



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Posgrado

TECNOLOGÍA ENZIMÁTICA EN ACUACULTURA:
EVALUACIÓN *in vitro* DE LA DIGESTIBILIDAD
ENZIMÁTICA DE LA PROTEÍNA DIETARIA POR
pH-STAT PARA LA OPTIMIZACIÓN DE DIETAS
DE *Penaeus vannamei* CULTIVADO

T E S I S

Requisito para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Aprovechamiento de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

p r e s e n t a d a p o r

Josafat Marina Ezquerra Brauer

La Paz, B.C.S. Octubre de 1997

PREFACIO

Esta tesis está basada en los siguientes artículos y manuscritos, los cuales serán citados en el texto por sus números romanos.

ARTÍCULOS

- PI. Fernando Luis García-Carreño, Angeles Navarrete del Toro and Marina Ezquerria. 1997. Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility *in vitro*. I: Effect of protease inhibitors in protein ingredients. *J. Marine Biotechnology*. 5:36-40.
- PII. J. Marina Ezquerria, Fernando Luis García-Carreño, Roberto Civera, and Norman F. Haard. pH-stat method to predict digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*. En prensa
- PIII. J. Marina Ezquerria, Fernando Luis García-Carreño, and Norman F. Haard. Effects of feed diets on digestive proteases from the hepatopancreas of white shrimp (*Penaeus vannamei*). *J. Food Biochemistry*. Aceptado.

MANUSCRITOS

- MI. J. Marina Ezquerria, Fernando Luis García-Carreño, Guillermo Arteaga and Norman F. Haard. Aminopeptidase activity from the hepatopancreas of white shrimp (*Penaeus vannamei*) fed with different diets. Para ser enviado a *J. Food Biochemistry*.
- MII. J. Marina Ezquerria, Fernando Luis García-Carreño and Olimpia Carrillo. *In vitro* digestibility of protein sources for Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). Para ser enviado a *Aquaculture*.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT) y la Universidad de Sonora por su apoyo financiero para la realización de mis estudios doctorales. Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste les agradezco por haberme aceptado dentro de su Programa Doctoral. Al equipo del programa de posgrado por su ayuda en la realización de mis estudios doctorales.

Deseo expresar mi sincera gratitud a los Drs. Fernando Luis García-Carreño, Norman F. Haard, Guillermo Arteaga y Roberto Civera C. por su guía, apoyo y estímulo durante mi programa doctoral y desarrollo de este trabajo. Un agradecimiento especial a los Drs. Francisco Vargas Albores y Gloria Yepiz P. por su atinada orientación en la preparación del presente manuscrito.

El trabajo de investigación no podría haber sido posible sin la valiosa ayuda de muchas personas. Dr. Roy Bowers por su orientación y apoyo durante la realización de mis estudios. B. Guillermo Portillo por proporcionar los animales utilizados durante este estudio, apoyo y por permitir la utilización del laboratorio de Biología Marina para realizar los ensayos *in vivo*. A los Ings. Sonia Rocha, Ernesto Goytortúa, a la M.C. Rockarake Raksakalthai de la Universidad de California, en Davis, y Ma. Angeles Navarrete del Toro por toda la ayuda brindada. Agradezco la ayuda prestada por Horacio Sandoval y Carlos A. Pacheco durante la edición del manuscrito de tesis. A Brian Herkenrath y Jack Presley de la Universidad de California por el análisis de amino ácidos. Un agradecimiento especial a los Drs. John Withaker y Douglas Conklin de la Universidad de California en Davis C.A. por su valiosa orientación. No hay palabras para expresar mis más sincera gratitud y aprecio a la Dra. Elisa Serviere, M.C. Tere Gollas, M.C. Lucía Ocampo e Ing. Mayra Vargas, su amistad y guía fueron cruciales para lograr el desarrollo completo de mi trabajo de investigación.

Un agradecimiento especial y de la manera más cálida posible a la Sra. Victoria Haard por su hospitalidad y cariño durante mi estancia en Davis, a Thelma Castellanos, Adolfo García, Lourdes Morquecho, Angel Carrillo, Bertha Arredondo, Jorge Hernández, Sandra de la Paz, Cecilia Picos, René Rebollar, JuWen Wu y, Vasana Weerasinghe por su amistad, paciencia y apoyo durante mis estudios doctorales. Mi aprecio se extiende a las Dras. Ofelia Rouzaud y Herlinda Soto, y a Martha Espinoza por su guía, estímulo y amistad.

Finalmente, no menos importante fue la ayuda brindada por los Drs. Joseph Dubrosky por sugerir el título, Olimpia Carrillo por la revisión del manuscrito en español y Ellis Glazier por la revisión del manuscrito en inglés.

Con todo mi amor a mi familia. Ellos estuvieron siempre presentes en mi corazón en los largos días de estudio y del trabajo de investigación. Su amor y soporte fueron indispensables para lograr la finalización de mi programa doctoral.

El Señor es mi roca, mi fortaleza y libertador (Sal 18:3). Aunque pase por quebradas muy oscuras, no temo ningún mal, porque tú estás conmigo, tu bastón y tu vara me protegen (Sal 23:4). Porque grande es su amor hacia nosotros, su lealtad perdura para siempre (Sal 117:2).

A la memoria de Roy Bowers

RESUMEN

El camarón del Pacífico (*Penaeus vannamei*) es una de las especies más importantes de penaeidos para producción comercial. La glándula digestiva de los peneidos es conocida por poseer alta actividad proteolítica, además del proceso digestivo, las enzimas son una importante herramienta en biotecnología, procesamiento de alimentos y otras industrias.

El método del pH-stat fue empleado para evaluar la digestibilidad de proteínas de harinas de diferentes orígenes, anchoveta, desperdicios del atún, pescado deshuesado blanco, langostilla, soya y dos harinas de pescado sin cabeza. La caseína fue utilizada como proteína de referencia. Las dietas evaluadas estaban constituidas por un 85% de una dieta de referencia para camarón y un 15% de cualquiera de las siete harinas antes mencionadas como proteína de sustitución. El grado de hidrólisis (DH) de las siete harinas, correlacionó mejor con la digestibilidad aparente de proteína *in vivo* (APD) cuando se usaron como sistemas enzimáticos a los extractos provenientes del hepatopáncreas del camarón (SHE) ($r^2 = 0.73-0.80$), comparado con el sistema de cuatro enzimas comerciales (FES) $r^2 = 0.71$. Empleando el SHE para evaluar las siete muestras de harinas tuvieron mejor correlación con la APD cuando se analizaron por el método del pH-stat comparado con el método del pH-drop ($r^2 = 0.55$). La bondad del método del pH-stat fue confirmada por los resultados obtenidos durante un ensayo de crecimiento de 30 días, donde se probaron las siete dietas ensayadas en los estudios de APD. El análisis de las siete harinas por pH-stat empleando SHE como enzimas, presentaron una correlación significativa con el crecimiento de los camarones ($r^2 = 0.50-0.67$).

Se evaluó la actividad proteolítica en el SHE proveniente de los camarones blancos (*Penaeus vannamei*) que fueron alimentados con una de las siete dietas analizadas durante 30 días. Basándose en la composición química, de amino ácidos y en el color, la harina de pescado sin cabeza (B), presentó baja calidad como alimento para camarón. El zimograma empleando SDS-PAGE, del SHE proveniente de cada uno de los grupos de camarones alimentados con las siete dietas, mostró un patrón muy similar de actividad cuando se usó caseína como sustrato. La mayor actividad total de proteinasas, medidas con azocaseína (unidades/g SHE), fue para los extractos del grupo de camarones alimentados con la dieta conteniendo desperdicios de atún como proteína de sustitución ($P < 0.05$). La actividad de tripsina y quimotripsina fue más alta en el SHE de los animales alimentados con la dieta conteniendo como proteína de sustitución la harina de pescado sin cabeza B ($P < 0.05$).

La actividad de aminopeptidasa en el SHE fue evaluada, probando diferentes sustratos artificiales. La actividad de la leucin-aminopeptidasa se vió inhibida, cuando se analizaron más de 0.2 μg de proteína del SHE, lo que sugiere la presencia de inhibidores o de otros compuestos interferentes en los extractos. Cuando se adicionó Zn^{+2} y Mg^{+2} , la actividad de la leu-aminopeptidasa disminuyó. Aplicando el análisis del componente principal, el cual arrojó distintos patrones, tanto por dieta, como por sustrato, se obtuvo que la mayor actividad fue cuando se empleó como sustrato Met-*p*-nitroanilida. Al comparar los SHE provenientes de los grupos alimentados con la dieta conteniendo la harina de pescado sin cabeza B, presentó la más alta actividad con los siguientes sustratos en el siguiente orden: pro-<val-<leu-<lys-<met-*p*-nitroanilida, mientras los DHE de la dieta conteniendo harina de soya, tuvieron la más baja actividad con los sustratos de gly- y met-*p*-nitroanilida.

Este estudio demostró que el método del pH-stat predijo mejor la calidad de la proteína de fuentes alternativas de proteína que el método del pH-drop. La sustitución en la dieta base para camarón blanco, con el 15% de las fuentes de proteínas evaluadas, influyó sobre la actividad de proteinasas de los SHE.

CONTENIDO

	Página
PREFACIO	ii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
RESÚMEN	vii
INTRODUCCION	1
Camarones Peneidos	1
Nutrición del Camarón.....	2
Digestibilidad de Proteína <i>in vitro</i>	3
Actividad Enzimática Digestiva en Camarón.....	5
Tecnología Enzimática.....	6
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	7
Digestibilidad <i>in vitro</i> de camarón blanco (<i>Penaeus vannamei</i>)	
Fuentes de Proteínas.....	7
Evaluación de la digestibilidad de proteínas <i>in vitro</i> con el ensayo de pH-stat y extractos del hepatopáncreas de camarón.....	7
Comparación de los métodos del pH-stat con el del pH-drop.....	9
Enzimas con Actividad Peptidasa y Proteinasa del Sistema Digestivo del Camarón Blanco (<i>Penaeus vannamei</i>).....	11
Actividad tripsina y quimotripsina en extractos de hepatopáncreas de camarón.....	11
Actividad aminopeptidasa en extractos de hepatopáncreas de camarón.....	13
CONCLUSIONES	17
RECOMENDACIONES	18
BIBLIOGRAFÍA	19
ANEXO	23

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son una importante herramienta en biotecnología, en el procesado de alimentos y otras industrias. Existe una considerable demanda de enzimas con propiedades adecuadas para aplicaciones específicas. Los estudios de digestibilidad en laboratorio, empleando extractos enzimáticos, ofrecen una forma barata, conveniente y rápida, para el desarrollo y evaluación de componentes potenciales de dietas. Las proteasas presentes en animales marinos son importantes, porque pueden ser utilizados en diversos procesos industriales tales como los de fermentación, y por otro lado, pueden también intervenir en la disminución de la calidad de pescados y mariscos, crudos y cocidos, ya sea durante el almacenamiento en frío o bien en el procesado en caliente (Haard, 1992).

Los objetivos primordiales de este trabajo fueron: 1) evaluar la digestibilidad de proteína en camarón blanco, *Penaeus vannamei*, mediante el ensayo *in vitro* del pH-stat usando como sistema enzimático una preparación enzimática del hepatopáncreas del camarón; 2) comparar los resultados de los ensayos *in vitro* con los resultados *in vivo*, obtenidos de la evaluación de la digestibilidad aparente de proteína; 3) desarrollar una técnica predictiva de laboratorio, para evaluar la digestibilidad de proteína en insumos para camarón; 4) identificar la actividad de tripsina, quimotripsina y aminopeptidasa en extractos del hepatopáncreas del camarón blanco; y 5) establecer el efecto de la proteína dietaria sobre la actividad total de proteasas, de tripsina, quimotripsina y aminopeptidasa, en el hepatopáncreas del camarón blanco del Pacífico en cultivo.

Camarones peneidos

La industria de la maricultura del camarón en América Latina, se ha expandido en forma dramática, desde que se hizo comercial en los últimos años de la década de los 60s (Villalon, 1991). Esta tendencia se espera que continúe en el futuro. La razón de esto se atribuye a la alta demanda del camarón en el mercado mundial, lo impredecible de su captura en los océanos y alto costo, y el reciente desarrollo tecnológico en las áreas de engorda, manejos en el cultivo, control de enfermedades e ingenieriles. En 1981, la producción total del camarón de granja se estimó que representó el 21% del total de la producción mundial de camarón (Rosenberry, 1995). Para 1995, la producción del camarón cultivado fue de 2.6 millones de toneladas métricas (MMT) o el 27% del total de la producción mundial (Rosenberry, 1995).

El camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei* Boone), es la especie líder cultivada en la parte oeste del hemisferio, representando más del 90% de la producción total. Puede ser obtenido en estadios tempranos y presenta una tasa uniforme de crecimiento, alcanzando un tamaño máximo de 230 milímetros. Su requerimiento proteínico es del 20-25%. La sobrevivencia durante su captura es alta, entre el 50-60%. Durante su crecimiento, el *P. vannamei* posee una reputación de animal "resistente". Su mercado incluyen los Estados Unidos de América (70%) donde es adquirido fresco, congelado, colas en maquetas, y como producto con un valor agregado, y en Europa (30%) donde se adquiere congelado con cabeza. El Japón representa un mercado reciente para el camarón blanco.

Nutrición en camarón

Las investigaciones nutricionales en especies de crustáceos es relativamente nueva y escasa, comparada con la que se tiene en peces o especies terrestres (D'Abramo y Castell, 1997). Históricamente, los camarones peneidos fueron considerados omnívoros o comedores de materia orgánica en descomposición. Estudios recientes del contenido estomacal del peneido, indicaron que los camarones son carnívoros en la naturaleza, consumiendo crustáceos, anfibios, y poliquetos pequeños (Wyban y Sweeney, 1991). Los constituyentes de los alimentos naturales son una importante fuente para cultivos extensivos, mientras que los alimentos artificiales son requeridos para las prácticas de cultivo semi-intensivas e intensivas. En un sistema de cultivo intensivo, el alimento representa el mayor gasto, generalmente más del 50% del total de los costos de operación. Por lo que, el desarrollo de insumos que sean eficientes y económicos, es fundamental para el éxito de cualquier cultivo de camarón (Lim y Akiyama, 1995). El desarrollo de alimentos de bajo costo, con alto valor nutritivo depende ampliamente de la información que se tenga de los requerimientos nutricionales y la disponibilidad de los diversos ingredientes alimenticios.

Se ha establecido que la proteína es el ingrediente más caro de las dietas (Lim y Akiyama, 1995) y el más importante, ya que una buena proteína dietaria es digerida eficientemente y absorbida por el sistema digestivo. La eficiencia de la digestión y absorción de la proteína cruda, ha sido medida por varios investigadores. La más extensiva investigación ha sido realizada por Forster y Gabott (1971) quienes evaluaron 16 fuentes de proteínas como ingredientes dietarios para *Palaemon serratus* y *Padalus*

platyceros. Ellos concluyeron que la digestibilidad del nitrógeno para ambas especies fue, al menos tan alta como en otros animales (insectos, peces, cerdos, o pollos). Akiyama *et al.* (1992) han establecido que la digestibilidad de la proteína de ingredientes puros, es superior a los no purificados, y las fuentes de origen animales (particularmente de origen marino) son mejor digeridas que las de origen vegetal.

La evaluación de la digestibilidad de un alimento, es claramente uno de los métodos óptimos para medir el aprovechamiento de un nutriente en una dieta. Un alimento artificial puede estar bien balanceado y poseer todos los nutrientes esenciales, pero aún así no producir un buen crecimiento, debido a que los nutrientes no son aprovechados. La digestibilidad de un alimento por un animal, depende no sólo de la estructura y fisiología del tracto digestivo de éste y de la condiciones ambientales, si no también de las características físicas tanto del alimento como del nutriente (Lee y Lawrence, 1997). La digestibilidad de un alimento es también de interés para el acuacultor, debido a la necesidad de disminuir la contaminación por los desechos alimenticios. El uso de los datos de digestibilidad de un alimento, puede ser importante, durante la formulación de una dieta con un bajo índice de contaminación, favoreciendo así la certificación de dicho alimento, que se considere sin riesgo para el medio ambiente (Lee y Lawrence, 1997).

Una de las recomendaciones y tendencias en los estudios de digestibilidad de un alimento en crustáceos, durante la siguiente década, es la que los métodos de evaluación de digestibilidad deben expandirse a medir la resistencia hidrolítica de la materia orgánica, establecer métodos de correlaciones entre digestibilidades *in*

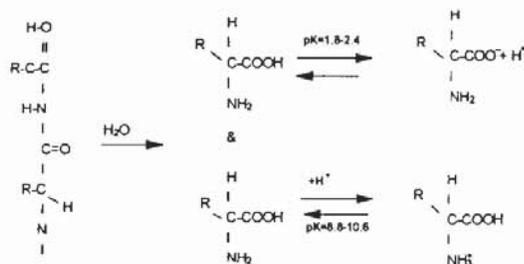
vitro y composición química de los nutrientes. Estos métodos deben ser primero comparados con estudios *in vivo* para evaluar su efectividad (Lee y Lawrence, 1997).

Digestibilidad *in vitro* de proteínas ✓

Las dietas han sido evaluadas generalmente en base a ensayos de crecimiento y recientemente evaluando la digestibilidad aparente de la proteína (Akiyama *et al.*, 1989), pero es ampliamente conocido que estos métodos son caros, requieren de tiempo y son afectados por factores ambientales (Grabner, 1985; Lan y Pan, 1993). Los métodos clásicos para determinar la cantidad y calidad de una proteína, incluyen las determinaciones por el método Kjeldahl y la de la composición de amino ácidos. Estos métodos involucran reacciones más fuertes que aquellas que ocurren durante un proceso normal de digestión, estas reacciones liberan nutrientes, que bajo condiciones naturales no son digeridos por el animal (Anderson *et al.*, 1993). Por lo que se ha prestado una considerable atención a aquellos métodos que sean rápidos y que evalúen en forma eficiente la digestibilidad de la proteína (para referencia ver Dimes y Haard, 1994). Los métodos *in vitro* para evaluar la digestibilidad de una proteína son necesarios, porque estos generalmente son rápidos y menos caros que los métodos *in vivo*, además proporcionan más información sobre el porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados de una proteína en un alimento, empleando sólo pequeñas cantidades de la materia prima (Grabner, 1985). Estos métodos no reemplazarán a los ensayos de digestibilidad aparente de proteína, pero pueden ser utilizados para evaluar la digestibilidad potencial de un insumo en particular (Lee y Lawrence, 1997).

Diversos métodos *in vitro* basados en la digestibilidad de proteínas empleando proteinasas han sido desarrollados. La mayoría de los estudios efectuados en digestibilidad *in vitro* se han correlacionado con algunos índices de proteólisis con la digestibilidad *in vivo* en ratas. Los diferentes métodos *in vitro* se caracterizan por la cantidad y el tipo de enzimas que se utilizan, las condiciones de hidrólisis, el método de fraccionación digestiva y por la forma en que son evaluados los productos de la hidrólisis.

En un principio, los ensayos *in vitro* se realizaron empleando una sola enzima digestiva. Sin embargo, posteriormente se demostró que el uso de sistemas multienzimáticos, simulaban mejor las condiciones de un proceso digestivo en un animal, además de poseer una mayor correlación con digestibilidades *in vivo* (Hsu *et al.*, 1977, Satterlee *et al.*, 1981). Hsu *et al.* (1977), describieron un método *in vitro* empleando tres enzimas para determinar la digestibilidad proteica. El sistema enzimático consistió de tripsina, quimotripsina y una peptidasa intestinal. El método se basó en la digestión de una suspensión proteica a 37 °C y pH 8 usando el sistema enzimático. La digestibilidad *in vitro* fue estimada mediante la evaluación de la reducción del pH en la suspensión proteica, después de 10 minutos de digestión. Las enzimas proteolíticas actúan sobre el enlace peptídico de la proteína, dejando libres los grupos ionizables, α -amino y α -carboxilos, los iones de hidrógeno son liberados y por lo general el pH de la suspensión acuosa de la proteína disminuye.



El método pH-drop propuesto por Hsu *et al.* (1977) fue modificado por Satterlee *et al.* (1981), incrementando el tiempo del ensayo a 20 minutos, y adicionando cuatro enzimas comerciales (tripsina, quimotripsina, proteasa y peptidasa) en lugar de tres. Estos autores encontraron una muy buena correlación entre los resultados *in vitro* y la digestibilidad real en ratas. La mayoría de los ensayos *in vitro* fueron probados para animales de sangre caliente, por lo que se consideraron que estos no eran adecuados para evaluar calidad de proteína de animales poiquilotermos. Se ha sugerido que las proteasas digestivas provenientes de los animales que se están estudiando, arrojan resultados más cercanos a la realidad, que aquellas que comúnmente se utilizan (*i.e.* de mamíferos y de microorganismos) (Grabner, 1985; Lan y Pan, 1993; Dimes *et al.*, 1994).

Varios métodos *in vitro* para predecir la digestibilidad de proteínas para peces y camarones han sido descritos. Lan y Pan (1993) estudiaron la digestión de varias proteínas alimenticias, empleando un método de dos fases de evaluación del pH, usando como sistema enzimático, un extracto del hepatopáncreas de *P. monodon*. Ellos encontraron una alta correlación entre la digestión de la proteína *in vitro* y el contenido de lisina y arginina en la proteína alimenticia. El método del pH-drop utilizando como enzimas un extracto de

Penaeus schmittii fue llevado a cabo, donde se concluyó que el método, fue una manera segura para estimar la digestibilidad de proteínas de organismos cultivados (Carrillo, 1994).

Otros investigadores han reportado que el método del pH-drop sobreestimó la digestibilidad de fuentes de proteínas pobremente digeridas y subestimó aquellas muestras que fueron altamente digeridas (Dimes y Haard, 1994). Pederson y Eggum (1983) establecieron que la determinación por el método del pH-drop está influenciada por la capacidad amortiguadora de las proteínas en suspensión. Una alternativa al método del pH-drop es el del pH-stat. El método del pH-stat ofrece algunas ventajas sobre el pH-drop para monitorear la digestibilidad de proteínas, tales como: 1) el pH se mantiene constante durante el proceso de la digestión, sin la necesidad de utilizar altas concentraciones de la solución amortiguadora (Pederson y Eggum, 1983), 2) la tasa del grado de hidrólisis, puede ser estimada rápidamente durante el proceso de la digestión mediante la evaluación de la curva de titulación obtenida automáticamente (Dimes y Haard, 1994). Dimes y Haard (1994) desarrollaron un método *in vitro*, empleando una fracción enzimática del tracto digestivo del *Salmo gairdneri* y estimaron la digestibilidad de proteínas aplicando el ensayo del pH-stat. Ellos concluyeron que el método es una manera segura de estimar la digestibilidad de fuentes alternativas de proteínas para insumos para salmónidos.

En los métodos del pH-stat, la tasa o la cantidad de álcali consumida para mantener el pH constante, es utilizada para calcular el número de enlaces peptídicos hidrolizados. La proteína hidrolizada se calcula mediante el equivalente de hidrólisis h , a partir del volumen de la solución estándar de álcali

(NaOH 0.1 N) requerido para mantener en 8.0 el pH de la mezcla de reacción:

$$h = \frac{(B \times 1/\alpha \times N_b)}{(M \times S \% / 100)}$$

donde B= mL de base utilizados; $\alpha = 10^{\text{pH}-\text{pK}} / 1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}}$; N_b = normalidad del titulante. M es la masa en g de la mezcla de reacción; y S es la concentración de la proteína en la mezcla de reacción.

El grado de hidrólisis (DH%) se calcula a partir de h como sigue:

$$\text{DH \%} = (h/h_{\text{Tot}}) \times 100$$

donde h_{Tot} es el número total de enlaces peptídicos en la proteína. Este término es establecido en las proteínas, calculando el promedio del peso molecular de los amino ácidos residuales. Para la mayoría de los alimentos utilizados como insumos, se asume como peso promedio para los amino ácidos residuales un valor de 120. La bureta de titulación, el medidor de temperatura, y el medidor del pH pueden ser conectados a una computadora, con una base de datos apropiada. El DH% de la reacción se calcula a partir del siguiente algoritmo:

$$\text{volumen (mL)} = \text{mv de la bureta} / 50.00$$

$$\text{pH} = 7 + (\text{mv del pH metro} / 10)$$

$$\text{pK} = 8.275 - 0.0233 \times T \text{ (}^\circ\text{C)} \text{ de reacción}$$

$$\text{DH \%} = (h/h_{\text{Tot}}) \times 100$$

$$h = \frac{(B \times 1/\alpha \times N_b)}{(M \times S \% / 100)}$$

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}}}$$

La suspensión ensayada es constantemente agitada con un agitador magnético y se purga con nitrógeno para prevenir la incorporación de CO_2 atmosférico en la mezcla de reacción.

El método del pH-stat fue usado por Dimes *et al.* (1994) para evaluar diferentes insumos proteicos para salmónidos, usando a la caseína como proteína de referencia. La digestibilidad *in vitro* correlacionó mejor con la digestibilidad *in vivo* usando enzimas del tracto digestivo de salmónidos ($r=0.93$), que el sistema de cuatro enzimas comerciales ($r=0.84$), sin embargo el método no fue adecuado para proteínas parcialmente hidrolizadas, tales como los ensilados de pescado.

Actividad de las enzimas digestivas en camarón

La digestión de proteínas involucra la acción conjunta de varias proteinasas y peptidasas. En general, la pepsina en el estómago y la tripsina, quimotripsina, y carboxi- y aminopeptidasas en el intestino, son responsables de la hidrólisis de las proteínas ingeridas (Whitaker, 1994). La mayoría de las proteinasas identificadas en los camarones pertenecen a la familia de las serinas, tales como la tripsina (Galgani *et al.*, 1984, Honjo *et al.*, 1990), quimotripsina (Tsai *et al.*, 1986, Tsai *et al.*, 1991), aminopeptidasa (Jiang *et al.* 1991; Lan y Pan 1991) y carboxipeptidasas (Gibson y Barker, 1979). Existe más de una forma de proteasas. La tripsina (Honjo *et al.*, 1990) y la quimotripsina (Tsai *et al.*, 1991; Van Wormhoudt *et al.*, 1992) poseen isoformas. En *Penaeus vannamei* se han reportado dos formas de quimotripsina (Van Wormhoudt *et al.*, 1992). Estos autores reportaron un peso molecular en ambas formas de la enzima de aproximadamente 25 kDa. El peso molecular de los zimógenos putativos

fue de 33364 Da y 279000 Da para las formas activas.

La acción combinada de la tripsina y la quimotripsina liberan péptidos. La cantidad de enzimas presentes en el tejido, pueden ser drásticamente influenciadas por factores específicos, tales como la edad biológica, la dieta, la salinidad del agua, el ejercicio, y la presión hidrostática (Haard, 1990; Haard, 1992). El tipo de proteína presente en la dieta puede influir sobre la actividad de las enzimas digestivas del contenido intestinal, regulando la síntesis, excreción e inactivación del sistema enzimático digestivo (Snook y Meyer, 1964), teniendo cierta influencia sobre la hidrólisis de las proteínas. El incremento en actividad de ciertas enzimas digestivas hidrolíticas, se presentó en *Penaeus japonicus* alimentado con almejas vivas (Maugle *et al.*, 1982). Un incremento en la proteína vegetal en la dieta de *Penaeus vannamei* propició un decremento en la actividad total de proteasas, así como en la de tripsina (Lee *et al.*, 1984). Villarreal *et al.* (1990), reportaron un incremento en la actividad de proteinasas totales, evaluadas con substratos sintéticos en camarón blanco (*P. vannamei*) cuando la harina de pescado fue substituida con harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*).

Tecnología enzimática

Las enzimas proteolíticas son ampliamente utilizadas como herramienta durante el procesamiento de alimentos. En años recientes, las enzimas proteolíticas de origen marino han sido incluídas dentro de

estos procesos. El uso potencial de las enzimas de animales marinos en la industria alimentaria se debe a sus propiedades únicas (Haard, 1992). Las enzimas catalizan reacciones, que pueden tener un impacto positivo o negativo en los índices de calidad en los alimentos, *i.e.*, sabor, olor, color, consistencia, nutricional o seguridad. La enzimas pueden estar presentes en forma natural, incidentalmente o bien adicionarse en forma intencional, contribuyendo de esta forma a las reacciones antes mencionadas (Haard, 1995). La acción de las proteinasas sobre el tejido, puede contribuir al deterioro de la calidad del producto. Los cambios bioquímicos post-cosecha causados por enzimas endógenas, incluyendo las proteinasas, son la primera causa de la pérdida de calidad en camarones en hielo (Kawamura *et al.*, 1981; Baranoski *et al.*, 1984). Además de ello, las proteinasas pueden ser directamente responsables de defectos en la textura de mariscos, *e.g.* "estallamiento de vísceras", "hundimiento", y "desmoronamiento" de pescados, y "carne dura" y "ablandamiento" en crustáceos, con ello ocasionando una pobre calidad inicial y pérdida del producto. La destrucción de la integridad celular, normalmente ocurre durante el procesamiento de los alimentos, liberando las enzimas de los compartimientos naturales de la célula. Las enzimas digestivas pueden liberarse hacia el músculo y así disminuir la vida de anaquel del camarón (Nip *et al.*, 1985). Se ha reportado que la vida media del camarón cosechado no es superior a los 4 días (Nip *et al.*, 1985) y esto se atribuye a la alta actividad proteolítica (Jiang *et al.*, 1991; Yan *et al.*, 1994).

DISCUSION DE RESULTADOS

La descripción detallada de los resultados de cada capítulo, no se incluye en esta parte. Para mayor información ver los artículos que acompañan a este documento.

Digestibilidad de Proteína *in vitro* de Fuentes Proteicas para Camarón Blanco (*Penaeus vannamei*)

La meta de esta parte fue desarrollar una técnica de laboratorio para predecir la digestibilidad de proteína en camarón.

Evaluación de la digestibilidad de proteína usando el ensayo del pH-stat y extractos enzimáticos del camarón (PI y PII)

Las proteasas digestivas del hepatopáncreas del camarón fueron usadas para evaluar la digestibilidad de proteínas de insumos para camarón blanco, *Penaeus vannamei*, empleando el método *in vitro* del pH-stat. Además, correlacionar estos resultados con los obtenidos de ensayos *in vivo*, provenientes del análisis de la digestibilidad aparente de proteína.

Las fuentes de proteínas utilizadas en el experimento fueron proporcionadas por proveedores comerciales. Las enzimas fueron extraídas de hepatopáncreas de camarones blancos de un peso de 10 a 12 g (ca 200 hepatopáncreas), dichos camarones se obtuvieron de la granja del CIBNOR (PI; PII). La preparación enzimática y la actividad de proteasas se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por García-Carreño y Haard (1993).

La actividad proteolítica de los extractos crudos del hepatopáncreas de camarón (SHE), fue aproximadamente un 40 % menor a la presentada por un sistema de cuatro enzimas comerciales (FES) (1.6 mg/mL tripsina, 3.1 mg/mL quimotripsina, 1.3 mg/mL peptidasa y 7.95 mg/mL proteasa bacteriana), sin embargo el grado de hidrólisis (DH) de la caseína, sólo fue 10% menor, al utilizar el SHE comparándolo con el obtenido por el FES. Estos resultados manifiestan la potencial utilización de los extractos de camarón blanco, como fuente de enzimas en ensayos *in vitro* (ver tabla 3, p. 3 en PII).

Se desarrolló un ensayo empleando el pH-stat y extractos enzimáticos del hepatopáncreas de camarón (PI; PII). El ensayo se utilizó para evaluar el porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados (grado de hidrólisis, DH) y estimar la calidad de la proteína en varias harinas: anchoveta, pescado sin cabeza, pescado blanco sin hueso, desperdicios de atún, proteína de soya y langostilla. Los resultados obtenidos por el método del pH-stat fueron comparados con aquellos arrojados por los análisis químicos y de los ensayos *in vivo* de la determinación de la digestibilidad aparente de proteína (APD) (PII). *Penaeus vannamei* juveniles, con un peso entre 3.5 a 4 g, obtenidos de la granjas del CIBNOR, fueron utilizados en la determinación del APD. Las dietas estudiadas fueron elaboradas, substituyendo en una dieta control, el 15 % de las harinas evaluadas (ver tabla 2, p. 3 en PII).

Se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la composición química de las fuentes de proteínas evaluadas. Las diferencias en la composición química

dentro de las harinas de pescado, pueden deberse a la cantidad de lípidos y humedad presentes en dichas harinas, sin embargo algunas de estas diferencias podrían deberse también a la especie de pescado empleada como materia prima para elaborar las harinas (Anderson *et al.*, 1993).

Los valores del DH de las siete harinas analizadas por el método del pH-stat, mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$). El DH de las harinas empleando enzimas del camarón, fue similar a los obtenidos por la mezcla de enzimas comerciales, excepto para el caso de la harina de langostilla y la de desperdicios de atún. Al emplear como fuente de enzimas al SHE, el DH de la harina de desperdicios de atún fue de 23%, mientras con FES los valores fueron de 20% (ver tabla 4, p. 4 en PII). En el caso de la harina de pescado blanco sin hueso, en ambos sistemas enzimáticos (SHE y FES), se presentó el mayor valor de DH, mientras que el menor valor se presentó en la harina de los desperdicios de atún (ver tabla 4, p. 4 en PII). El bajo valor del DH en la harina de los desperdicios de atún, puede ser atribuido entre otras cosas, a la pobre calidad de la materia prima usada o bien al tipo de proceso aplicado. La harina de pescado sin cabeza "A", a pesar de presentar alto contenido de espinas y huesos, y la harina de pescado sin cabeza "B", a pesar de poseer alto contenido de grasas, no presentaron los valores más bajos del DH. Se ha reportado que la digestibilidad de las harinas de pescado es independiente del contenido de grasa, así como del de cenizas (minerales), mientras el contenido de amino ácidos en la proteína se mantenga en equilibrio (Lan y Pan, 1993).

En los estudios *in vivo* de la determinación de APD, la harina de proteína de soya, presentó valores más altos de APD,

que los arrojados por las harinas de pescado y la de langostilla. No se detectaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las harinas de desperdicios de atún, pescado sin cabeza "A" y "B". Estas harinas presentaron valores de digestibilidad inferiores al 70% (ver tabla 4, p.4 en PII). Los valores obtenidos de APD de las harinas de pescado y los de la proteína de soya, son similares a aquellos reportados por otros investigadores (Akiyama *et al.*, 1989; Anderson *et al.*, 1993). Sin embargo los resultados obtenidos en la dieta conteniendo langostilla, fueron menores a los reportados por Goytortúa (1993). El bajo valor de la APD de los desperdicios de atún y las harinas de pescado sin cabeza "A" y "B" podrían indicar su limitado valor nutritivo para el camarón. Los resultados obtenidos indicaron que la proteína de soya fue mejor digerida que las de las harinas de pescado y de langostilla. Sin embargo, Forster y Gabbot (1971), trabajando con *Palaemon serratus* y *Pandalus platyceros*, y Fennuci *et al.*, (1982), con *Penaeus stylirostris*, han reportado que la proteína de origen animal fue mejor digerida que las de origen vegetal. Estas diferencias en los valores de APD, pueden ser atribuidas a las especies de camarón estudiadas, a la calidad de los ingredientes empleados o bien a la composición de la dieta (Akiyama, 1991).

Se detectaron correlaciones significativas entre el DH y la APD, con un valor de $r^2 = 0.77$, cuando se usaron como fuente de enzimas las provenientes del hepatopáncreas del camarón y una $r^2 = 0.71$, cuando fueron empleadas las cuatro enzimas comerciales (PII). El método del pH-stat ofrece la ventaja de poder medir la cinética de la reacción, a partir del porcentaje de enlaces peptídicos de la proteína hidrolizados (Dimes y Haard, 1994). La digestibilidad *in vitro* de la proteína obtenida por el método del pH-stat fue

capaz de detectar el efecto de un tratamiento térmico sobre algunos inhibidores enzimáticos en algunas materias primas de origen vegetal (PI). Los valores de la digestibilidad *in vitro* de la proteína de soya y del pescado sin cabeza "B" fueron sobre estimados, comparándolos con los obtenidos en los ensayos *in vivo*. Tomando en cuenta los coeficientes de la regresión lineal (r^2) de 0.77 ($P < 0.05$), el método del pH-stat utilizando los extractos enzimáticos del hepatopáncreas del camarón parece ser una buena alternativa a los ensayos *in vivo*, para evaluar dietas para camarón. Lan y Pan (1993) reportaron valores similares a los obtenidos por el pH-stat de digestibilidad *in vitro* de proteínas, para la proteína de soya y de la harina de pescado blanco sin hueso. Estos autores midieron el cambio de absorbencia (A_{280}) de la proteína hidrolizada detectando una muy buena correlación ($r^2=0.99$) entre los ensayos de digestibilidad *in vitro* con el contenido de lisina y arginina de las fuentes de proteínas evaluadas. Desafortunadamente, en este trabajo no reportaron resultados de ensayos *in vivo*, que corroboran el método.

Evaluación de la calidad de proteína por el método del pH-stat, pH-drop y contenido de amino ácidos (MII).

Los atributos más deseables de las dietas para camarón son los de poseer alto contenido de amino ácidos esenciales, alta digestibilidad y ausencia de factores antinutricionales. El principal propósito de esta parte del trabajo fue la de comparar la digestibilidad de la proteína de harinas en camarón blanco (*Penaeus vannamei*), determinada por el método del pH-stat, con aquellos valores presentados con pH-drop, además de determinar la relación entre el

grado de hidrólisis obtenido por el pH-stat a 23, 25, y 27°C, con el contenido de arginina y lisina de las fuentes de proteínas evaluadas para *Penaeus vannamei*.

La elaboración y preparación de las dietas fueron similares a las reportadas en artículo II (ver p: 8 en PII). Para los ensayos de crecimiento se trabajó con juveniles de *Penaeus vannamei* de 1.5 a 2 g, obtenidos de la granja del CIBNOR. Se evaluó, el peso promedio ganado por los camarones por dieta, después de 30 días de estudio. El contenido de amino ácidos de cada una de las harinas fue determinada en el Laboratorio de Proteínas, de la Universidad de California, en Davis, Estado Unidos de América. El ensayo del pH-drop se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Hsu *et al.* (1977).

El contenido de arginina de las fuentes de proteína obtenidas a partir del análisis de amino ácidos (ver tabla 3, en p. 4 en PIII), estuvo entre 4.7 a 7 g/100 g de proteína. El valor más bajo se presentó en la harina de desperdicios de atún, y el contenido más alto de arginina se obtuvo en la harina de pescado blanco sin hueso. El contenido de arginina al relacionarse con el crecimiento del camarón arrojó correlaciones significativas con un valor de $r^2=0.76$ (ver tabla 4, p.4 del MII). Hird (1986) estableció que la arginina es uno de los amino ácidos esenciales más determinantes en el crecimiento del camarón, cuya función es la de actuar como fosfógeno en los crustáceos, y una deficiencia de este amino ácido en la dieta, puede disminuir el crecimiento del camarón (Lim y Akiyama, 1995). Al comparar, el contenido de arginina de las harinas con el valor recomendado para camarón, se obtuvieron calificaciones químicas de más del 70%, mostrando que todas las dietas proporcionaron la cantidad adecuada de este amino ácido y éste,

aseguró el buen crecimiento presentado por los camarones (ver tabla 2, p. 3 del MII).

La suma de amino ácidos básicos de las harinas, principalmente lisina y arginina, obtenidas a partir del análisis del amino ácidos (ver tabla 3, p. 4 en PIII) se relacionó con la digestibilidad *in vitro* por el método del pH-stat, después de una hidrólisis de 60 minutos usando SHE. El DH de las fuentes de proteína no mostrará una relación significativa ($P>0.05$) con la suma de lisina y arginina, tal como fue reportado en el trabajo de Lan y Pan (1993). Estos investigadores detectaron una alta correlación entre la digestión *in vitro* con el contenido de lisina y arginina en fuentes proteicas para *Penaeus monodon*. Las proteínas utilizadas en la formulación de las dietas, generalmente sufre un sobre calentamiento durante la obtención de las harinas, dando como resultado que la solubilidad de la proteína y su funcionalidad se reduzca (Opstvedt *et al.*, 1984). La determinación del contenido de amino ácidos, se hace después de una hidrólisis ácida, por lo que esta determinación no va a reflejar una modificación inducida por el tratamiento térmico, lo que causa cambios en la digestibilidad *in vivo* (Lan y Pan, 1993).

Se obtuvo una correlación significativa entre la APD y el crecimiento del camarón, pero con un valor bajo ($r^2=0.50$), lo cual demostró que el incremento en peso no depende sólo del consumo de nitrógeno.

Se ha reportado que la temperatura tiene influencia sobre el DH% de las fuentes proteicas (Dimes y Haard, 1994). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($P>0.05$) del DH entre las tres temperaturas evaluadas 23, 25 y 27°C (ver tabla 5, p. 4 en MII), atribuido a que el rango de temperatura evaluada es muy bajo.

La relación entre el DH obtenida por el pH-stat a 25 y 27 °C y crecimiento, aunque fue significativa ($P<0.05$) los valores fueron bajos ($r^2=0.67$ y 62, respectivamente) (ver tabla 6, p. 5 en MII). La mejor ecuación para predecir el valor biológico para los animales evaluados, fue la obtenida a 25°C (ver figura 2, p. 7 en MII), arrojando valores de F altos (42) y los más bajos del error estándar del valor de predicción (SEE) (4%).

Se encontró una buena correlación entre la digestibilidad *in vivo* con el método del pH-stat. Los coeficientes de correlación, los errores estándar, y otros datos estadísticos de la regresión del DH a 23, 25 y 27 °C con la digestibilidad aparente de proteína son mostrados en el manuscrito II (ver tabla 7 en p. 5 en MII). Los valores indicaron que el pH-stat a 25°C dió un coeficiente de correlación (r^2) de 0.76 con 6 % de SEE. Cuando se evaluaron las temperaturas de 23 y 27°C, se obtuvo que a 23°C el coeficiente de correlación fue similar a 25°C, con un valor de $r^2=0.73$, mientras que cuando se trabajó a 27°C, el valor de r^2 fue más alto (0.80). Al analizar los estadísticos, se observó que a 27°C, el valor de F fue el más alto (86), y el error estándar del valor de predicción (SEE) fue el más bajo (1%). Lo que sugiere que la mejor ecuación de predicción para la digestibilidad aparente de proteína fue cuando se determinó el DH a 27°C. Las curvas de regresión obtenidas de las ecuaciones de predicción a 23° y 27°C se muestran en el manuscrito II (ver figuras 3a y 3c, p.7 en MII).

Los valores obtenidos con el método del pH-drop, aunque correlacionaron significativamente ($P<0.05$), el valor de r^2 fue muy bajo (0.55) (ver tabla 8, p. 6 en MII). La digestibilidad de proteína obtenida

por el pH-drop, se estableció en base a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Digestibilidad} = 355.32 - 37.74(X)$$

donde las constantes provienen del análisis de regresión realizado (Tabla 8, p. 6 en MII), $X = \text{pH}$ después de 10 min de incubación. El método del pH-drop tendió a sobreestimar (MII) las muestras que presentaron digestibilidades menores al 70% (ver tabla 4 en PII), tales como las harinas de desperdicios de atún, las harinas de pescado sin cabeza "A" y "B", y subestimar (ver tabla 8 en MII) aquellas con alta digestibilidad, como la de la proteína de soya (ver tabla 4 en PII), y aquellas con alto contenido de cenizas como el caso de la harina de langostilla (ver tabla 1 en PII). Una limitación del pH-drop es que el pH no se mantiene constante durante el curso de la reacción. La capacidad amortiguadora de los péptidos, proteínas y otras sustancias en el alimento pueden influir sobre el pH (Dimes y Haard, 1994). El método del pH-stat en este trabajo ofreció más ventajas que el pH-drop y el contenido de arginina, aunado a que predijo mejor la calidad de las proteínas para fuentes alternativas de proteínas para dietas de camarón blanco.

Enzimas con actividad de peptidasa y proteinasa del sistema digestivo del camarón blanco (*Penaeus vannamei*).

El camarón es una de los más importantes productos en el comercio internacional, sin embargo se tiene poca información sobre las proteasas y sus efectos sobre la calidad de este crustáceo. Los resultados de esta sección tratarán de proveer bases para entender los estudios de calidad de este importante insumo y la

aplicación de los extractos del hepatopáncreas del camarón.

Actividad de la tripsina y quimotripsina en el hepatopáncreas del camarón (PIII).

Una indicación del valor biológico de una proteína puede ser su contenido de lisina y de arginina, y la interrelación entre ambos. Esta interrelación es conocida como antagonismo lisina-arginina. Este antagonismo ocurre cuando se presentan valores excesivos de uno de estos amino ácidos, lo que puede ocasionar una disminución en el crecimiento del camarón. Se recomienda que la relación entre lisina:arginina, debe mantenerse entre 1:1 a 1:1.1 (Akiyama *et al.* 1992). En este estudio se observó una ligera diferencia en esta relación lisina:arginina en la harina de anchoveta (1:0.7), la de desperdicios de atún (1:0.7), y harina de pescado sin cabeza "A" (1:0.7), *i.e.* los contenidos de arginina fueron relativamente menores, comparados con el contenido de lisina (PIII).

La actividad enzimática es utilizada durante los procesos digestivos en los crustáceos, para aprovechar los nutrientes de los alimentos. La actividad proteolítica en los extractos del hepatopáncreas (SHE) del camarón blanco (*Penaeus vannamei*) que fueron alimentados con cada una de las siete dietas, durante 30 días, fue evaluada por varios métodos (PIII).

Los zimogramas de SDS-PAGE de los SHE de los animales alimentados con las diferentes dietas mostraron la presencia de bandas con actividades proteolíticas similares. Independientemente de la dieta, todos los organismos desplegaron varias zonas de actividad con caseína como substrato (ver figura 1, p. 4 en PIII). El peso

molecular de las zonas activas estuvo entre 14 a 64 kDa (ver figura 2, línea B, p.5 en PIII). La reducción de la actividad proteolítica en presencia de inhibidores de serin proteasas (PMSF) es una indicación de la presencia de serin proteasas en los extractos del camarón (ver figura 2, línea D, p. 5 en PIII). Las zonas activas inhibidas por PMSF, presentaron pesos moleculares (24 a 30 kDa) similares a los extractos de *Pacifastacus astacus* y *Pleurocondes planipes*. (García-Carreño y Haard, 1993; García-Carreño *et al.*, 1993). Los extractos del hepatopáncreas del camarón fueron sensibles a inhibidores de tripsina TLCK (ver figura 2, línea E. p. 5 en PIII). Los zimogramas de los extractos del hepatopáncreas del camarón mostraron al menos cuatro fracciones con comportamiento de actividad de proteasas sensibles al inhibidor de tripsina TLCK. Una proteinasa de 22 kDa, correspondiente al peso molecular de la tripsina porcina (García-Carreño, 1992) fue detectada como una zona menor en todos los extractos del hepatopáncreas del camarón. Los extractos del camarón fueron insensibles al inhibidor de quimotripsina usado TPCK (ver figura 2, línea F. p. 5 en PIII). Resultados similares fueron reportados por Gracia-Carreño *et al.* (1994) trabajando con proteinasas del *Pacifastacus astacus* y *Pleurocondes planipes*.

La actividad total de proteasas, empleando azocaseína como sustrato, reportada como unidades de actividad/ g de hepatopáncreas no fue significativamente ($P>0.05$) afectada por el tipo de dieta, solo en el caso de aquella conteniendo desperdicios de atún (ver tabla 4, p. 6 en PIII). Los extractos de los animales alimentados con la dieta conteniendo desperdicios de atún tuvo la mas alta actividad proteolítica (102 unidades de actividades/g de hepatopáncreas) seguida

por aquellas obtenidas por las de las harinas de langostilla (81 unidades de actividad/g de hepatopáncreas). Esto puede atribuirse al alto contenido de cenizas en estas harinas (PII). Es conocido que el contenido de minerales induce la actividad digestiva de proteasas (Lan y Pan, 1993). El uso de la proteína de soya, no incrementó la actividad total de proteasas (ver tabla 4, p. 6 en PIII), tal como fue reportado por Lee *et al.* (1984). Ellos evaluaron la influencia del nivel de la proteína vegetal en el alimento. En este trabajo, solo el 15 % de la proteína vegetal fue utilizada como proteína de sustitución en la dieta base.

Los extractos del hepatopáncreas del camarón (*P. vannamei*) hidrolizaron sustratos específicos para tripsina y quimotripsina (ver tablas 4 y 5, p. 6 en PIII). Este tipo de proteinasas han sido descritas en varias especies de decápodos, incluyendo a especies de *Penaeus sp.*, *Paralithodes camtschatica*, *Euphausia superba*, y *Pacifacastacus astacus* (Gibson y Barker, 1979; Zwilling *et al.*, 1981; Osnes, 1985; Kim, 1991; García-Carreño y Haard, 1993; y García-Carreño *et al.*, 1994).

La alta actividad específica de tripsina ($P<0.05$) se obtuvo en aquellos animales alimentados con la dieta substituida con la harina de pescado sin cabeza "B" (ver tabla 5, p. 6 en PIII). Parece ser que la actividad de tripsina es independiente del contenido de grasa y de cenizas, siempre y cuando se mantengan en equilibrio el contenido de amino ácidos en la fuente proteica (Lan y Pan, 1993). La tripsina actúa sobre los enlaces peptídicos de los amino ácidos básicos de la proteína. La suma de lisina y arginina, obtenidas del perfil de amino ácidos (ver tabla 3, p. 4 en PIII), arrojó los valores más bajos en la proteína de soya (9.7), la harina de pescado sin cabeza "B" (10.2) y la harina de langostilla (10.4). La

actividad de tripsina no se vió afectada por los valores de lisina y arginina presentes en la muestra, pero sí por el contenido de lípidos presentes en las harinas y el proceso de secado de las harinas de pescado. La harina de pescado sin cabeza "B" mostró el mayor contenido de grasa (ver tabla 1, p. 2 en PII), además de presentar un color muy oscuro, lo cual podría ser un indicio de un sobrecalentamiento (Anderson *et al.*, 1993). Se ha reportado que el sobrecalentamiento puede ocasionar que la lisina reaccione covalentemente con otros amino ácidos, disminuyendo así la calidad de la proteína (Anderson *et al.*, 1993), ésto a su vez puede incrementar la actividad de tripsina en el SHE (Rodríguez *et al.*, 1994) y reducir la vida de anaquel del camarón (Nip *et al.*, 1985).

Se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la actividad de quimotripsina en los extractos de camarón, alimentados con cada una de las siete dietas evaluadas (ver tabla 6, p.6 en PIII). La más alta actividad de quimotripsina se detectó en aquellos organismos alimentados con la dieta conteniendo la harina de pescado sin cabeza "B". El contenido total de tirosina y fenilalanina (tabla 3 en PIII) se relacionó con la actividad de quimotripsina, así como la calidad general de las harinas. El valor más bajo de tirosina y fenilalanina se obtuvo en la harina de pescado sin cabeza "B", la cual a su vez, como ya se mencionó, presentaba la cantidad más alta de grasas y un color muy oscuro. Estas observaciones sugieren que esta harina poseía una proteína de baja calidad, lo cual, como es bien sabido, puede estimular la actividad de tripsina y quimotripsina (Rodríguez *et al.*, 1994). Las proteasas alcalinas, tales como la tripsina han sido implicadas en el detrimento de la textura de los alimentos de origen marino, como los crustáceos (Salem *et al.*, 1970), por lo que la alta actividad de

tripsina y quimotripsina de aquellos camarones alimentados con la dieta conteniendo la harina de pescado sin cabeza "B", puede afectar la vida media del camarón cosechado.

La actividad total de las proteasas en los extractos del hepatopáncreas fue también evaluada a través del grado de hidrólisis de la caseína (DH). Los DHs de la caseína no se vieron estadísticamente afectados ($P > 0.05$), por las dietas ($P > 0.05$) (ver tabla 4, p. 6 en PIII). Resultados similares fueron reportados por Dimes y Haard (1994), cuando se evaluó el DH utilizando extractos de la trucha arcoiris y salmón coho alimentados con diferentes fuentes de proteínas. Anteriormente se demostró en el presente trabajo que la digestibilidad *in vitro* usando como fuente de enzimas extractos del hepatopáncreas del camarón y el método del pH-stat, puede predecir la digestibilidad de fuentes alternativas de proteínas para camarón blanco. Los resultados del DH de la caseína, demostraron que las evaluaciones *in vitro* utilizando el pH-stat, no se ven afectadas por el tipo de dieta con la cual se alimenta al camarón, también se observó que el método del pH-stat no es una técnica útil para evaluar el efecto de la calidad de la proteína sobre la actividad.

Actividad de aminopeptidasa en los extractos del hepatopáncreas de camarón (MI).

Tomando en cuenta que el sistema digestivo de los crustáceos poseen alta cantidad de peptidasas, las cuales actúan sobre los enlaces peptídicos de los extremos de los péptidos (García-Carreño y Haard, 1993; García-Carreño *et al.*, 1994), y que la calidad proteínica de un alimento puede afectar la actividad enzimática, el objetivo de esta parte del trabajo de investigación fue

la de identificar la actividad de aminopeptidasas en extractos de hepatopáncreas del camarón blanco juvenil y establecer el efecto la fuente de proteína sobre la actividad de aminopeptidasas en *P. vannamei*.

Los hepatopáncreas del camarón blanco, fueron obtenidos después de un ensayo de crecimiento de 30 días (MI). Los hepatopáncreas del camarón fueron procesados de acuerdo a lo descrito por García-Carreño y Haard (1993). La actividad de aminopeptidasa fue evaluada espectrofotométricamente mediante la cuantificación de la *p*-nitroanilina producida por cada uno de los 10 sustratos sintéticos evaluados (Leu-*p*-NA, Gly-*p*-NA, Ala-*p*-NA, Val-*p*-NA, Pro-*p*-NA, Phe-*p*-NA, Met-*p*-NA, Glu-*p*-NA, Lys-*p*-NA, y Arg-*p*-NA). Soluciones salinas de ZnSO₄ fueron adicionadas al amortiguador de fosfato de sodio a concentraciones finales de 1 mM y 2 mM, también se probó el MgCl₂ a 1 mM y 10 mM. La reacción en cada caso se inició al momento de adicionar los extractos enzimáticos ensayados. Las condiciones del análisis fueron aquellas que describió Pfeiderer (1970). La actividad total de proteasas fue evaluada de acuerdo a lo descrito por García-Carreño y Haard (1993). La concentración de la proteína soluble presente en la solución enzimática se determinó espectrofotométricamente de acuerdo al método de Biuret (Gornall *et al.*, 1949) (MI).

Se detectó la presencia de Leu-aminopeptidasa en extractos de hepatopáncreas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) (ver tabla 5, p.6 en MI). Se sabe que las proteinasas son sintetizadas y secretadas en el hepatopáncreas de los crustáceos, donde ejercen su acción enzimática (Cecaldi, 1997). En el jugo gástrico de *Pacifastacus*

astacus, no se detectó actividad de aminopeptidasas (De Villez, 1965; Brockerhoff *et al.*, 1970). Sin embargo, estos autores utilizaron un sustrato altamente específico para leucin-aminopeptidasa lo cual no puede excluir la posibilidad de que el jugo gástrico de los crustáceos posea otro tipo de aminopeptidasas (De La Ruelle, 1992). Por otro lado, Kleine y Ponyi (1967) encontraron actividad de aminopeptidasas, principalmente en el hepatopáncreas de *Astacus astacus* y *Cambarus affinis*, indicando que la digestión de los oligopéptidos toma lugar en el hepatopáncreas, en lugar del estómago, y que estas enzimas juegan un papel importante en la digestión intracelular. Jiang *et al.* (1991) y Lan y Pan (1991) trabajando con el hepatopáncreas de *Penaeus monodon* reportaron la presencia de Leu-aminopeptidasas.

Se evaluó la influencia de varias concentraciones de extractos de hepatopáncreas (SHE) (0 to 0.01 mg of SHE/mL), empleando como sustrato sintético al amino ácido L-Leu-*p*-NA. La relación entre la concentración del SHE y actividad de la aminopeptidasa se muestra en el manuscrito I (ver figura 1, p. 4 del MI). Se utilizó la dilución de 1 µg/mL para los subsecuentes ensayos de aminopeptidasa. Sin embargo, cuando diferentes concentraciones del SHE (0 a 0.1 mg/mL) fueron ensayadas usando como sustrato a la azocaseína no se observó inhibición por las altas concentraciones del SHE (ver figura 2, p.4 del MI). Esto podría indicar que en el SHE están presentes diferentes enzimas que pueden competir con el sustrato para leucina-aminopeptidasa.

La Leu-aminopeptidasa de otras fuentes ha sido identificada como una metaloenzima (Taylor, 1993) y se ha demostrado que la

actividad de las metaloenzimas, en ocasiones se ve estimulada por la adición de cationes divalentes, principalmente sales de zinc (Bacon, 1994; Hajjou y Le Gal, 1994). Fueron evaluadas dos sales de cationes divalentes ($ZnSO_4$ y $MgCl_2$) a diferentes concentraciones. La actividad, empleando como sustrato al L-Leu-*p*-NA, decreció con ambas sales y este efecto aumentó cuando se incrementó la concentración de la sal (ver tabla 6, p. 4 en MI). Hay que tomar en cuenta que en este ensayo se trabajó con extractos crudos del SHE, por lo que estos resultados no indican que la Leu-aminopeptidasa del camarón no requiera de cationes para actuar. Se requieren realizar trabajos de purificación de la enzima, para poder establecer el efecto real de los cationes de Mg^{+2} o Zn^{+2} en la aminopeptidasa del camarón blanco.

Se midió la actividad hidrolítica de la enzima empleando 10 derivados de *p*-nitroanilida (ver tabla 6, p. 5 en MI). Los resultados fueron analizados aplicando el análisis estadístico del componente principal (PCA). Recientemente, Toldrá *et al.* (1996) aplicaron el PCA, para estudiar el comportamiento de las enzimas proteolíticas y lipolíticas en el músculo de puercos con bajo y alto contenido de grasa. En este trabajo los resultados del análisis estadístico mostraron que las dietas tuvieron un efecto sobre la actividad enzimática. El análisis del componente principal de las dietas y de los sustratos evaluados presentó tres componentes principales, con pesos del 54%, 21.6%, y 11.97%. Para el primer componente, el de mayor peso, las variables más importantes fueron pro-, val-, leu-, lys, y met- aminopeptidasas (ver tabla 7, p. 5 en MI). Considerando que estos sustratos presentaron el mayor peso estadístico en el componente principal uno (PC1), las muestras que presentan alto valor en el PC1, presentaron alta actividad al usar como

sustratos, en el siguiente orden: pro-<val-<leu-<lys-<met-*p*-nitroanilida (ver tabla 6, p.5 en MI). Donde la mayor actividad se obtuvo al utilizar como sustrato sintético a la met-*p*-NA.

La gráfica del peso de las dos variables evaluadas (sustrato y fuente de proteína), demostró grupos de variables a lo largo del eje horizontal, donde la harina de pescado sin cabeza "B" presentó mayor valor en PC1 (más cargado hacia la izquierda) (ver figura 3, p.5 en MI). Por lo que esta muestra posee la más alta actividad con pro, val, leu, lys, y met-aminopeptidasa. La dieta conteniendo la harina de pescado sin cabeza "B" también tuvo un alto valor en el componente principal dos (PC2) (ver tabla 7, p.5 en MI), donde el sustrato gly-aminopeptidasa tiene un peso positivo, lo que sugiere que gly-aminopeptidasa tiene también un valor alto. Un amplio grupo proveniente de las muestras de la dieta conteniendo harina de soya, se observó en la parte izquierda del PC1 (ver figura 3, p. 5 del MI). Esto sugiere que los extractos provenientes de animales alimentados con dieta conteniendo soya, poseen baja actividad con gly- y met-*p*-NA.

Se asoció la calificación química de los amino ácidos esenciales (AAS) en las harinas evaluadas (ver tabla 3, p.4 en MI) con la actividad de las aminopeptidasas, así como con la calidad general de los productos. El AAS de las dietas evaluadas, presentó una correlación significativa con la actividad de aminopeptidasa, presentando un valor de r^2 de 0.70. Los SHE provenientes de los animales alimentados con la dieta conteniendo la harina de pescado sin cabeza "B", mostraron el valor más bajo de AAS, además de presentar la mayor actividad de aminopeptidasa en la mayoría de los sustratos evaluados. Tal como se discutió anteriormente, esta harina además poseía alto contenido de grasa (PII),

y una coloración muy oscura, lo cual es un indicador de sobrecalentamiento durante el proceso de obtención de la harina. El sobrecalentamiento puede causar reacciones entre la lisina y los otros amino ácidos, disminuyendo la calidad nutricional de la proteína (Anderson *et al.*, 1993), y ésto puede causar un incremento en la actividad enzimática (Rodríguez *et al.*, 1994). Sin embargo este deterioro no se reflejó durante las evaluaciones biológicas, ya que los camarones que se alimentaron con la dieta conteniendo la harina de pescado sin cabeza "B", aunque presentaron una baja digestibilidad (67%) no fue la más baja (PII), y el crecimiento presentado por estos camarones después de 30 días fue superior al 100% (MII). Esto lleva a suponer que si bien las dietas de baja calidad proteica pueden aumentar la actividad de las

proteasas este efecto no se manifiesta en dietas de muy mala calidad, como la que contenía desperdicios de atún, en la cual se presentó una digestibilidad muy pobre (63%) (ver tabla 4, p. 4 en PII) y el crecimiento más bajo (99%) (tabla 2, p.3 en MII). De cualquier manera, el saber que una dieta que presente ciertos índices inferiores de calidad, como el del sobrecalentamiento, que influye sobre la actividad de la tripsina, quimotripsina (PIII), y sobre la aminopeptidasa (MI), y que el incremento en la actividad de proteasas, reduce la vida de anaquel del camarón (Nip *et al.* 1985), es una información que puede ser útil durante la elaboración de insumos a suministrar a peneidos en cultivo.

CONCLUSIONES

El ensayo *in vitro* de digestibilidad de la proteína empleando el método del pH-stat, arrojó resultados que, en su mayor parte, correlacionaron con los obtenidos en los ensayos *in vivo* de la determinación de la digestibilidad aparente de proteína (APD) en camarón blanco.

El grado de hidrólisis (DH) de las proteínas alimenticias no se vió afectado por las temperaturas de evaluación, lo que se atribuyó a que el rango ensayado fue muy estrecho. Los resultados del DH obtenidos con el método del pH-stat a 27°C se relacionaron mejor con la APD del camarón blanco. Los valores del DH arrojados de los ensayos *in vitro* por el método del pH-stat a 25°C, empleando los extractos enzimáticos del hepatopáncreas del camarón, presentaron correlaciones con los ensayos de crecimiento del *P. vannamei*, que indican que el pH-stat podría ser una buena herramienta para evaluar la calidad biológica de fuentes alternativas de proteínas para camarón blanco.

El método del pH-drop evaluado para estimar la digestibilidad de proteína en insumos para camarón blanco, aunque correlacionó significativamente con los ensayos *in vivo*, el valor de relación es bajo ($r^2=0.55$). El método sobreestimó la digestibilidad de proteínas pobremente digeridas y subestimó aquellas que fueron altamente digeridas, o bien con alto contenido de cenizas. Por lo que la digestibilidad de proteínas en el camarón blanco del Pacífico puede ser mejor estimada a través de la determinación del grado de hidrólisis usando el método del pH-stat a 27°C y extractos del SHE.

Los resultados indicaron que el contenido de arginina de las harinas puede ser utilizado como índice de predicción del crecimiento de camarón blanco (*Penaeus*

vannamei), ya que se obtuvo un buen valor de correlación ($r^2=0.76$).

El pH-stat posee un alto potencial como una técnica rápida y segura para estimar la digestibilidad y el valor biológico de fuentes alternativas de proteínas para dietas de camarón blanco.

Todos los extractos del hepatopáncreas del camarón, mostraron zonas de actividad de proteasas muy similares, y cuando se aplicaron inhibidores específicos para proteasas (TLCK para tripsina y PMSF para proteasas alcalina), se detectó la inactivación de zonas específicas.

Se identificó la actividad de aminopeptidasa en extractos de hepatopáncreas del camarón blanco. La actividad de leucina-aminopeptidasa se vió inhibida por la presencia de Zn^{2+} y Mg^{2+} en la solución amortiguadora de la reacción. La relación entre actividad de aminopeptidasa y concentración de extracto enzimático, mostró la presencia de otros compuestos en los extractos, los cuales pueden competir por el mismo sustrato, o bien puede indicar la presencia de ciertos inhibidores de la enzima en el extracto crudo.

La actividad de la aminopeptidasa en los SHE varió dependiendo del sustrato sintético probado. Se detectó una alta actividad en todos los extractos del hepatopáncreas del camarón, cuando se usó como sustrato a la metionina-*p*-nitroanilida.

Se concluye bajo las condiciones de este estudio, que las actividades de tripsina, quimotripsina y aminopeptidasa, se ven afectadas por la fuente de proteína empleadas durante la alimentación de *P. vannamei* juvenil, sin alterar la composición de las proteasas presentes en dichos extractos.

RECOMENDACIONES

Se requiere de más estudios *in vivo* para poder establecer una clara imagen de la relación entre los ensayo *in vivo* con los datos *in vitro*. Es necesario evaluar otras dietas, con un rango mas amplio de calidad de proteína, así como de composición química, además de ensayar con otras especies de camarón y otras tallas, para poder demostrar la utilidad potencial del método del pH-stat usando como sistema enzimático extractos del hepatopáncreas del camarón.

A pesar de que se ha reconocido que las proteinasas se relacionan con la vida de anaquel del camarón cosechado, los resultados de este estudio indican que se requieren trabajos de investigación más complejos, donde se pueda establecer la interrelación de la actividad de las enzimas digestivas, calidad de las fuentes de proteínas y vida de anaquel de los camarones cultivados, con la finalidad de probar que el incremento en actividad proteolítica afecta la vida post-cosecha del camarón.

Otra de las investigaciones que se proponen, derivadas de este estudio, es la de establecer la relación entre la tripsina, quimotripsina y aminopeptidasa purificadas y la calidad de la fuente de proteína, para corroborar que una mala calidad de la dieta incrementa la actividad enzimática.

La importancia de la presente investigación en el campo de la enzimas digestivas del hepatopáncreas del camarón, estriba en que la explotación potencial de los extractos de camarones marinos y la calidad de las dietas deberá ser considerada, si se desea lograr el máximo aprovechamiento de las enzimas, con el consecuente mejoramiento de los camarones cultivados.

BIBLIOGRAFIA

- ADLER-NISSEN, J.** 1986. Enzymic hydrolysis of food protein. Elsevier Applied Sci. Pub. London and New York. 427 pp.
- AKIYAMA, D.M.** 1991. Soybean meal utilization by marine shrimp. In: Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop. American Soybean Association. Singapore. pp. 207-214.
- AKIYAMA, D.M., COELHO, S.R., LAWRENCE, A.L. y ROBINSON, E.H.** 1989. Apparent digestibility of feedstuffs by the marine shrimp *Penaeus vannamei* BOONE. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 55:91-98.
- AKIYAMA, D.M., DOMINY, W.G. y LAWRENCE, A.** 1992. Penaeid shrimp nutrition. In *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*, (Fast, A.W. and Lester, J. eds.) pp. 535-567. Elsevier Science Publishers B.V.
- ANDERSON, S.J., LALL, S.P., ANDERSON, D.M. y MCNIVEN, M.A.** 1993. Evaluation of protein quality in fish meals by chemical and biological assays. *Aquaculture*. 115:305-325.
- BACON, C. L.** 1994. Purification and characterization of an aminopeptidase A from Cytoplasm of *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* AM2. *Int. Dairy Journal*. 503-519.
- BARANOSKI, E. S., NIP, W.K. y MOY, J.H.** 1984. Partial characterization of a crude enzyme extract from the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Food Sci.* 49:1494-1501.
- BROCKERHOFF, H., HOYLE, R.J. y HWANG, P. C.** 1970 Digestive enzymes of the American lobster (*Homarus americanus*). *J. Fish Res. Board. Can.* 27:1357-1370.
- CARRILLO, O.** 1994. Producto multienzimático del hepatopáncreas de camarón reactivo y suplemento dietético. 2do. *Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 7 al 9 de Noviembre de 1994. Programa de Maricultura. Facultad de Ciencias Biológicas Mexicana de Especialistas en Nutrición Animal. Monterrey, Nuevo León. México.
- CECCALDI, H.J.** 1997. Anatomy and physiology of digestive system. In *Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture, Vol.6*, (L. R. D'Abramo, D.E. Conklin and D.M. Akiyama, eds.) pp.261-291. World Aquaculture Society. Louisiana.
- D'ABRAMO, L.R. y CASTELL J.D.** 1997. Research Methodology. In *Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture, Vol.6*, (L. R. D'Abramo, D.E. Conklin and D.M. Akiyama, eds.) pp. 3-20. World Aquaculture Society. Louisiana.
- DE LA RUELLE, M., HAJJOU, M, VANHEPR, F. y LEGAL, Y.** 1992. Aminopeptidase activity from the hepatopancreas of *Procambarus clarkii*. *Biochem. System. and Ecology*. 20(4):331-337.
- DE VILLEZ, E.J.** 1965. Isolation of the proteolytic digestive enzyme from the digestive juice of the crayfish *Orconectes virilis*. *Comp. Biochem. and Physiol.* 14:557-586
- DIMES, L.E. y HAARD, N.F.** 1994. Estimation of protein digestibility-I. Development of an *in vitro* method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 108A:349-362.
- DIMES, L.E., HAARD, N.F., DONG, F.M., RASCO, B.A., FORSTER, F.T., FAIRGRIEVE, W.T., ARNDT, R., HARDY, R.W., BARROWS, F.T. y HIGGS, D.A.** 1994a. Estimation of protein digestibility-II. In vitro assay of a protein in salmonid feeds. *Comp. Biochem. Physiol.* 108A:363-370.
- DIMES, L.E., GARCÍA-CARREÑO, F.L., y HAARD, N.F.** 1994b. Estimation of protein digestibility-III. Studies on the digestive enzymes from the pyloric ceca of rainbow trout and salmon. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A:349-360.
- FENUCCI, J.L., FENUCCI, A.C., LAWRENCE, A.L. y ZEIN-ELDIN, Z.P.** 1982. The assimilation of protein and carbohydrate from prepared diets by the marine shrimp, *Penaeus stylirostris*. *J. World Soc.* 13:134-145.
- FORSTER, J.R.M. y GABBOT, P.A.** 1971. The assimilation of nutrients from compounded diets by the prawns *Palaemon serratus* and *Pandalus platyceros*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 51:943-961.
- GALGANI, F., BENYAMIN, Y. y CECCALDI, H.** 1984. Identification of digestive proteinase of *Penaeus kerathurus* (Forsk.); a comparison with *Penaeus japonicus* Bate. *Comp. Biochem. Physiol.* 78B(2): 355-361.

- GARCÍA-CARREÑO, F.L.** 1992. The digestive proteases of langostilla (*Pleuroncodes planipes*, Decapoda): Their partial characterization, and the effect of feed on their composition. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B (3), 575-578.
- GARCÍA-CARREÑO, F.L. y HAARD, N.** 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *J. Food Biochem.* 17:97-113.
- GARCÍA-CARREÑO, F.L., DIMES, L.E., y HAARD, N.F.** 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214:65-69.
- GARCÍA-CARREÑO, F.L., HERNÁNDEZ-CORTÉS, M.P. y HAARD, N.F.** 1994. Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and marine decapod. *J. Agric. Food Chem.* 42:1456-1461.
- GIBSON, R. y BARKER, P.** 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol.* 17:285-346.
- GORNALL, A., BARDAWIL CH.J. y DAVID, M.M.** 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177 (1): 751-766.
- GOYTORTÚA, B.E.** 1993. Evaluación de la digestibilidad de dietas compuestas a base de harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) y su efecto en el crecimiento en el camarón blanco (*Penaeus vannamei*). Tesis. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. México. 122 pp.
- GRABNER, M.** 1985. An *in vitro* method for measuring protein digestibility of fish feed components. *Aquaculture.* 48:97-110.
- HAARD, N.F.** 1990. Enzymes from food myosystems. *J. Muscle Foods.* 1: 293-338.
- HAARD, N.F.** 1992. Protein hydrolysis in seafoods. In *Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality*, (F.Shahidi and J.R. Botta, eds.) pp. 10-33. Blackie Academic & Professional.
- HAARD, N.F.** 1995. Enzymes as food processing aids. Yenching International Symposium 94': Critical Issues in the Food Industry in the Nineties. Beijing, China.
- HAIJOU, M. y LE GAL, Y.** 1994. Purification and characterization of an aminopeptidase from tuna (*Thunnus albacores*) pyloric caeca. *Biochemical et Biophysical Acta*, 1204. 1-13.
- HIRD, F.J.R.** 1986. The importance of arginine in evolution. *Comp. Biochem. Physiol.* 85B: 285-288.
- HONJO, I., KIMURA, S. y NONAKA, M.** 1990. Purification and characterization of trypsin-like enzyme from shrimp (*Penaeus inidcus*). *Nippon Suisan Gakkaishi.* 56:1627-1634.
- HSU, H.W., VAVAK, D.L., SATTERLEE, L.D. y MILLER, G.A.** 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Science.* 42:1269-1273.
- JIANG, S.T., MOODY W., y CHEN, H.C.** 1991. Purification and characterization of proteases from digestive tract of grass shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Food Sci.* 56(2):322-326.
- KAWAMURA, Y., NISHIMURA, K., IGRASHI, S., DOI, E. y YONEZAWA, D.** 1981. Characteristics of autolysis of Antarctic krill. *Agric. Biol. Chem.* 45:93-100.
- KIM, H.** 1991. Characterization and potential utilization of proteases from the hepatopancreas of crawfish *Procambarus clarkii*. Ph.D. Thesis. Louisiana State University. LA. USA.
- KLEINE, R. y PONYI, J.** 1967. Vorkommen und eigenschaften der proteolytischen enzyme des magsaftes und der mitteldarm druse des flusskrebse *Astacus astacus* un *Cabarus affinis* I. *Exopeptidase, Z. Verg. Physiol.* 55:39-50.
- LAN, C. C. y PAN, B.S.** 1991. Effect of substrate on proteolytic activities of midgut gland of grass shrimp (*Penaeus monodom*). *J. Chinese Agric. Chem. Soc.* 29 (1):33-42.
- LAN, C. C. y PAN, B.S.** 1993. *In vitro* digestibility simulating the proteolysis of feed protein in the midgut gland of grass shrimp (*Penaeus monodom*). *Aquaculture.* 109:59-70.
- LEE P.G., SMITH, L.L. y LAWRENCE, A.L.** 1984. Digestive proteases of *Penaeus vannamei* Boone: Relationship between enzyme activity, size and diet. *Aquaculture.* 42. 225-239.

- LEE, P.G. y LAWRENCE, A.L. 1997. Digestibility. In *Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture, Vol.6*, (L. R. D'Abramo, D.E. Conklin and D.M. Akiyama, eds.) pp. 194-260. World Aquaculture Society. Louisiana.
- LIM, C. y AKIYAMA, D.M. 1995. Ch. 6: Nutrient requirement of penaeid shrimp. In: *Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture* (Lim C. and Sessa D.J. eds.) pp. 60-73. AOACS Press. Champaign, Illinois.
- MAUGLE, P.D., DESHIMARU, D., KATAYAMA, T. y SIMPSON, K.L. 1982. Effect of short-necked clam diets on shrimp growth and digestive enzyme activities. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 48:1759-1764.
- NIP, W.K., MOY, J.H., y TZANG, Y.Y. 1985. Effect of purging on quality changes of ice-chilled freshwater prawn. *J. Food Technol.* 20(1):9-14.
- OPSTVEDT, J., MILLER, R. HARDY, R.W. y SPINELLI, J. 1984. Heat-induced changes in sulfhydryl groups and disulfide bonds in fish protein and their effect in protein and amino acid digestibility in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Agric. Food Chem.* 32: 929.
- OSNES, K. 1985. Peptide hydrolases of antarctic krill *Euphausia superba*. Ph.D. Thesis. University of Trondheim, Norway.
- PEDERSON, B. y EGGUM, B.O. 1983. Prediction of protein digestibility an *in vitro* enzymatic pH-stat procedure. *Tierphysiol, Tiernahrung u Futtermittelkde.* 49: 277-286.
- PIKE, I.H. y HARDY, R.W. 1997. Standards for assessing quality of feed ingredients. In *Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture, Vol.6*, (L. R. D'Abramo, D.E. Conklin and D.M. Akiyama, eds.) pp. 473-489. World Aquaculture Society. Louisiana.
- PFEIDERER, G. 1970. Particle bound peptidase from pig kidney. In *Methods in Enzymology, Vol. XIX.* pp. 514-521. Academic Press, New York.
- RODRÍGUEZ, A., LE VAY L., MOURENTE, G. y JONES, D.A. 1994. Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. *Marine Biology.* 118:45-51.
- ROSENBERRY, R. 1995. World shrimp farming annual report. Shrimp News International. San Diego, California.
- SALEM, H., YOUSSEF, A.M., EL-NAKKADI, A.M.N. y BEKEIT, M. 1970. Proteolytic decomposition of shellfish muscle proteins under different conditions. *Alex. J. Agr. Rs.* 18:61-66.
- SATTERLEE, L.D., KENDRICK, J.G., JEWELL, D.K. y BROWN, W.D. 1981. Estimating apparent protein digestibility from *in vitro* assays. In: *Protein Quality in Humans: Assessment and in vitro estimated* (Bodwell C.E., Adkins J.S. and Hopkins, D.J. eds.) pp. 316-339. AVI Publishing Co., Westport, CT.
- SNOOK, J.T. y MEYER, J.H. 1964. Effect of diet and digestive processes on proteolytic enzymes. *J. Nutr.* 83:94-102.
- TAYLOR, A. 1993. Aminopeptidases: towards a mechanism of action. *TIBS* 18. 167-173.
- TOLDRÁ, F., FLORES M. y ARISTOY, M-C. 1996. Pattern of muscle proteolytic and lipolytic enzymes from light and heavy pigs. *J. Sci. Food Agric.* 71:124-128.
- TSAI, I.H., LIU, H.C. y CHUANG, K.L. 1986. Properties of two chymotrypsins from the digestive gland of prawn *Penaeus monodon*. In *Federation of European Biochemical Societies. FEBS Lett.* Vol. 203. No. 2. pp. 257-261.
- TSAI I.H., LU P.J. y CHUANG, J.L. 1991. The midgut chymotrypsin of shrimps (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus penicillatus*). *Biochemica et Biophysica Acta.* 1080:59-67.
- VAN WORMHOUDT, A., LE CHEVALIER, P. y SELLOS, D. 1992. Purification, biochemical characterization and N-terminal sequence of a serine-protease with chymotrypsic and collagenolytic activities in a tropical shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 103B: 675-680.
- VILLALON, J.R. 1991. Practical Manual for Semi-intensive Commercial Production of Marine Shrimp. Texas A&M University Sea Grant College Program. Galveston, Texas. USA. 103 pp.
- VILLARREAL, H., RIVERA, M. y MILLAN, A. 1990. Effect of the substitution of shrimp meal for red crab (*Pleuroncodes planipes*) meal in the growth of postlarvae and juvenile *Penaeus californiensis*. *Crustac. Nutr. Newslet.* 6:9-19.

WYBAN, J.A. y SWEENEY, J.N. 1991. Ch.2: The biology of *Penaeus vannamei*. In: *The Oceanic Institute Shrimp Manual. Intensive Shrimp Production Technology* (The Oceanic Institute eds.) pp. 7-12. Honolulu, Hawaii.

WHITAKER, J.R. 1994. Principles of enzymology for the Food Sciences. Second Edition. Marcel Dekker, Inc. USA.

YAN, T.R., LEE, CH.SH. y LEE, J.Y. 1994. Studies on proteolytic enzymes of red-tail shrimp (*Penaeus penicillatus*). *J.Chinese Agr. Chem. Soc.* 32(1):25-32.

ZWILLING, R., DOERSAM, H., TORFF, H. y RODL, J. 1981. Low molecular mass protease: Evidence for a new family of proteolytic enzymes. *FEBS Lett.* 127:75-78.