétrica siguiendo los procedimientos de Phillipson Company, Chicago, Illinois. Todas las determinaciones químicas fueron hechas por triplicado y reportadas en base a materia seca.

La digestibilidad de materia seca aparente de proteína y de energía fueron calculadas de acuerdo a la ecuación:

$$\text{Digestibilidad aparente de nutriente} = 100 \times [1 - (\text{Fn}/\text{Dn})(\text{Di}/\text{Fi})]$$

donde: Fn = nutrientes en las heces

Fi = indicador en las heces

Dn = nutrientes en el alimento

Di = indicador en el alimento

Los datos fueron analizados utilizando el Sistema de Análisis Estadísticos (SAS Institute Inc. 1988). Un análisis de varianza para una clasificación de dos vías para un modelo de efectos fijos (Montgomery, 1984) fue utilizado para determinar las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de los tratamientos debidas a los efectos principales, los niveles de proteína y tierra de diatomeas lavada en ácido y sus interacciones. Los análisis estadísticos para determinar la significancia de los niveles de los tratamientos fueron procesados utilizando la prueba de rango múltiple de Student-Newman-Keuls (Steele y Torrie, 1980).

RESULTADOS

Las medias + desviaciones standard para la salinidad, temperatura y oxígeno disuelto en el sistema de cultivo fueron 26.4 + 1.9 ppt, 28.5 + 1.7°C y 6.5 + 1.0 ppm, respectivamente.

La digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS) para las dietas experimentales fue significativamente diferente de acuerdo al nivel de inclusión de tierra de diatomeas lavada en ácido (Tabla 3). La DAMS aumento a medida que el nivel de tierra de diatomeas disminuía. Los cambios del porcentaje fueron 94 versus 97 versus 100. No existieron diferencias significativas de DAMS debido al nivel de proteína, y la interacciones entre los niveles de proteína y los niveles de tierra de diatomeas no fueron significativas.

Tabla 3. Digestibilidad aparente de la materia seca (%) de dietas conteniendo diferentes niveles de proteína y tierra de diatomeas lavada en ácido para *P. vannamei*.¹

Nivel de Proteína (%)	Nivel de tierra de diatomeas lavada en ácido			
	6.5	3.5	0.5	Promedio ²
25,00	83.06 + 1.09	86.85 + 0.85	89.37 + 0.50	87.36
35,00	84.70 + 0.44	87.06 + 1.13	89.63 + 0.16	86.89
45,00	84.74 + 0.23	86.38 + 0.34	89.53 + 0.32	86.42
Promedio ³	84.39 ^a	86.77 ^b	89.51 ^c	
% de cambio	94,00	97,00	100,00	
ANOVA (P>>F)				
Proteína		0.11		
Tierra de diatomeas		0		
Interacción		0.18		

¹ Los valores son medias + DS de 3 replicados

² Las medias de las columnas no son significativamente diferentes (P>>0.05)

³ Las medias que no comparten el mismo superscript son significativamente diferentes (P<<0.05)

No se encontraron diferencias significativas en la digestibilidad aparente de proteína (DAP) debido a la proteína o los niveles de tierra de diatomeas y las interacciones entre estos dos factores tampoco fueron significativas (Tabla 4).

Tabla 4. Digestibilidad aparente de proteína (%) de dietas conteniendo diferentes niveles de proteína y tierra de diatomeas lavada en ácido para *P. vannamei*.¹

Nivel de Proteína (%)	Nivel de tierra de diatomeas lavada en ácido			
	6.5	3.5	0.5	Promedio ²
25,00	97.69 + 0.43	98.20 + 0.43	97.52 + 0.43	97.55
35,00	98.09 + 0.87	97.97 + 0.24	97.52 + 0.41	97.86
45,00	97.79 + 0.48	97.75 + 0.48	98.38 + 0.54	97.97
Promedio ³	97.6	97.97	97.81	
% de cambio				
ANOVA (PF)				
Proteína		0.48		
Tierra de diatomeas		0.59		
Interacción		0.29		

¹ Los valores son medias + DS de 3 replicados

² Las medias de las columnas no son significativamente diferentes (P>>0.05)

³ Las medias de los renglones no son significativamente diferentes (P>>0.05).

Los valores de digestibilidad aparente de energía (DAE) fueron significativamente diferentes debido al nivel de proteína pero no al nivel de la tierra de diatomeas (Tabla 5). Sin embargo, los cambios de porcentaje en DAE debido a los niveles de proteína fueron extremadamente pequeños (98 versus 99 versus 100). Las DAE de las dietas conteniendo los menores niveles de proteína (25%) fueron diferentes de aquellas conteniendo los niveles mas altos de proteína. No se encontraron diferencias significativas en la interacción entre los niveles de proteína y los de tierra de diatomeas.

Tabla 5. Digestibilidad aparente de energía (%) de dietas conteniendo diferentes niveles de proteína y tierra de diatomeas lavada en ácido para *P. vannamei*.¹

Nivel de Proteína (%)	Nivel de tierra de diatomeas lavada en ácido (%)					
	6.5	3.5	0.5	Promedio ²	% de recambio	
25,00		92.01 + 0.65	92.69 + 0.30	93.19 + 0.89	92.63a	98,00
35,00		93.69 + 0.58	92.89 + 0.87	93.95 + 0.33	93.51b	99.9
45,00		93.16 + 0.08	94.49 + 0.37	93.41 + 1.06	93.69c	100,00
Promedio ³		92.95	93.35	93.52		
ANOVA (PF)						
Proteína			0.02			
Tierra de diatomeas			0.32			
Interacción			0.11			

1 Los valores son medias + DS de 3 replicados

2 Las medias que no comparten el mismo superscript son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

3 Las medias de los renglones no son significativamente diferentes ($P > 0.05$).

DISCUSION

La digestibilidad aparente de nutrientes de las dietas formuladas para varias especies de camarones peneidos ha sido determinada utilizando el método indirecto, en donde se emplea oxido crómico como marcador inerte (Colvin, 1976; Teshima y Kanazawa, 1983; Smith et al. 1985; Akiyama, et al. 1989; Borrer y Lawrence, 1989; Catacutan, 1991). El oxido de cromo ha sido reportado como un marcador inapropiado para determinar los valores de digestibilidad en la langosta americana (Bordner, et al. 1983) ya que pasa selectivamente antes de los productos de deshecho de la digestión y no se mezcla homogéneamente con la materia fecal. En el cangrejo de río, se ha observado el mismo problema y el consumo es insignificante (Brown, et al. 1986).

En este estudio, el color de las heces producidas por *P. vannamei* fue verde y homogéneo a todo lo largo de la producción de las heces. La evidencia de que el oxido de cromo pasa selectivamente antes que los productos de deshecho de la digestión, no fue observada en este

estudio. Por consiguiente, el óxido de cromo parece ser un marcador indirecto apropiado para estudiar la digestibilidad en los camarones peneidos.

La DAMS de las dietas experimentales se vio significativamente afectada por el nivel de tierra de diatomeas. La DAMS aumentó a medida que el nivel de tierra de diatomeas disminuyó o a medida que el nivel de lípidos aumentó. Se ha reportado que los lípidos son digeridos eficientemente por *P. japonicus* (Teshima y Kanazawa, 1983), y *P. monodon* (Catacutan, 1991). Borrer y Lawrence (1989) reportaron que la DAMS fue afectada por el tipo de lípidos pero no por el nivel de lípidos. La tierra de diatomeas lavada en ácido fue digerida pobremente o no digerida del todo por *P. vannamei* (Akiyama, et al. 1989). En el presente estudio, los valores de la DAMS disminuyeron en función de la cantidad de tierra de diatomeas lavada en ácido en las dietas. Estos datos indican que la tierra de diatomeas lavada en ácido no fue digerida por *P. vannamei*. De aquí que la DAMS parezca ser afectada por el nivel de tierra de diatomeas y no por el nivel de lípidos.

La DPA de las dietas experimentales no se vio afectada por ningún factor. Las proteínas puras tales como la caseína y la gelatina son eficientemente digeridas por *P. vannamei* (Akiyama, et al. 1989). El nivel de proteína en las dietas experimentales varió de 25 a 45% y no afectó a la DPA. Catacutan (1991) reportó que la DPA no se veía afectada por los niveles de carbohidratos en niveles que variaban de 5 a 35% de la dieta. En este experimento, los niveles de carbohidratos en las dietas experimentales variaron de 26.5 a 48% y no afectaron la DPA.

Se ha reportado que la tierra de diatomeas lavada en ácido induce cantidades mayores de nitrógeno fecal metabólico en *P. vannamei* que la celulosa y la quitina (Akiyama, et al. 1989) los cuales subsecuentemente reducen la DPA. Este efecto de la tierra de diatomeas no fue observado en este experimento. La razón puede ser que el nivel de tierra de diatomeas lavada en ácido utilizado en este experimento (0.5 a 6.5% de la dieta) fue extremadamente bajo comparado con el 88% de la dieta usada por Akiyama, et al. (1989).

Los valores de DAE de las dietas experimentales se vieron afectados únicamente en el menor nivel de proteína. Debido a que la muestra de proteína fue remplazada por almidón de trigo para bajar el nivel de proteínas en las dietas, la DAE también pudo ser afectada por el nivel de carbohidratos.

Típicamente, la proteína resulta en un valor calórico mayor que los carbohidratos. Aún más, *P. vannamei* es capaz de digerir proteínas puras mucho más eficientemente que el almidón (Akiyama, et al. 1989). Por consiguiente, la DAE de las dietas conteniendo mayores niveles de proteína y menores niveles de carbohidratos fue mayor que las dietas que contenían menores niveles de proteína y mayores niveles de carbohidratos. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre la DAE debido al nivel de proteína, siendo la diferencia entre estos valores menor a 1%.

CONCLUSIONES

1. La digestibilidad aparente de la materia seca se vio afectada por el nivel dietario de la tierra de diatomeas lavada en ácido, lo que indica que ésta es pobremente o no del todo digerido.
2. La digestibilidad aparente de proteína y de energía no se vio afectada por los niveles dietarios de tierra de diatomeas lavada en ácido a medida que estos aumentaban.
3. La tierra de diatomeas lavada en ácido parece ser un relleno no nutritivo alternativo apropiado para ser utilizado en la investigación de los requerimientos de nutrientes tales como las tasas óptimas de proteína:energía para camarones peneidos.
4. Las digestibilidades aparentes de materia seca, proteína y energía no se vieron afectadas por el nivel dietario del aceite de menhaden.
5. La digestibilidad de proteína aparente no se vio afectada por los niveles dietarios de los carbohidratos.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada parcialmente por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos CSRS Grant No.H-8158 de la Texas Agricultural Experiment Station, Texas A&M. University System. Los autores agradecen también la colaboración de Patty Beasley, Shrimp Mariculture, Texas Agricultural Experiment Station, Texas A&M. University System.

LITERATURA CITADA

- Akiyama, D.M., S.R. Coelho, A.L. Lawrence & E.H. Robinson . 1989. Apparent digestibility of feedstuffs by marine shrimp *Penaeus vannamei* Boone. *Nipon Suisan Gakkaishi* 55:91-98.
- Ali, S.A. 1982. Effect of carbohydrate (starch) level in purified diets on the growth of *Penaeus indicus*. *Indian Journal of Fisheries* 29:201-208.
- Bordner, C.E., L.R.D'Abramo & D. Conklin. 1983. Assimilation of nutrients by cultured hybrid lobsters (*Homarus* sp.) fed experimental diets. *Journal of the World Mariculture Society* 14:11-24.
- Borrer, S.E. & A.L. Lawrence. 1989. Effect of lipid and cellulose on the digestibility in penaeid shrimp diets. *Journal World Mariculture Society* 20:18a

- Brown, P.B., C.D. Williams, E.H. Robinson, D.M. Akiyama y A.L. Lawrence. 1986. Evaluation of methods for determining in vivo digestion coefficients for adult red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Journal of the World Aquaculture Society* 17:19-24
- Catacutan, M.R. 1991. Apparent digestibility of diets with various carbohydrates levels and the growth response of *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 95: 89-96
- Colvin, P.M. 1976. Nutritional studies on penaeid prawns: Protein requirements in compounded diets for juvenile *Penaeus indicus* (Milne Edwards). *Aquaculture* 7:315-326.
- Davis, D.A., A.L. Lawrence & D.M. Gatlin III. 1992a. Mineral requirements of *Penaeus vannamei*: A preliminary examination of the dietary essentiality for thirteen minerals. *Journal of World Aquaculture Society* 23:8-14
- Davis, D.A., A.L. Lawrence & D.M. Gatlin III. 1992b. Evaluation of the dietary iron requirement of *Penaeus vannamei*. *Journal of World Aquaculture Society* 23:15-22
- He, H., A.L. Lawrence & R. Liu. 1992. Evaluation of dietary essentiality of fat-soluble vitamins, A, D, E, and K for penaeid shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 103:177-185.
- Ma, T.S. & G. Zuazago. 1942. Micro-kjeldahl determination of nitrogen: A new indicator and improved rapid method. *Industrial and Engineering Chemistry* 14:280-282
- Maynard, L.A., J.K. Loosli, H.F. Hintz & R.G. Warner. 1979. *Animal nutrition*. McGraw-Hill Inc., New York, USA.
- McGinnis, A.J. & R. Kasting. 1964. Colorimetric analysis of chromic oxide to study food utilization by phytophagous insects. *Agricultural Food Chemistry* 12:259-262.
- SAS Institute Inc. 1988 *SAS/STAT User's Guide*, Release 6.03 Edition. Cary, North Carolina, USA.
- Smith, L.L., P.L. Lee, A.L. Lawrence & K. Strawn. 1985. Growth and digestibility by three sizes of *Penaeus vannamei* Boone: Effects of dietary protein level and protein source. *Aquaculture* 46:85-96.
- Steel, R.G.D. & J.H. Torrie. 1980. *Principles and procedures of statistics: a biometrics approach*. McGraw-Hill, New York, New York, U.S.A.
- Teshima, S. & A. Kanazawa. 1983. Digestibility of dietary lipids in the prawn. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 49:963-966.