



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL
NOROESTE, S. C.

Programa de Estudios de Posgrado

**“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA
DE LA LANGOSTA DE AGUA DULCE *Cherax quadricarinatus*
(DECAPODA, PARASTACIDAE)”**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

p r e s e n t a

Silverio López López

La Paz, B. C. S., Enero 2004

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, S. C. S., siendo las **12:12** horas del día **10** del Mes de **Diciembre** del 2003, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., para revisar la Tesis de Grado titulada:

**"ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA
DIGESTIVA DE LA LANGOSTA DE AGUA DULCE
Cherax quadricarinatus (DECAPODA,
PARASTACIDAE)"**

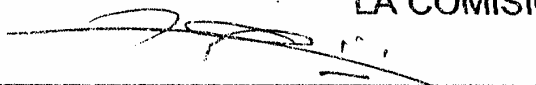
Presentada por el alumno:

Silverio López López

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO,
MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS
NATURALES CON ORIENTACION EN ACUACULTURA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA



DR. HÉCTOR NOLASCO SORIA
CO-DIRECTOR DE TESIS



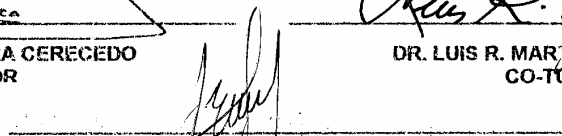
DR. HUMBERTO VILARREAL COLMENARES
CO-DIRECTOR



DR. ROBERTO CIVERA CERECEDO
CO-TUTOR



DR. LUIS R. MARTÍNEZ CÓRDOVA
CO-TUTOR



DRA. L. ELIZABETH CRUZ SUÁREZ
CO-TUTOR



DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DEDICATORIA

A MIS MUJERES

MONTSERRAT

...INCONDICIONALMENTE

Por compartir anhelos y apoyarlos,

Por sufrir mis problemas y darme consuelo

Por todo su amor...

DESIRÉE...

...LA ALEGRIA DE ESTAR CONTIGO

Por que desde que llegaste cambió mi vida.

A MIS PADRES

MANUEL Y MANUELA

Por el gran apoyo para poder llegar hasta aquí y concluir este trabajo. Por enseñarme que el mejor camino en la vida es luchar hasta conseguirlo.

A MIS HERMANOS

Alejandro, Rafael, Lucia, Isabel, Rosa, Pedro, Manuel,
Antonieta, Joel, Rogerio y Guadalupe†

AGRADECIMIENTOS

Al consejo de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado a través del programa de becas (Registro No. 129042), y al financiamiento otorgado por el proyecto número 2888-1 para la realización de este proyecto.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. que a través de sus programas de Posgrado y Acuicultura, se me dio la oportunidad de continuar con mi formación académica e involucrarme en este inacabado quehacer de la ciencia.

Al Dr. Héctor Nolasco S. por aceptarme como su estudiante en el laboratorio y dirigir esta investigación. Por dedicar tiempo para enseñarme e iniciarme en este largo camino. Por su apoyo para la culminación de este trabajo. Y por lo que he aprendido de la convivencia con él.

Al Dr. Humberto Villarreal por aceptar ser mi codirector. Por todos los apoyos financieros y morales, por ayudarme a buscar el camino entre el ser y el sentir.

A la Dra. Elizabeth Cruz Suárez (UANL), al Dr. Roberto Civera Cerecedo (CIBNOR) y al Dr. Luis R. Martínez (USON) por aceptar ser miembros de mi comité tutorial. Por el tiempo dedicado en las revisiones y sugerencias para mejorar el documento final. Que desde luego asumo como responsabilidad propia.

Al personal técnico del laboratorio de nutrición acuícola: Ismael Valdivia, Francisco Encarnación y Sandra de La Paz por su ayuda en la extracción de organismos y muestreo. Al personal del laboratorio de Bromatología: Sonia Rocha y Dolores Rondero por enseñarme las técnicas de análisis. Al encargado de la planta de alimentos: Ernesto Goytortúa por su asesoría para la elaboración de alimentos.

Al personal de la biblioteca y laboratorio de computo por su apoyo en la búsqueda de información, digitalización de imágenes y orientación en el uso de software. Muchas Gracias, Edgar, Esther, Susana, Horacio, Manuel y Tony. Desde luego, Ana María por las incontables ayudas y apoyos.

Un agradecimiento muy especial y sincero a mi suegra, Ma. Irene Caballero, que desde que supo del inicio de este trabajo me ha apoyado en todos los sentidos, siempre. Iniciando con los muestreos de organismos, trasladados al CIBNOR a altas horas de la noche, entre otras muchas cosas mas que no podría terminar de mencionar, por todo ello muchas gracias. A la Bisabuelita de mi hija, Irene González, por su tiempo al cuidado de todos nosotros.

A las hermanas Ruiz Aguirre, Juana Teresa (comadre) y Josefina (madrina), de quienes he recibido apoyo y cariño durante estos últimos años, por hacerme sentir parte de este lugar a través de los momentos de convivencia, siempre les estaré agradecido.

A mis compañeros y amigos de pláticas, discusiones y convivencias dentro y fuera del CIBNOR, Edilmar Cortés, José Naranjo, Antonio Luna. Una mención especial al Dr. Pedro Saucedo por sus atinados comentarios y apoyos durante mis estudios.

A Dariel Tovar y Fernando Vega por compartir su tiempo, su conocimiento y amistad

LISTA DE ABREVIATURAS.

AOAC	Official Methods of Analysis (Métodos oficiales de análisis).
CA	Organismos Con Alimento
CAL	dieta con harina de calamar
D.O.	Densidad Óptica
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNS	Ácido dinotrosalisílico
E.C.	Extracto Crudo
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
E.L.N.	Extracto libre de nitrógeno
GPAA	Gel de poliacrilamida
HP	Hipuril-fenilalanina
HA	Hipuril-arginina
kDa	kilo daltones
LANG	dieta con harina de langostilla
LPNA	Leucin- <i>para</i> -nitroanilida
LSD	Less significance difference (mínima diferencia significativa)
mg l ⁻¹	miligramos por litro
ml	mililitro
mM	milimolar
N	Concentración Normal
nm	nanómetro
PC	Proteína Cruda.

P60	dieta con harina de pescado con 60% de proteína
P65	dieta con harina de pescado con 60% de proteína
PM	Peso Molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
pNFA	<i>para</i> -nitrofenil acetato
pNFB	<i>para</i> -nitrofenil butirato
pNFE	<i>para</i> nitrofenil esterato
ppm	partes por mil
R	dieta de referencia
Rf	Relación de frentes de corrimiento
S	dieta con harina de Sorgo
SA	organismos Sin Alimento
SAAPNA	Succinil-alanina-alanina-pro-fenil-de tetrasodio
SDS	Sulfato dodecil de sodio
SY	dieta con pasta de soya
T	dieta con harina de trigo
TAME	Tosil-L-arginina metil ester
TCA	Ácido trocloroacético
TCR	Tasa de Crecimiento Relativo
TLCK	N- α -tosil-L-lisina clorometil acetona
TPCK	N-Tosil-L-fenilalanina clometil acetona
μ l	microlitro
μ M	micromol

v/v relación volumen:volumen en una solución.

ZPCK N-CBZ-L-fenilalanina clorometilacetona

RESUMEN

Una de las especies de crustáceos que en los últimos 10 años ha despertado el interés en los acuacultores es la langosta de agua dulce o acocil, *Cherax quadricarinatus*, especie de Australia que se introdujo a México en los noventas. Esta especie tiene un cultivo relativamente sencillo, a pesar de ello, el aspecto de nutrición no se conoce bien aún. En la acuicultura la alimentación es uno de los factores de mayor preocupación para el productor, además de ser uno de los rubros más costosos de la producción. El aporte adecuado de nutrientes asegura un buen crecimiento y salud a los organismos, sin embargo, para lograr esto debe tomarse en cuenta que cada organismo tiene diferentes necesidades nutricionales, así como distintas capacidades para asimilar el alimento. Por esta razón, si conocemos estas capacidades, podremos proporcionar el alimento más adecuado y reducir gastos en el cultivo de los organismos.

Se hizo un estudio sobre la actividad enzimática digestiva en juveniles de la especie *Cherax quadricarinatus*. Se evaluó, mediante bioensayos la respuesta enzimática digestiva de los organismos después de someterlos a diferentes tratamientos.

El primer ensayo consistió en la elaboración de siete alimentos artificiales, utilizando distintas harinas de origen animal y vegetal (calamar, langostilla, pescado, sorgo, soya y trigo) sustituyendo un 15% de este ingrediente en un alimento basal de referencia, con el propósito de observar la respuesta enzimática digestiva. De los alimentos probados, los que tuvieron un mayor porcentaje de inclusión de harinas de pescado (60% PC), sorgo y trigo favorecieron el crecimiento. No se encontró una correlación entre el crecimiento y la actividad enzimática digestiva.

El segundo ensayo consistió en proporcionar siete alimentos con diferente nivel de proteína (20, 26, 32, 38, 44, 50 y 56%). Se encontró que el alimento con 32% de proteína produjo la más alta TCR. La respuesta enzimática proteolítica total fue mayor para los organismos que recibieron los alimentos con 26, 32, 38 y 44 y 50% de proteína al final del experimento. Altos niveles de proteína en el alimento redujo la actividad proteolítica. La actividad amilasa se redujo al final del experimento, pero la actividad lipasa aumento para el mismo periodo.

El tercer y cuarto ensayos de este trabajo consistieron en la caracterización *in vitro* de la actividad enzimática digestiva (amilasas, lipasas y proteasas). Se evaluaron las actividades ante diferentes condiciones: temperatura, concentración de NaCl, pH, termoestabilidad, inhibidores y activadores. En general las actividades óptimas de las todas las enzimas evaluadas, fue entre 35 y 50 °C, de 100 mM de NaCl, pH de 5 hasta 8.5, la mayoría de los metales probados inhibieron la actividad enzimática, el EDTA y el ión calcio produjeron en algunos casos inhibición, pero en otros favorecieron la actividad.

Se evaluaron actividades de proteasas específicas. Se encontró actividad tipo tripsina y quimotripsina, carboxipeptidasa A, no se encontró carboxipeptidasa B ni leucinaminopeptidasa. La actividad proteasa fue inhibida por el SDS, PMSF, pero no fue inhibida por el TLCK, TPCK y ZPCK.

Por otro lado, se evaluó la actividad esterasa-lipasa del hepatopáncreas, sometiendo el extracto crudo de este órgano ante diferentes sustratos (compuestos derivados α y β naftil y *p*-nitrofeniles de ácido graso) de distintas longitudes de cadena. La actividad lipasa disminuyó conforme aumentó la longitud del ácido graso. Utilizando geles de

poliacrilamida en gradiente se encontraron 4 isoenzimas con actividad hidrolítica (43, 46, 63 y 118 kDa) y al menos una de ellas fue considerada como verdadera lipasa.

El quinto ensayo consistió en ver la respuesta enzimática digestiva de dos grupos de animales, uno fue alimentado y el otro se mantuvo en ayuno durante su ciclo circadiano. Se encontraron dos picos máximos de la actividad amilasa, durante la noche y al amanecer; mientras que la actividad lipasa y proteasa no mostraron ningún patrón definido de actividad. El comportamiento de las actividades (lipasa y amilasa) en los organismos alimentados y no alimentados se observó un poco desfasada, pero no fue diferente estadísticamente, tampoco se encontraron diferencias significativas en el consumo de alimento durante el periodo de muestreo.

Este estudio contribuye el conocimiento básico de la biología de la especie, así como a comprender los mecanismos de producción enzimática digestiva, que sirvan como criterios en la elaboración de alimento y el manejo óptimo del alimento acordes con las capacidades digestivas y comportamiento de esta especie de importancia comercial.

Palabras clave *Crustáceos, Cherax, enzimas digestivas.*

ABSTRACT

In the last ten years, one freshwater species of crustacean that has generated interest in aquaculture is the freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*, from Australia that was introduced to Mexico in nineties.

This species has a relatively simple culture. However, aspect of nutrition are not well known. In aquaculture feeding is one of the factors of great interest to producers, and one of the more expensive aspects of production. A suitable supply of nutrients assures good growth and health to the organism; nevertheless, to obtain this, optimal nutritional requirements and capacity to assimilate feed need to be investigated.

A study of digestive enzymatic activity in juvenile *Cherax quadricarinatus* was undertaken. By means of bioassays digestive enzymatic response was evaluated under different treatments.

The first experiment consisted of measuring the results of seven artificial diets, using different meals of animal and vegetable origin (squid, red crab, fish, sorghum, soy and wheat) replacing 15% of these ingredients in a basal diet of reference to observe digestive enzyme responses. Relative Growth Rate was greater in crayfish fed with high carbohydrate content diets. Diets with fish meal (60%), and sorghum and wheat meal improve growth. However, there was no correlation between growth and digestive enzyme activity.

The second experiment consisted of providing seven diets with different protein level (20, 26, 32, 38, 44, 50 and 56%). The diet with 32% protein produced the highest Relative Growth Rate. Proteolytic activity was greater for diets with 26, 32, 38, 44 and 50% protein by the end of the experiment. Higher protein levels in the diet reduced proteolytic activity. Amylase activity diminished at the end of the experiment, but lipase activity increased during the same period.

The third and fourth experiments consisted of *in vitro* characterization of digestive enzymatic activity (amylases, lipases, and proteases). Activities were evaluated under different conditions: temperature, NaCl concentration, pH, thermal-stability, inhibitors, and activators. In general the optimal enzyme activity occurred between 35 and 50 °C, NaCl 100 mM, and pH 5 to 8.5. Almost all metals inhibited enzymatic activity, EDTA, and calcium ions produced inhibition in some cases, but in others, favored the activity. Protease specific activities were evaluated. Trypsin, chymotrypsin and carboxipeptidase A activities were found. Carboxipeptidase B and leucinaminopeptidase were not found. Protease activity was inhibited by SDS, and PMSF, but was not inhibited by TLCK, TPCK or ZPCK.

Esterase-lipase activity of the hepatopancreas was evaluated using substrates (α -naphthyl, β -naphthyl and *p*-nitrophenyl derivatives of fatty acids) with different chain lengths. Lipase activity diminished with increased fatty acid length. Using 4-30% polyacrylamide gels, four isoenzymes with hydrolytic activity were found (43, 46, 63, and 118 kDa) and at least one was considered a true lipase.

The fifth experiment evaluated the digestive enzyme response of two animal groups. One was fed and the other was starved during a circadian rhythm. Two peaks of maximum amylase activity were observed, one during the night and the other near dawn. Lipase and protease activity did not show any defined pattern. Lipase and amylase activity in fed and

unfed organisms were not statistically different, and neither were significant differences found in food consumption during the sampling period.

This study contributes basic knowledge of crayfish biology, as well as understanding of the mechanisms of digestive enzyme production. The information serves to establish criteria in the preparation of diets and optimal handling of food in relation to digestive capacities and behavior of this species of increasing commercial importance.

Key words: *Crustaceans, Cherax, digestive enzymes*

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Características de la especie	2
1.2 El alimento y la actividad enzimática digestiva	3
1.3 Ritmos circadianos	4
2. ANTECEDENTES	
2.1 Enzimas digestivas, alimentación y ritmo circadiano	6
2.2 Enzimas digestivas en crustáceos	6
2.2.1 Carbohidrolasas	6
2.2.2 Lipasas y Esterasas	6
2.2.3 Proteasas	7
2.3 Algunos aspectos sobre el sistema digestivo de los crustáceos	10
2.3.1 La boca	10
2.3.2 El esófago	10
2.3.3 El estómago	11
2.3.4 La glándula digestiva	11
2.3.4.1 Las células del hepatopancreas	12
2.3.5 El intestino posterior	13
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVO GENERAL	15
5.1 Objetivos específicos	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS	
EFFECTO DEL TIPO DE INGREDIENTES EN ALIMENTOS EXPERIMENTALES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA. EXPERIMENTO 1	
6.1.1 Obtención de los juveniles.	16
6.1.2 Unidades experimentales	16
6.1.3 Alimentos experimentales	16
6.1.4 Horario de alimentación, ración, muestreo y análisis proximal.	18
6.1.4.1 Extracción de la glándula digestiva y obtención del extracto enzimático	19
6.1.4.2 Análisis enzimático	19
6.1.4.2.1 Actividad amilasa	20
6.1.4.2.2 Actividad lipasa	20
6.1.4.2.3 Actividad proteasa	21
6.1.5 Análisis estadístico	21

EFFECTO DEL NIVEL DE PROTEÍNA EN ALIMENTOS EXPERIMENTALES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA. EXPERIMENTO 2

6.2.1 Unidades experimentales	22
6.2.2 Alimentos experimentales	22
6.2.3. Horario de alimentación, ración, muestreo y análisis proximal	24
6.2.3.1 Extracción de la glándula digestiva y obtención del extracto crudo	24
6.2.3.2. Análisis enzimático	24
6.2.4 Análisis estadístico.	25

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTERASA-LIPASA DE LA GLÁNDULA DIGESTIVA DE LOS JUVENILES. EXPERIMENTO 3

6.3.1 Obtención de los organismos de la langosta de agua dulce	25
6.3.2. Efecto de la temperatura, estabilidad térmica, salinidad, pH, iones metálicos y EDTA sobre la actividad lipasa	25
6.3.2.1 Efecto de la temperatura	25
6.3.2.2 Estabilidad térmica	26
6.3.2.3 Efecto de la salinidad	26
6.3.2.4 Efecto del pH	26
6.3.2.5 Efecto de iones metálicos y EDTA	26
6.3.3 Actividad esterasa usando como sustratos compuestos derivados de β -naftil, α -naftil y <i>p</i> -nitrofenil-ácido graso	27
6.3.4. Perfil electroforético de las enzimas digestivas	27
6.3.5 Elaboración de geles de poliacrilamida con inclusión de β -naftil caprilato	28
6.3.6 Determinación de actividad lipasa usando tributirina	29
6.3.7 Hidrólisis de compuestos derivados del <i>p</i> -nitrofenil ácido graso	29
6.3.8 Análisis estadístico.	29

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE AMILASAS Y PROTEASAS DE LA GLÁNDULA DIGESTIVA. EXPERIMENTO 4.

6.4.1 Obtención de organismos de la langosta de agua dulce.	30
6.4.2 Efecto de la temperatura, estabilidad térmica, salinidad, pH, iones metálicos y EDTA sobre la actividad amilasa y proteasa.	30
6.4.3 Proteasas específicas	31
6.4.3.1 Actividad tipo quimotripsina	31
6.4.3.2. Actividad tipo tripsina	31
6.4.3.3 Actividad carboxipeptidasa A	32
6.4.3.4 Actividad carboxipeptidasa B	32
6.4.3.5 Actividad leucinoaminopeptidasa	33
6.4.3.6 Efecto de inhibidores-activadores y SDS sobre actividad proteasa	33

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA Y CONSUMO DE ALIMENTO DURANTE EL CICLO CIRCADIANO. EXPERIMENTO 5

6.5.1 Diseño experimental	34
6.5.2 Análisis estadístico	35

7. RESULTADOS

EFFECTO DEL TIPO DE INGREDIENTES EN ALIMENTOS EXPERIMENTALES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA. EXPERIMENTO 1

7.1.1 Tasa de crecimiento relativo	36
7.1.2 Actividad enzimática	37

EFFECTO DEL NIVEL DE PROTEÍNA EN ALIMENTOS EXPERIMENTALES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA. EXPERIMENTO 2

7.2.1 Tasa de crecimiento relativo	40
7.2.2 Actividad enzimática digestiva en juveniles de la langosta de agua dulce con alimentos de diferente nivel proteico	41
7.2.2.1 Actividad amilasa	41
7.2.2.2 Actividad lipasa	43
7.2.2.3 Actividad proteasa	44

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTERASA-LIPASA DE LA GLÁNDULA DIGESTIVA DE LOS JUVENILES. EXPERIMENTO 3

7.3.1 Actividad lipolítica del extracto crudo de juveniles	46
7.3.2 Actividad esterasa con compuestos derivados del α y β -naftil y <i>p</i> -nitrofenil-ácido graso	50
7.3.3 Análisis electroforético	52
7.3.4 Actividad cinética sobre sustratos de <i>p</i> -nitrofeniles-acido graso	52

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE AMILASAS Y PROTEASAS DE LA GLÁNDULA DIGESTIVA. EXPERIMENTO 4.

7.4.1 Actividad amilasa y proteasa del extracto crudo del hepatopáncreas	53
7.4.1.1 Temperatura	53
7.4.1.2 Salinidad	54
7.4.1.3 pH	55
7.4.1.4 Iones metálicos y EDTA	58
7.4.1.5 Termoestabilidad de la actividad amilasa y proteasa	59
7.4.1.6 Proteasas específicas	61
7.4.1.7 Efecto de inhibidores de proteasas	61

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA Y CONSUMO DE ALIMENTO DURANTE EL CICLO CIRCADIANO. EXPERIMENTO 5

7.5.1 Consumo de alimento	63
7.5.2 Actividad amilasa	64
7.5.3 Actividad lipasa	66
7.5.4 Actividad proteasa	66

8. DISCUSION

EFFECTO DEL TIPO DE INGREDIENTES EN ALIMENTOS EXPERIMENTALES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA. EXPERIMENTO 1

8.1 Crecimiento de juveniles	68
8.1.1 Actividad enzimática digestiva	69

EFFECTO DEL NIVEL DE PROTEÍNA EN ALIMENTOS EXPERIMENTALES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA. EXPERIMENTO 2

8.2 Crecimiento de juveniles	74
8.2.2 Actividad enzimática digestiva	76

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTERASA-LIPASA DE LA GLÁNDULA DIGESTIVA DE LOS JUVENILES. EXPERIMENTO 3

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE AMILASAS Y PROTEASAS DE LA GLÁNDULA DIGESTIVA. EXPERIMENTO 4.

8.4 Actividad amilasa del extracto crudo del hepatopáncreas	82
8.4.1 Temperatura	82
8.4.2 Salinidad	83
8.4.3 pH	83
8.4.4 Iones metálicos y EDTA	84
8.4.5 Actividad proteasa en el extracto crudo del hepatopáncreas	84
8.4.5.1. Temperatura y termoestabilidad	84
8.4.5.2 Salinidad	85
8.4.5.3 pH	85
8.4.5.4 Iones metálicos y EDTA	86
8.4.6 Termoestabilidad de la actividad amilasa	87
8.4.7 Proteasas específicas	87
8.4.7.1 Efecto de inhibidores, agentes quelantes y SDS sobre la actividad proteasa	88

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA Y CONSUMO DE ALIMENTO DURANTE EL CICLO CIRCADIANO. EXPERIMENTO 5

8.5.1 Actividad amilasa	88
8.5.2 Actividad lipasa	90
8.5.3 Actividad proteasa	91
9. CONCLUSIONES	97
10. SUGERENCIAS	98
11. REFERENCIAS	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Área de distribución natural y de cultivo de la especie <i>Cherax quadricarinatus</i> en Australia	2
Figura 2. Tasa de crecimiento relativo de los juveniles obtenida con alimentos conteniendo diferentes ingredientes del experimento 1	37
Figura 3. Tasa de crecimiento relativo con relación al contenido porcentual de carbohidratos en los alimentos del experimento 1	38
Figura 4. Tasa de crecimiento relativo de los juveniles obtenida con alimentos con diferente nivel de proteína (Experimento 2)	41
Figura 5. Actividad amilasa obtenida en los juveniles alimentados con los diferentes alimentos (Experimento 2)	42
Figura 6. Actividad lipasa obtenida en los juveniles alimentados con los diferentes alimentos (Experimento 2)	44
Figura 7. Actividad proteasa obtenida en los juveniles alimentados con los diferentes alimentos (Experimento 2)	45
Figura 8. Efecto de la temperatura sobre la actividad lipasa, después de una incubación de 30 minutos	46
Figura 9. Termoestabilidad de la actividad lipasa	47
Figura 10. Efecto de la concentración de NaCl sobre la actividad lipasa	48
Figura 11. Efecto del pH sobre la actividad lipasa	49
Figura 12. Efecto de iones metálicos y EDTA sobre la actividad lipasa	49
Figura 13. Actividad enzimática del E.C del hepatopáncreas usando compuestos derivados de α y β naftil	50
Figura 14. (a y b) Actividad enzimática digestiva (lipasa) compuestos derivados del <i>p</i> -nitrofenil-ácidos grasos	51
Figura 15. Zimograma de la actividad esterasa con β naftil acetato y β naftil butirato en geles de poliacrilamida	52
Figura 16. Efecto de la temperatura sobre la actividad amilasa	53
Figura 17. Efecto de la temperatura sobre la actividad proteasa	54
Figura 18. Efecto de la concentración de NaCl sobre la actividad amilasa	55
Figura 19. Efecto de la concentración de NaCl sobre la actividad proteasa	56
Figura 20. Efecto del pH sobre la actividad amilasa	57
Figura 21. Efecto del pH sobre la actividad proteasa	57
Figura 22. Efecto de algunos iones metálicos y EDTA sobre la actividad amilasa	58
Figura 23. Efecto de algunos iones metálicos y EDTA sobre la actividad proteasa	59
Figura 24. Termoestabilidad de la actividad amilasa	60
Figura 25. Termoestabilidad de la actividad proteasa	60
Figura 26. Efecto de algunos inhibidores y activadores de la actividad proteasa del hepatopáncreas	62
Figura 27. Consumo de alimento de los juveniles durante el ciclo circadiano	63
Figura 28. Actividad amilasa de los juveniles durante el ciclo circadiano	64
Figura 29. Actividad lipasa de los juveniles durante el ciclo circadiano	65
Figura 30. Actividad proteasa de los juveniles durante el ciclo circadiano	67

LISTA DE TABLAS.

Tabla I. Composición del alimento de referencia (Experimento 1)	17
Tabla II. Composición de los alimentos experimentales (Experimento 1)	18
Tabla III. Composición de los alimentos experimentales con diferente nivel de proteína. (Experimento 2).	23
Tabla IV. Análisis proximal de los alimentos con diferentes ingredientes (Experimento 1)	36.
Tabla V. Actividad total (U-mg de tejido húmedo de hepatopáncreas) para amilasa, lipasa y proteasa (Experimento 1)	39
Tabla VI. Análisis proximal de los alimentos (Experimento 2)	40
Tabla VII. Actividades de proteasas específicas del extracto de hepatopáncreas de juveniles de <i>Cherax quadricarinatus</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS.

AOAC	Official Methods of Analysis (Métodos oficiales de análisis).
CA	Organismos Con Alimento
CAL	dieta con harina de calamar
D.O.	Densidad Óptica
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNS	Ácido dinotrosalisílico
E.C.	Extracto Crudo
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
E.L.N.	Extracto libre de nitrógeno
GPAA	Gel de poliacrilamida
HP	Hipuril-fenilalanina
HA	Hipuril-arginina
kDa	kilo daltones
LANG	dieta con harina de langostilla
LPNA	Leucin- <i>para</i> -nitroanilida
LSD	Less significance difference (mínima diferencia significativa)
mg l ⁻¹	miligramos por litro
ml	mililitro
mM	milimolar
N	Concentración Normal
nm	nanómetro
PC	Proteína Cruda.

P60	dieta con harina de pescado con 60% de proteína
P65	dieta con harina de pescado con 60% de proteína
PM	Peso Molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
pNFA	<i>para</i> -nitrofenil acetato
pNFB	<i>para</i> -nitrofenil butirato
pNFE	<i>para</i> nitrofenil esterato
ppm	partes por mil
R	dieta de referencia
Rf	Relación de frentes de corrimiento
S	dieta con harina de Sorgo
SA	organismos Sin Alimento
SAAPNA	Succinil-alanina-alanina-pro-fenil-de tetrasodio
SDS	Sulfato dodecil de sodio
SY	dieta con pasta de soya
T	dieta con harina de trigo
TAME	Tosil-L-arginina metil ester
TCA	Ácido trocloroacético
TCR	Tasa de Crecimiento Relativo
TLCK	N- α -tosil-L-lisina clorometil acetona
TPCK	N-Tosil-L-fenilalanina clometil acetona
μ l	microlitro
μ M	micromol

v/v relación volumen:volumen en una solución.

ZPCK N-CBZ-L-fenilalanina clorometilacetona

1. INTRODUCCIÓN.

Dentro de los invertebrados, el grupo de los crustáceos representa gran importancia desde el punto de vista biológico y económico. Destacan por su importancia comercial los crustáceos decápodos donde se incluyen: camarones, cangrejos, jaibas, langostinos y langostas (Brusca y Brusca, 1990)

De las especies de crustáceos decápodos susceptibles de ser cultivadas destacan el camarón, el langostino, y más recientemente en Europa y América la langosta australiana de agua dulce, del género *Cherax* que comprende tres especies con potencial comercial, *Cherax destructor* –(yabbie)-, *Cherax tenuimanus* –(marrón)- y *Cherax quadricarinatus* –(quelas rojas o redclaw en inglés). Comercialmente a este organismo se le conoce como langosta de agua dulce, pero desde el punto de vista filogenético corresponde al grupo de acociles: En inglés se utiliza el término crayfish o crawfish, aunque el primero es el más extendido (Holdich y Lowery, 1988). El término crayfish se emplea para denominar a los crustáceos parecidos al camarón o langosta tanto marinos como de agua dulce (Hobbs, 1988). En este trabajo se considera la propuesta de Hobbs (1988) y se hace uso de crayfish, langosta de agua dulce o acocil para denominar a los crustáceos que viven habitualmente en agua dulce. Las langostas de este género pertenecen a la familia Parastacidae que se distribuye en el hemisferio Austral (Villarreal y Pelaez 1999). La figura 1 presenta el área de distribución y cultivo de *Cherax quadricarinatus* en Australia.

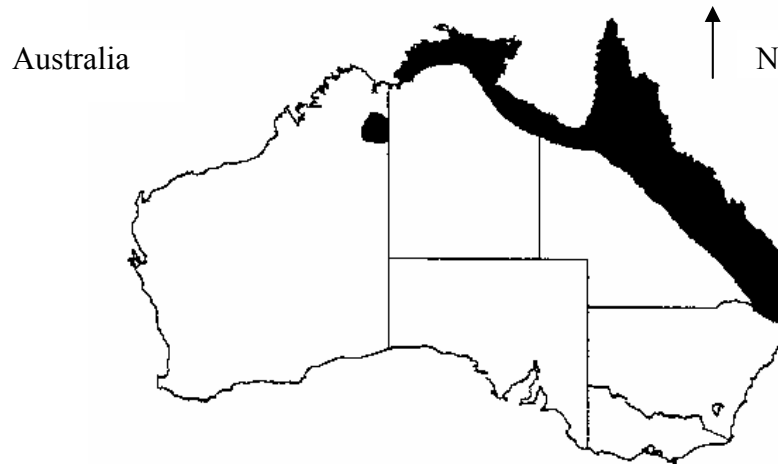


Figura 1. Área de distribución (natural y de cultivo) de la especie *Cherax quadricarinatus* en Australia (Lawrence y Jones, 2002)

La posición taxonómica de la especie según Hobbs (1988) es:

Reino: Animal

Clase: Malacostraca

Phylum: Arthropoda

Superfamilia: Parastacoidea

Subphylum: Crustacea

Familia: PARASTACIDAE

Superorden: Eucarida

Género: *Cherax*

Orden: Decápoda

Especie: *quadricarinatus*

1.1 Características de la especie.

Cherax quadricarinatus ha sido considerada como un buen prospecto para acuicultura comercial por los atributos que presenta. Tiene un ciclo de vida simple, sin estadios larvales libres y alcanza la madurez sexual entre seis y nueve meses. Puede pesar entre 50 y 150 g al final del primer año, y alcanzar 400 g de peso entre los cuatro y cinco años (Villarreal y Pelaez 1999).

Se ha descrito como una especie gregaria y pasiva, puede vivir en grandes densidades con poco comportamiento agresivo. En cultivo, en estado de muda, puede presentar alto canibalismo, aunque el alimento sea abundante. Sobrevive en amplios rangos de temperatura, pero el óptimo es entre 23 y 31 °C. A pesar de ser un organismo de agua dulce, puede tolerar salinidades de hasta 18 ppm (Medley et al. 1994)

El aumento de interés por el cultivo de esta especie, *Cherax quadricarinatus*, ha motivado el desarrollo de su cultivo en otros países como Bahamas, Costa Rica, Ecuador, China, Israel, México y Sudáfrica (Medley et al. 1994)

1.2 El alimento y la actividad enzimática digestiva.

Se han realizado cultivos de esta especie en estanques de tierra, proporcionándole alimentos simples a base de productos agrícolas con propósito de reducir costos. Un factor que no ha permitido la consolidación de esta industria es el desconocimiento de los requerimientos nutritivos de la especie (Medley et al. 1994; D' Abramo y Sheen, 1996).

El conocimiento de la actividad enzimática digestiva permite comprender los mecanismos de digestión y propicia la optimización de la composición del alimento para una mejor nutrición de las especies cultivadas.

La elaboración de alimentos adecuados para los organismos ha sido una preocupación constante para promover una buena digestión y asimilación del alimento. Algunos trabajos han sido reportados relacionados con el efecto del alimento sobre la actividad enzimática digestiva en camarón y langostino.

Lee y Lawrence (1985) encontraron una relación entre el tamaño del organismo y la actividad enzimática digestiva en *Penaeus setiferus*. Maugle et al. (1982) reportaron el efecto del alimento sobre el crecimiento del camarón y la actividad enzimática digestiva.

Sin embargo, no se ha encontrado una correlación entre la actividad enzimática y el crecimiento.

La alimentación representa uno de los factores de mayor costo en la acuicultura (Chamberlain, 1996), donde la proteína es el componente más caro en los alimentos balanceados, y es el elemento más importante para el crecimiento en los organismos que son cultivados (Lee et al. 2000). La elaboración de alimentos balanceados requiere establecer las necesidades mínimas de proteína para proporcionar el nivel de aminoácidos adecuado (Tacon y Akiyama, 1997). La mayoría de los trabajos que estudian la alimentación (nivel de proteína en los alimentos, insumos para la elaboración de alimentos, suplementación con aminoácidos y/o enzimas) y la actividad enzimática digestiva están referidos a decápodos peneidos; sin embargo, dada la reciente incorporación de la especie *C. quadricarinatus* a la acuicultura, los estudios relacionados con esta especie ha ido en aumento.

1.3 Ritmos Circadianos

Los ritmos biológicos se definen como la recurrencia de cualquier fenómeno dentro de un sistema biológico a intervalos más o menos regulados. Los ritmos biológicos tienen un carácter hereditario, es decir están genéticamente determinados. Gran parte de los ritmos biológicos son sincronizados por factores externos. Estos factores externos denominados sincronizadores, son capaces de cambiar o de reajustar el ritmo de un individuo. Los fenómenos biológicos de tipo repetitivo pueden ser variados. Los ritmos de menos de 6 horas y más de 30 minutos son llamados ultradianos y aquellos de más de 28 horas y menos de seis días se denominan infradianos. Los ritmos que duran alrededor de 24 horas son los ritmos circadianos, los cuales dependen del ciclo luz-oscuridad (Carrillo et al. 1997)

La caracterización *in vitro* de estas enzimas hidrolíticas (amilasas, lipasas y proteasas) en la glándula digestiva de los juveniles de *C. quadricarinatus* es parte importante de este trabajo. Así como conocer la respuesta enzimática de estos organismos cuando reciben diferentes estímulos alimenticios, variando la proporción de diferentes ingredientes para la elaboración de alimentos y los porcentajes de inclusión proteica en el alimento. También describir el comportamiento de la actividad enzimática digestiva durante el ciclo circadiano de la especie. Estos elementos contribuyen al conocimiento básico de la biología de la especie. Integrando estos aspectos se pueden establecer criterios más adecuados para el suministro del alimento y la obtención del mejor desempeño de esta especie en cultivo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Enzimas digestivas, alimentación y ritmo circadiano.

2.2 Enzimas Digestivas en crustáceos

Gibson y Barker (1979) hicieron una revisión muy extensa de las enzimas digestivas en diferentes crustáceos. En el hepatopáncreas de estos organismos se encontraron enzimas tales como carbohidrolasas, lipasas y proteasas.

2.2.1. Carbohidrolasas.

Entre las carbohidrolasas se encuentran la (α - y β -amilasas, (α - y β -glucosidasas, (α - y β -galactosidasas, β -fructofuranosidasa, (manosidasa, xilosidasa, fucosidasa, quitobiasa, laminaranasa, quitinasa, celulasa, β -glucosaminidasa, β -glucuronidasa, xilanasa y rafinasa. Carrillo y González (1998) argumentaron que la celulasa es una enzima de fuente exógena aportada por microorganismos simbiotes que viven en el hepatopáncreas del camarón. En contraste, Xue, et al. (1999) encontraron un componente endógeno con actividad celulasa en adultos de la especie *C. quadricarinatus*. González-Agraz (2000) reportó actividad β -glucosidasa en adultos de *Procambarus clarkii* y *C. quadricarinatus*.

2.2.2 Lipasas y estererasas

Las lipasas son enzimas que hidrolizan los enlaces éster de ácidos alifáticos en los triglicéridos. Las lipasas son fisiológicamente importantes porque digieren las grasas en ácidos grasos para la absorción a través de la membrana celular y transformar los triglicéridos en moléculas más polares. Las lipasas han sido encontradas en muchas especies (Berner y Hammond, 1970), pero pocos estudios se han reportado en crustáceos

decápodos. El primer reporte de la presencia de una verdadera actividad lipasa (glicerol-éster hidrolasa E.C.3.1.1.3) en decápodos fue en adultos de *Homarus americanus* (Brockeroff et al. 1970). Biesot y Capuzzo (1990) utilizaron trioleína para determinar la actividad lipasa en larvas de la misma especie y registraron la liberación de ácidos grasos (ácido oleico), siendo el pH óptimo de esta lipasa de 5.5. Figueiredo et al. (2001) reportaron actividad lipasa en el jugo gástrico de adultos de *Cherax quadricarinatus*, usando la técnica de placas de agar con trioleína.

También se han realizado estudios histológicos en el hepatopáncreas para localizar estas enzimas. La actividad esterolítica/lipolítica ha sido localizada en el borde en cepillo y el citoplasma distal de las células R, las vacuolas de las células B, las vacuolas supranucleares de las células F, en el lumen del túbulo del hepatopáncreas, así como en el tejido conectivo intertubular (Gibson y Barker, 1979)

2.2.3 Proteasas.

Las proteasas se clasifican, de acuerdo a la naturaleza química del residuo aminoacídico responsable de la actividad de la enzima, (García-Carreño, 1997). En crustáceos, se ha reportado la presencia de actividad tipo tripsina, tipo quimotripsina, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B, aminopeptidasa y colagenasas. En algunas especies se ha detectado una metaloproteínasa (E.C. 3.4.24.A), y solamente en el cangrejo del género *Uca* se ha detectado actividad colagenolítica (Ceccaldi, 1997). Las proteasas serínicas como la tripsina y quimotripsina poseen un resto de serina (Ser) esencial para la catálisis en sus sitios activos. Mientras que las carboxipeptidasas son exopeptidasas con un metal en su sitio activo.

Vogt et al. (1989) demostraron la presencia de tres proteinasas: tripsina, carboxipeptidasa y astacina en *Astacus astacus*. La astacina es una zinc-endopeptidasa que ha llamado mucho la atención a los investigadores porque puede hidrolizar el colágeno en forma nativa sin tratamiento con ácido clorhídrico. García-Carreño y Haard (1993), trabajaron sobre caracterización de proteasas en el acocil *Pascifastacus astacus*. González-Agraz (2000) caracterizó algunas enzimas proteolíticas (tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa A y B) en adultos de *Cherax quadricarinatus*.

El efecto de la alimentación sobre la actividad enzimática (Hoyle, 1973; Van Wormhoudt, et al. 1980; Lee y Lawrence, 1985; Le Moullac, et al. 1994; Carrillo y González, 1998); y el efecto de la frecuencia alimenticia (Díaz-Granda, 1997). Estos estudios han proporcionado información importante sobre propiedades enzimáticas, fisiología, nutrición y crecimiento de diferentes organismos bajo cultivo. Biessot y Capuzzo (1990) encontraron que el alimento modificó la actividad enzimática en larvas de *Homarus americanus*; Hoyle (1973) encontró cambios en la actividad enzimática respecto al alimento en *Homarus americanus*. Johnston y Yellowless (1998) encontraron una relación entre la preferencia alimenticia y las enzimas digestivas en la langosta *Thenus orientalis*.

Van Wormhoudt et al. (1973), reportó que la actividad enzimática es modificada por cambios en el alimento en *Palaemon serratus*; y que altos niveles de proteína en el alimento reducen la actividad proteolítica (Van Wormhoudt, et al. 1980).

Figueiredo et al. (2001) reportaron actividades enzimáticas digestivas (proteasa, carbohidrolasa y lipasa) en la glándula digestiva y fluido gástrico en adultos de *Cherax quadricarinatus*, indicando que la actividad lipasa fue detectada solamente en el fluido gástrico. Campaña (2001) reportó la digestibilidad *in vivo* de alimentos e ingredientes para juveniles de *C. quadricarinatus* y encontró que la digestibilidad de la materia seca de los

ingredientes vegetales fue mayor que la de los ingredientes animales, así como para proteínas y carbohidratos.

Para la especie *Cherax quadricarinatus* se han reportado pocos estudios relacionados con los procesos enzimáticos digestivos. El trabajo de Xue et al. (1999), habla sobre la actividad celulasa en esta especie; González-Agraz (2000), sobre caracterización parcial de enzimas proteolíticas en cuatro decápodos, donde se incluye a la especie *Cherax quadricarinatus*. Para México, sólo se cuenta con el manual de cultivo elaborado por Villarreal y Pelaez (1999).

Se han realizado varios estudios sobre ritmos circadianos en vertebrados e invertebrados para tratar de explicar el comportamiento y evolución de estos sistemas (Roenneberg y Merrow, 2000)

Van Wormhoudt et al. (1972), encontraron un ritmo bifásico de amilasas y proteasas en *Palaemon serratus*; Rodríguez et al. (1976) reportaron actividades de DNAsa, RNAsa y fosfodiesterasa en el hepatopáncreas de *Palaemon serratus* y encontraron un patrón de dos picos en un periodo de 24 horas; Moreau et al. (1984) reportaron tres picos de actividad esterasa en la hemolinfa de *Penaeus japonicus*; González et al. (1995) evaluaron actividades tripsina, quimotripsina y proteasas generales en *Penaeus schmitti* y *Penaeus notialis* y encontraron dos picos de actividad en un periodo de 24 horas; Díaz-Granda (1997) reportó un pico de actividad proteolítica total después de la alimentación y un segundo pico de actividad asociado al ritmo circadiano en *Penaeus schmitti*; Molina et al. (2000) evaluaron actividades proteasa, amilasa y lipasa en *Litopenaeus vannamei*, encontrando un ciclo bifásico; Nolasco y Vega-Villasante (1998) encontraron un ciclo bifásico de enzimas digestivas en juveniles de *Litopenaeus vannamei* y *Penaeus californiensis*; González et al. (1995a) encontraron que el horario de alimentación afecta la

actividad enzimática durante el ritmo circadiano en adultos de *Penaeus schmitti*. Se conoce solamente un trabajo reportado por Mackeviciene (1983) acerca de la actividad proteolítica y el ciclo circadiano en el acocil *Astacus astacus*, pero para la especie *Cherax quadricarinatus* no tenemos conocimiento de ningún trabajo que relacione la actividad enzimática digestiva durante el ritmo circadiano.

Existen muchas referencias donde se han estudiado la actividad y caracterización de enzimas digestivas en crustáceos peneidos, pero para la especie *C. quadricarinatus*, la mayoría de los trabajos están enfocados hacia la producción.

2.3 Algunos aspectos sobre el sistema digestivo de los crustáceos.

En los crustáceos, el tracto digestivo está dividido en tres porciones principalmente: una porción anterior, comprendida por el esófago y una parte del estómago donde se localizan las partes masticadoras; una porción media y la porción posterior. Se describe de manera resumida las funciones de las partes involucradas en el proceso de ingestión y digestión del alimento.

2.3.1 La boca

Está asociada con los apéndices prensiles, las maxílulas, maxilas, mandíbula y maxilípedos. La parte anterior de la boca está reforzada por un labio, el cual evita el reflujo del material ingerido. Esta estructura está encargada de reducir el tamaño del alimento para poder ser transferido al esófago.

2.3.2 El esófago

Usualmente es corto, recto y localizado verticalmente en corte transversal presenta prolongaciones laterales del labio, dando al lumen una forma de X. En las langostas de

agua dulce, el esófago penetra en la porción cardiaca del estómago. En el esófago el alimento es lubricado antes de ser conducido al estómago (Vogt, 2002).

2.3.3 El estómago

El estómago incluye el molino gástrico y un sistema de filtros que sirven para la molienda y rompimiento químico de las moléculas del alimento. El estómago está dividido en dos partes, una anterior (cardiaco) que sirve para el rompimiento físico y químico del alimento y un estómago posterior (pilórico) el cual filtra el quimo. Está constituido por un sistema extenso de osículos fijados al músculo (Vogt, 2002) El estómago cardiaco siempre está lleno de un fluido digestivo café; en *Astacus astacus* el pH de este fluido es ligeramente ácido (5.6). Cuando el alimento entra al estómago cardiaco, es repetidamente macerado y mezclado con las enzimas digestivas. Esta mezcla (quimo) después es filtrada una vez por los filtros primarios localizados en el piso del estómago. La parte pilórica del estómago tiene como función principal el filtrado del material, para después ser pasado al hepatopáncreas o glándula digestiva (Vogt, 2002).

2.3.4 La glándula digestiva

También llamado hepatopáncreas, se localiza en la porción media del tracto digestivo; es el mayor órgano de los crustáceos decápodos y tiene muchas funciones biológicas, las cuales incluyen: síntesis y secreción de enzimas digestivas, absorción de productos digeridos, mantenimiento de reservas minerales y sustancias orgánicas, metabolismo de lípidos y carbohidratos, distribución de reservas durante el ciclo de muda y catabolismo de algunos compuestos orgánicos. A esta glándula se encuentran asociados unos túbulos pequeños que constituyen la masa glandular, llamados por algunos autores divertículos. La

función de estas estructuras, no ha sido aún suficientemente entendida. Por su parte, la función del resto del intestino medio es la absorción de los nutrimentos.

2.3.4.1 Células del Hepatopáncreas

El epitelio del hepatopáncreas incluye cinco tipos de células; las células embrionarias (E) localizadas en la parte distal de los túbulos, las células de absorción (R), las células fibrilares (F) donde se lleva acabo principalmente la síntesis de enzimas, las células tipo ampolla (B) y las células enanas (M). (Vogt, 2002)

Las células F (fibrilares) sintetizan y segregan enzimas para la digestión extracelular, seguidamente ellas toman material para la digestión intracelular. A las células B realizan la digestión intracelular. Ellas pinocitan material del lumen y éste se acumula en una gran vacuola que domina el citoplasma. Después de cada ingestión de alimento las células B sostienen una secuencia de actividades para el procesamiento de los nutrientes: absorción, condensación, digestión intracelular, asimilación, y finalmente todo el contenido citoplasmático es expulsado hacia el lumen.

Las células R (células absorptivas) absorben nutrientes solubles del lumen y almacenan lípidos y glucógeno.

Las células M no poseen microvellosidades, pero incluyen gran número de gránulos; se piensa que regulan la red muscular de los túbulos o que tienen una función análoga a las células del sistema endocrino de los vertebrados.

Se han propuesto distintos esquemas de diferenciación (Gibson y Barker, 1979). Todas las teorías coinciden en que la diferenciación celular comienza con las células embrionarias E en los ápices distales de los túbulos, sin embargo los modelos de

diferenciación celular muestran que esto no ocurre (Vogt, 1994), al menos en *Astacus astacus*. En el género *Cherax*, esta diferenciación celular no se ha reportado.

2.3.5 El intestino posterior

Se extiende desde el intestino medio hasta el ano, El epitelio probablemente está asociado al transporte de agua e iones, esta región del tracto juega un papel importante además de la defecación, en el proceso de osmorregulación (Vogt, 2002)

3. JUSTIFICACIÓN

Dentro de la acuicultura un aspecto fundamental lo representa la alimentación y la nutrición, que están consideradas como críticas para el cultivo, ya que la buena o mala alimentación repercutirá en el crecimiento y salud del organismo y en general en su desempeño productivo.

Los acuicultores necesitan dar alimento en la cantidad y calidad requerida por el organismo a cultivar (Tacon y Forster, 2000). Desafortunadamente, el conocimiento sobre requerimientos alimenticios, biodisponibilidad de ingredientes y actividad enzimática en respuesta a los alimentos es escaso para el género *Cherax* (D' Abramo y Sheen, 1996).

Es comprensible que se busque dar un alimento en la calidad y cantidad requeridas por el individuo en cultivo, sin embargo, es frecuente que no se tome en cuenta las capacidades digestivas del organismo. Es en este punto donde se deben considerar las diferentes capacidades digestivas de cada especie, así como sus posibles cambios durante los diferentes estadios de desarrollo, a pesar de presentar morfología externa muy parecida.

Por lo anterior, se ha visto que no es suficiente tener un buen alimento desde un punto de vista nutricional, sino también que el organismo pueda digerirlo; de aquí que sea importante

hacer estudios sobre las diferentes enzimas digestivas junto con los factores externos (factores abióticos) e internos que pueden modificar los comportamientos alimenticios, de tal modo que se pueda dar un mejor manejo a la alimentación y al cultivo. Huner (1995) ha demostrado que este tipo de organismos aceptan muy bien el alimento elaborado.

Los trabajos publicados sobre langostas de agua dulce están relacionados basados predominantemente con los cambáridos del Hemisferio Norte, especialmente, *Procambarus clarkii* (Jover et al. 1999) y los astácidos de Europa, como *Astacus astacus* (L) (Ackefors et al. 1992). Estudios de nutrición en la langosta marina *Homarus americanus* (Moreau et al. 1985) y camarones marinos, del género *Penaeus*. (Baillet et al. 1997), constituyen una importante información acerca de la nutrición en decápodos. Sin embargo, diferencias en el comportamiento alimentario así como las condiciones ambientales limitaron la posibilidad de aplicar estos conocimientos a la especie *C. quadricarinatus*. Por lo que es necesario generar información acerca de esta especie.

El conocimiento de la actividad enzimática digestiva de *Cherax quadricarinatus*, respecto a sus características, propiedades, origen y el efecto de estímulos en su producción en el tracto digestivo, permitirán tener más elementos para el diseño de mejores alimentos y estrategias de alimentación de la especie en cultivo.

4. HIPÓTESIS.

a) Considerando el carácter omnívoro de la langosta de agua dulce, *Cherax quadricarinatus*, se encontrará actividad proteolítica, lipolítica y amilolítica y las correspondientes enzimas serán producidas de manera diferente en el hepatopáncreas dependiendo de la concentración de diferentes ingredientes en los alimentos.

b) Considerando que el alimento estimula la producción enzimática, se encontrará mayor actividad de las proteasas en animales que se les proporcione alimentos con mayor cantidad de proteínas.

c) Como se ha reportado para otros crustáceos, se espera que los picos de mayor actividad enzimática digestiva en *Cherax quadricarinatus* se encuentren al amanecer y al atardecer.

5. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la actividad enzimática digestiva en juveniles de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*.

5.1 Objetivos específicos.

1.- Conocer el efecto que tiene el tipo de alimentación (diferentes ingredientes) sobre la actividad enzimática digestiva en juveniles de *Cherax quadricarinatus*

2.-Conocer el efecto que tiene el nivel de proteína del alimento sobre la actividad enzimática digestiva en juveniles de *Cherax quadricarinatus*.

3.-Caracterizar parcialmente las enzimas digestivas (amilasas y proteasas) en juveniles, evaluando la actividad enzimática con respecto al efecto de la temperatura, salinidad, iones, pH y diferentes inhibidores y activadores enzimáticos.

4.-Conocer la variación cualitativa de las lipasas-esterasas, mediante el perfil de isoenzimas, en juveniles de langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*.

5. -Conocer la producción de enzimas digestivas durante el ciclo circadiano en juveniles de *Cherax quadricarinatus*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Efecto del tipo de ingredientes en alimentos experimentales sobre la actividad enzimática digestiva. Experimento 1

6.1.1 Obtención de los organismos.

Los organismos juveniles de langosta de agua dulce (*Cherax quadricarinatus*) se obtuvieron de estanques de cultivo cuya área es de 1000 m², a cielo abierto con aireación constante, localizados en el CIBNOR. Los individuos fueron mantenidos en el laboratorio de nutrición acuícola a una temperatura de 27 ± 1 °C. La obtención de los organismos utilizados en los siguientes experimentos, proceden del mismo lugar.

6.1.2 Unidades experimentales

Se utilizaron 16 tinas de plástico de 60 litros c/u. Todas las unidades recibieron un flujo continuo de agua filtrada (10 µm) y esterilizada con luz ultravioleta. La temperatura del agua fue mantenida a 27 ± 1 °C, usando calentadores de 250 Watts. La concentración de oxígeno fue mantenida a niveles superiores a 4 mg L⁻¹. El fotoperiodo fue el natural de la estación (verano) (13 hrs L:11 hrs O). Cada unidad experimental tenía una malla de nylon que servía como escondrijo para los animales.

6.1.3 Alimentos experimentales.

Se formularon y evaluaron ocho alimentos experimentales con el programa Mixit-Win se de acuerdo al método descrito en Civera y Guillaume (1989). Cada alimento experimental estuvo compuesto por 84.5% de un alimento de referencia (R) (Tabla I) y el resto (15%) con cada uno de los siguientes ingredientes: harina de calamar (CAL), harina

de langostilla (LANG), harina sardina con 60% de proteína (P60), harina sardina con 65% de proteína (P65), harina de sorgo (S), pasta de soya (SY) y harina de trigo (T) (Tabla II). Para cada alimento se tuvieron dos unidades experimentales. Todos los alimentos contenían 0.5% de óxido de cromo como marcador inerte. El óxido de cromo fue añadido a los alimentos porque las excretas de estos organismos fueron utilizadas en otro experimento para pruebas de digestibilidad *in vivo*.

Ingrediente	R (g kg ⁻¹)	Ingrediente	R(g kg ⁻¹)
Harina de Calamar	0	Aceite de pescado (sardina)	5
Harina de langostilla	20	Lecitina de soya	5
Harina de Sardina al 60%	0	Mezcla de minerales ^a	25
Harina de Sardina al 65%	265	Mezcla de vitaminas ^b	4
Harina de Sorgo	250	Vitamina C ^c	0.5
Pasta de soya	250	Cloruro de colina ^d	0.5
Harina de trigo	120	Carbonato de calcio	10
Grenetina	40	Óxido crómico	5

Harina de calamar (HCAL 98-G); Harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) (HL01/98); Harina de sardina con 60% de proteína (HPS9901-60); Harina de sardina con 65% de proteína (HPS9901-65); Harina de sorgo (SM9901-0019); Pasta de soya (SP9901-01); Harina de trigo (TTX9901-01).

^a Mezcla de minerales (g/Kg de alimento). KCl, 0.5; MgSO₄·7H₂O, 0.5; ZnSO₄·7H₂O, 0.09; MnCl₂·4H₂O, 0.0234; CuSO₄·5H₂O, 0.005; KI, 0.005; CoCl₂·2H₂O, 0.0025; Na₂HPO₄, 2.37.

^b Mezcla de vitaminas (Todos los valores están en mg/Kg de alimento, excepto donde está indicado). Vit. A Retinol, 5000 IU; Vit. D₃ 4000 IU; Vit. E Tocoferol, 100; Vit. K Menadiona, 5; Tiamina, 60; Riboflavina, 25; Piridoxina, 50; dl-Ácido Pantoténico, 75; Niacina, 40; Biotina, 1; Inositol, 400; Cianocobalamina, 0.2; Ácido fólico, 10.

^c Stay C (35% agente activo) Roche.

^d 62% agente activo

Tabla II. Composición de los alimentos experimentales

Alimento	CAL	LANG	P60	P65	S	SY	T
Ingrediente	(g kg ⁻¹)	(g kg ⁻¹)	(g kg ⁻¹)	(g kg ⁻¹)	(g kg ⁻¹)	(g kg ⁻¹)	(g kg ⁻¹)
Referencia	845	845	845	845	845	845	845
Harina de Calamar	150	-	-	-	-	-	-
Harina de Langostilla	-	150	-	-	-	-	-
Harina de Pescado 60%	-	-	150	-	-	-	-
Harina de Pescado P65	-	-	-	150	-	-	-
Harina de Sorgo	-	-	-	-	150	-	-
Pasta de soya	-	-	-	-	-	150	-
Harina de trigo	-	-	-	-	-	-	150
Óxido de cromo	5	5	5	5	5	5	5

R= Alimento de referencia; CAL= Harina de calamar (HCAL 98-G); LANG= Harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) (HL01/98); P60= Harina de sardina con 60% de proteína (HPS9901-60); F65= Harina de sardina con 65% de proteína (HPS9901-65); S= Harina de sorgo (SM9901-0019); SY= Pasta de soya (SP9901-01); T= Harina de trigo (TTX9901-01).

6.1.4 Horario de alimentación, ración, muestreo y análisis proximal.

Veinte organismos con un peso entre 1.24 y 1.70 g., en estadio de intermuda. fueron colocados en cada unidad experimental. Diariamente se eliminaban las excretas de las unidades experimentales mediante sifoneo y el 75% del agua era reemplazada. La alimentación se proporcionó dos veces al día (11:00 y 17:00 horas). La ración fue del 3% de la biomasa al inicio del experimento y se ajustó de acuerdo al alimento residual. El peso inicial de los organismos fue medido con una balanza analítica con una precisión de 0.001 g. A los 15 y 30 días de iniciado el experimento se registró nuevamente el peso de los organismos y con estos datos se determinó la tasa de crecimiento relativo usando la expresión

$$\text{TCR} = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso Inicial}} * 100 \quad (1)$$

Los resultados se expresaron en porcentaje. Al inicio del experimento, a los 15 y 30 días de cada tratamiento se extrajeron seis organismos en estadio C, para realizar el análisis enzimático. Los organismos fueron sacrificados por congelación a la misma hora (18:00 horas) y después almacenados a -40 °C en bolsas de plástico con cierre hermético.

Los análisis proximales de los ingredientes y los alimentos se realizaron por triplicado de acuerdo a la AOAC (1995).

6.1.4.1 Extracción de la glándula digestiva y obtención del extracto enzimático.

Los organismos extraídos de las unidades experimentales se almacenaron a -40°C hasta el momento de la disección. Previo a ésta, los organismos se pesaron y midieron. Se obtuvo por disección la glándula digestiva (hepatopáncreas) de tres individuos de cada réplica y se realizó un pool., que se homogeneizó en un baño de hielo con 4 volúmenes (respecto al peso del tejido) de solución amortiguadora de Tris-HCl, 50 mM, pH 7.5, en un homogeneizador de tejidos. El homogeneizado se centrifugó durante 15 minutos a 23 000g a 5 °C, se retiró la capa lipídica y el sobrenadante fue usado como extracto crudo (E.C.) para el análisis enzimático.

6.1.4.2 Análisis enzimático.

La actividad enzimática de la glándula digestiva fue reportada como actividad total, la cual se expresa en unidades de enzima por mg de tejido húmedo. Todos los análisis enzimáticos se realizaron por triplicado. Todos los reactivos fueron obtenidos de SIGMA CHEMICAL, USA.

6.1.4.2.1 Actividad amilasa.

La actividad amilasa en cada extracto crudo de la glándula digestiva fue determinada de acuerdo al método descrito por Vega-Villasante et al. (1993) La mezcla de reacción consistió de 495 μ l de Tris-HCl (50 mM, pH 7.5) y 5 μ l de extracto crudo. Después de la incubación a 25 °C por 5 minutos, se agregaron 500 μ l de solución de almidón al 1% en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. Esta mezcla fue incubada a una temperatura de 25 °C por 15 minutos. La actividad amilasa fue determinada por la producción de azúcares reductores resultado de la hidrólisis del almidón. Inmediatamente después de la incubación se añadieron 200 μ l de carbonato de sodio 2N y 1.5 ml de ácido dinitrosalisílico (DNS) y la mezcla se calentó a ebullición durante 15 minutos. Se ajustó el volumen a 10 ml con agua destilada y la solución colorida fue leída a 550 nm. Los tubos de referencia se prepararon de igual manera, pero el extracto crudo fue añadido después del DNS. Se usó un control negativo donde se sustituyó el extracto crudo por Tris-HCl. Una unidad de amilasa fue definida como la cantidad de enzima requerida para causar un incremento de 0.01 unidades de D.O. a 550 nm por minuto. El análisis se realizó por triplicado.

6.1.4.2.2 Actividad lipasa

La actividad lipasa se determinó de acuerdo al método propuesto por Versaw et al. (1989) La mezcla de reacción consistió de 100 μ l de tauracolato de sodio (100 mM), 1900 μ l de Tris-HCl (50 mM, pH 7.5) y 10 μ l de extracto crudo; se incubó la mezcla a 25 °C durante 5 minutos, después se añadieron 10 μ l de sustrato (β -Naftil caprilato 200 mM disuelto en dimetil sulfoxido, DMSO). Posteriormente, se incubó durante 30 minutos a 25 °C. Después se adicionaron 20 μ l de Fast Blue BB (100 mM en DMSO) y se incubó durante 5 minutos a la misma temperatura. La reacción se detuvo con la adición de 200 μ l

de TCA (0.72 N) y clarificada con 2.71 ml de una solución 1:1 de alcohol etílico: acetato de etilo. La absorbancia fue leída a 540 nm. Los tubos de referencia se prepararon de igual manera, pero el extracto crudo fue añadido después del TCA. Se usó un control negativo donde se sustituyó el extracto crudo por Tris-HCl. Una unidad lipasa fue definida como la cantidad de enzima requerida para causar un incremento de 0.01 unidades de D.O. a 540 nm por minuto. El análisis se realizó por triplicado.

6.1.4.2.3 Actividad proteasa

La actividad proteasa se determinó de acuerdo a Vega-Villasante et al. (1995). El procedimiento fue el siguiente: 20 µl de extracto crudo, 240 µl de Tris-HCl (50 mM, pH 7.5), 500 µl de azocaseína al 1% en Tris-HCl (50 mM, pH 7.5). La mezcla fue incubada a 25 °C durante 60 minutos, la reacción fue detenida con la adición de 500 µl de ácido tricloacético (TCA) al 20%. La mezcla se clarificó por centrifugación a 23 000g durante 5 minutos a 25 °C. La absorbancia fue leída a 440 nm (Spectronic 2000, Bausch and Lomb, Rochester, New York, USA). Los tubos de referencia se prepararon de igual manera, pero el extracto crudo fue añadido después del TCA. Se usó un control negativo donde se sustituyó el extracto crudo por Tris-HCl. Una unidad proteasa fue definida como la cantidad de enzima requerida para causar un incremento de 0.01 unidades de D.O. a 440 nm por minuto. El análisis se realizó por triplicado.

6.1.5 Análisis estadístico

La actividad enzimática fue analizada por un análisis de varianza de una vía y se realizó un análisis de comparación múltiple de Tukey para determinar diferencias significativas entre tratamientos. Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman para determinar relaciones entre la TCR, actividad enzimática y el nivel de inclusión del

ingrediente en los alimentos. Se usó el paquete estadístico STATISTICA, Statsoft, Inc, Tulsa, USA. Versión 6.

Efecto del nivel de proteína en alimentos experimentales sobre la actividad enzimática digestiva. Experimento 2

6.2.1 Unidades experimentales.

En el laboratorio se dispuso de 7 unidades experimentales de forma circular con un área de 2 m² y 300 litros de capacidad, cada unidad se dividió en tres secciones iguales con una malla. Las condiciones de mantenimiento fueron iguales a las que se describieron en el punto 6.1.2. El fotoperiodo fue el natural de la estación (verano) (13 hrs L:11 hrs O). A cada unidad experimental se le puso una malla de nylon que sirvió como escondrijo para los organismos. En cada unidad experimental se colocaron 150 individuos (50 individuos por sección), considerando cada 50 individuos como una réplica del tratamiento. Los juveniles usados para este experimento tenían un peso promedio de $0.25 \pm .03$ g.

6.2.2 Alimentos experimentales.

Los alimentos experimentales que se proporcionaron a los organismos tuvieron diferentes niveles de inclusión de proteína. En la tabla III se indica la formulación de estos alimentos y se basó en los resultados de digestibilidad reportados por Campaña (2001). Se utilizó la siguiente clave para la designación del tratamiento A20= 20% PC, A26= 26% PC, A32= 32% PC, A38= 38% PC, A44= 44% PC, A50= 50% PC y A56= 56% PC.

Tabla III. Composición de los alimentos experimentales con diferente nivel de proteína

Ingredientes	20% PC	26% PC	32% PC	38% PC	44% PC	50% PC	56% PC
Harina de sardina ¹	1.0	10.5	20.1	29.8	39.7	49.7	59.5
Harina de sorgo ¹	64.6	56.1	47.3	37.8	27.9	17.9	9
Pasta de soya ¹	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Harina de langostilla ²	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Harina de calamar ¹	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Harina de trigo ¹	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Grenetina	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Aceite de pescado ¹	2.4	1.4	0.6	0.4	0.4	0.4	0.0
Lecitina de soya ¹	1.0	1.01.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5
Premezcla de minerales ³	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Premezcla de vitaminas ⁴	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Ácido ascórbico ⁵	0.1	0.21	0.1	0.1	0.10.1	0.1	0.1
Cloruro de colina ⁶	0.1	0.21	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Carbonato de calcio ⁷	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

¹ PIASA, La Paz, B.C.S. México² *Pleuroncodes planipes* Conservera San Carlos S.A. de C.V. San Carlos, B.C.S.³ Premezcla de minerales (g Kg⁻¹): KCl, 0.5; MgSO₄·7H₂O, 0.5; ZnSO₄·7H₂O, 0.09; MnCl₂·4H₂O, 0.0234; CuSO₄·5H₂O, 0.005; KI, 0.005; CoCl₂·2H₂O, 0.0025; Na₂HPO₄, 2.37.⁴ Premezcla de vitaminas (mg Kg⁻¹ excepto donde se especifica): Vitamina A Retinol, 5000UI; Vitamina D₃, 4000UI; Vitamina E Tocoferol, 100; Vitamina K Menadiona, 5; Tiamina, 60; Riboflavina, 25; Piridoxina, 50; Ácido Pantoténico, 75; Niacina, 40; Biotina, 1; Inositol, 400; Cianocobalamina, 0.2; Ácido fólico, 10.⁵ Stay C (35% agente activo). Roche⁶ Cloruro de colina (65% agente activo).⁷ ACS reactivo, SIGMA[®]

6.2.3 Horario de alimentación, ración, muestreo y análisis proximal

La alimentación se efectuó una vez al día (13:00 hrs.). La cantidad de alimento que se proporcionó a cada uno de los tratamientos fue de 5 g (13.5% de la biomasa total) y la ración se ajustó de acuerdo al consumo aparente.

Se tomaron 3 organismos por réplica de cada tratamiento (A20, A26, A32, A38, A44, A50 y A56) al inicio del experimento (t_0), después a los 15, 30 y 45 días a fin de extraer la glándula digestiva para la obtención del E.C. Durante esos mismos días de muestreo, se realizaban las biometrías, registrando el peso de los organismos. La extracción al azar de los organismos en intermuda se realizó a la misma hora del día (18:00 hrs.). Cada dos días se realizaba el recambio de agua al 75% y se extraían las excretas de los acuarios por sifoneo.

6.2.3.1 Extracción de la glándula digestiva y obtención del extracto crudo.

La descripción de este punto se menciona en el apartado 6.1.4.1

6.2.3.2 Análisis enzimático.

La actividad enzimática de la glándula digestiva fue reportada como actividad específica, la cual se expresa en unidades de enzima por mg de proteína. El análisis de proteína se realizó por el método de Bradford (1976), utilizando como estándar albúmina de bovino a una concentración de 1 mg ml^{-1} . Todos los análisis enzimáticos se realizaron por triplicado. Todos los reactivos fueron obtenidos de SIGMA CHEMICAL, USA.

6.2.4 Análisis estadístico.

Los datos de actividad específica se sometieron a un análisis de varianza de una vía, posteriormente se realizó un análisis de comparación múltiple por el método de LSD para ver diferencias estadísticas en la actividad enzimática digestiva por efecto de los alimentos. El nivel de significancia fue de 0.05. El análisis se realizó utilizando el paquete estadístico STATISTICA Versión 6. Statsoft, Inc, Tulsa, USA.

Caracterización de la actividad esterasa-lipasa de la glándula digestiva de los juveniles. Experimento 3

6.3.1 Obtención de organismos de langosta de agua dulce.

Para este experimento se utilizaron 20 juveniles que tenían un peso promedio de 4.2 g \pm 1.4 en estado de intermuda. La extracción de la glándula digestiva y obtención del extracto crudo fue como se describió en el apartado 6.1.4.1. El E.C. obtenido fue sometido a diferentes condiciones experimentales *in vitro* para evaluar la actividad esterasa y lipasa.

6.3.2 Efecto de la temperatura, estabilidad térmica, salinidad, pH, iones metálicos y EDTA sobre la actividad lipasa.

6.3.2.1 Efecto de la temperatura.

Las determinaciones de la actividad enzimática se realizaron de acuerdo al método descrito en el apartado 6.1.4.2.2, modificando las condiciones de incubación de la mezcla

de reacción. Las temperaturas usadas fueron 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 y 90 °C. La actividad se reportó como actividad específica.

6.3.2.2 Estabilidad térmica

Para determinar la estabilidad térmica de las enzimas, el E.C. se sometió a 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 y 90 °C durante 30 minutos. El E.C. se mantuvo en hielo después del tratamiento para determinar la actividad residual, la cual se expresó en porcentaje con relación al valor de referencia obtenido a temperatura ambiente.

6.3.2.3 Efecto de la salinidad

La salinidad de la mezcla de reacción se determinó variando la salinidad desde 0 hasta 1500 mM de NaCl. La actividad fue reportada como actividad específica.

6.3.2.4 Efecto del pH

Se modificó el de la mezcla de reacción desde 5 hasta 10 usando un buffer universal (Stauffer, 1989). La actividad se reportó como actividad específica.

6.3.2.5 Efecto de iones metálicos y EDTA

Para esta determinación se usaron las siguientes sales metálicas: AlCl₃, CaCl₂, CoCl₂, CuCl₂, FeCl₃, HgCl₂, MgCl₂, ZnCl₂; Thimerosal y el EDTA. Todas las sales en la mezcla de reacción fueron ajustadas a una concentración de 10 mM, excepto el HgCl₂, el cual se ajustó a 5 mM. La actividad enzimática se reportó como actividad específica.

En cada ensayo en donde se modificó uno de los factores se mantuvieron constantes los demás parámetros, de acuerdo a las condiciones originales de cada determinación.

6.3.3 Actividad esterasa usando como sustratos compuestos derivados de β -naftil, α -naftil y *p*-nitrofenil-ácido graso.

La actividad enzimática usando los compuestos de β -naftil y α -naftil-ácido graso se determinó de acuerdo al método de Versaw et al. (1989) Los compuestos utilizados fueron de diferente longitud de cadena de ácidos grasos. Se usó un control sustituyendo el sustrato con una solución de DMSO o cloroformo, éste último se usó para disolver compuestos con 12 y 14 carbonos en la cadena del ácido graso.

La determinación de la actividad esterasa para los compuestos derivados del *p*-nitrofenil se realizó con una modificación del método propuesto por Iijima et al. (1998). Los compuestos tenían una longitud entre 2 y 18 carbonos. La mezcla de reacción consistió de 420 μ l de amortiguador universal (pH 8), 50 μ l de tauracolato de sodio 10 mM y 20 μ l de sustrato 10 mM disuelto en acetonitrilo o cloroformo dependiendo del sustrato. La solución fue mezclada con 10 μ l de E.C. La concentración final del sustrato fue de 400 μ M. La mezcla de reacción fue incubada a temperatura ambiente durante 15 minutos y detenida por la adición de 700 μ l de una solución 5:2 v/v de acetona/hexano, después fue centrifugada a 4576g por 2 minutos a 25 °C. La fase inferior del centrifugado fue leída a 405 nm.. Se preparó un control añadiendo el E.C. después de la solución acetona/hexano para determinar la hidrólisis instantánea; además, se preparó un control adicional sustituyendo el E.C. con acetonitrilo o cloroformo. La actividad se reportó como actividad específica.

6.3.4 Perfil electroforético de las enzimas digestivas.

Se prepararon geles de poliacrilamida (GPAA) en gradiente (Bio-Rad, Richmond, CA). El ensayo se realizó en condiciones nativas modificando el método descrito por

Laemmli (1970). Los geles fueron montados en una cámara vertical de electroforesis (Bio-Rad, Richmond, CA). A 200 μl de E.C. y a una muestra de lipasa porcina (Tipo VI, L0382, SIGMA[®]) con una concentración de 1 mg ml^{-1} se le añadieron 20 μl de azul de bromofenol al 0.1% y sacarosa al 10%. Una submuestra de 20 μl de esta mezcla fue colocada en el pozo correspondiente. Se utilizó un marcador de peso molecular (#17-0445-01, Pharmacia, Uppsala). El corrimiento se efectuó a 120 volts hasta que la marca del azul de bromofenol estuviera a 0.5 cm del borde inferior del gel. Después el gel se enjuagó con Tris-HCl 50 mM, pH 8.0. Posteriormente el gel se introdujo en una mezcla de 19 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 y β -naftil acetato o butirato 100 mM mas 500 μl de Fast Blue 100 mM y se incubó durante 10 minutos a 25 °C. La coloración rojo-magenta de las bandas indicó la actividad positiva. El perfil de isoenzimas se obtuvo por imagen de escáner. A partir de los valores de Rf se calculó la masa molecular de las isoenzimas con la ecuación obtenida del patrón de referencia.

6.3.5 Elaboración de geles de poliacrilamida con inclusión de β -naftil caprilato.

Se preparó un gel de poliacrilamida en gradiente del 4 al 30%, con la inclusión de β -naftil caprilato quedando a una concentración final de 5 mM. Las condiciones de corrimiento fueron como se describió anteriormente. El perfil de isoenzimas se obtuvo incubando el gel en una solución de Fast Blue 100 mM. Para determinar el perfil de proteínas, el gel fue teñido con una solución al 0.1% de azul de Coomassie disuelto en una mezcla de metanol al 40% y ácido acético al 10%, durante una hora. Finalmente el gel se enjuagó durante 24 horas en una solución de metanol al 40% y ácido acético al 10% v/v.

6.3.6 Determinación de actividad lipasa usando tributirina.

Se preparó un gel como se describió previamente, y después del corrimiento el gel se enjuagó con Tris-HCl 50 mM, pH 8.0. Posteriormente se preparó una mezcla con emulsión de tributirina 144 mM y 0.8% de agarosa. Esta mezcla a 40 °C se colocó sobre el gel de poliacrilamida para obtener un nuevo gel, este sistema de geles fue incubado a 37 °C en una cámara húmeda durante 30 minutos para favorecer la hidrólisis del sustrato en el gel de agar. La actividad hidrolítica se evidenció por la observación de una zona transparente sobre el gel opaco.

6.3.7 Hidrólisis de compuestos derivados del *p*-nitrofenil ácido graso.

La actividad hidrolítica fue evaluada de acuerdo a Iijima *et al.* (1998). La mezcla de reacción consistió de 20 µl de *p*-nitrofenil acetato (*p*NFA), butirato (*p*NFB) o esterato (*p*NFE), 50 mM y 1.8 ml de amortiguador universal (pH 8.0). Al tiempo cero se añadieron 20 µl de E.C. El cambio de absorbancia se leyó a 348 nm durante 3 minutos. Se utilizó un control positivo de lipasa porcina (Tipo VI, L0382, SIGMA[®]) con una concentración de 1mg ml⁻¹. La hidrólisis espontánea se determinó sustituyendo el E.C. por amortiguador universal. A partir de la ecuación obtenida se calculó la actividad enzimática. La actividad se reportó como actividad específica. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

6.3.8 Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza de una vía no paramétrico, para la actividad esterasa bajo diferentes condiciones de reacción. Se realizó una prueba de Duncan para ver

diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. Para los análisis se utilizó el programa Statistica, Versión 6, Statsoft, Inc, Tulsa, USA.

Caracterización parcial de amilasas y proteasas de la glándula digestiva.

Experimento 4.

6.4.1 Obtención de organismos de langosta de agua dulce.

Para este experimento se utilizaron 20 juveniles que tenían un peso promedio de 4.2 g \pm 1.4 en estado de intermuda. La extracción de la glándula digestiva y obtención del extracto crudo fue como se describió en el apartado 6.1.4.1. El E.C. obtenido fue sometido a diferentes condiciones experimentales *in vitro* para evaluar la actividad amilasa y proteasa.

6.4.2 Efecto de la temperatura, estabilidad térmica, salinidad, pH, iones metálicos y EDTA sobre la actividad amilasa y proteasa.

La determinación de la actividad amilasa se realizó de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 6.1.4.2.1 y la actividad proteasa como se describe en el apartado 6.1.4.2.3. Las diferentes condiciones en las que se realizaron la determinaciones de ambas actividades se describen en el apartado 6.3.2. La única variante fue el ensayo del efecto de la temperatura sobre estas actividades enzimáticas. Las temperaturas fueron: 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 y 70 °C.

6.4.3 Proteasas específicas

6.4.3.1. Actividad tipo quimotripsina.

La actividad tipo quimotripsina fue determinada, según la técnica descrita por Vega-Villasante (1998), por la tasa de hidrólisis de un sustrato sintético, SAAPNA (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-4Na) en amortiguador de Tris-HCl 100mM, pH 7.8 en presencia de CaCl₂ 10 mM. La mezcla de reacción consistió de 465 µl de Tris 100 mM con CaCl₂ 10 mM (pH 7.8), 25 µl de SAAPNA 0.4 mM; al tiempo cero (t₀) se añadió 10 µl de E.C. La lectura del cambio de absorbancia a 410 nm se registró por un tiempo de 3 minutos. Como control positivo se utilizó la α-quimotripsina de páncreas de bovino (Tipo I-S, C 7762, SIGMA[®]) a una concentración de 1 mg ml⁻¹. Se determinó la hidrólisis espontánea del sustrato realizando la prueba con amortiguador de Tris-HCl en sustitución del E.C. Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado. La actividad se reportó como actividad específica.

6.4.3.2 Actividad tipo tripsina.

La actividad tipo tripsina fue determinada, según la técnica descrita por Vega-Villasante (1998), por la hidrólisis de un sustrato sintético, TAME (Tosil-L-Arginina Metil Ester) en amortiguador de Tris-HCl, 50 mM, pH 8.0 en presencia de CaCl₂ 20 mM. La mezcla de reacción consistió de 1000 µl de TAME 100 µM y al tiempo cero (t₀) se añadió 10 µl de E.C. La lectura del cambio de absorbancia a 247 nm se registró por un tiempo de 3 minutos. Como control positivo se utilizó tripsina de páncreas de bovino (Tipo I, T 8003, SIGMA[®]) a una concentración de 1 mg ml⁻¹. Se determinó la hidrólisis espontánea del sustrato realizando la prueba con amortiguador de Tris-HCl en sustitución del E.C. Todas

las determinaciones se efectuaron por triplicado. La actividad se reportó como actividad específica.

6.4.3.3 Actividad Carboxipeptidasa A.

La actividad carboxipeptidasa A fue determinada, según la técnica descrita por Vega-Villasante (1998), por la tasa de hidrólisis de un sustrato sintético, HP (Hippuryl-Phenyl Alanine) en amortiguador de Tris-HCl, 25 mM, pH 8.0 en presencia de NaCl 500 mM. La mezcla de reacción consistió de 980 μ l de amortiguador, 20 μ l de HP 1 mM y al tiempo cero (t_0) se añadió 10 μ l de E.C. (diluido tres veces en amortiguador de Tris-HCl). La lectura del cambio de absorbancia a 254 nm se registró por un tiempo de 3 minutos. Como control positivo se utilizó la carboxipeptidasa A de páncreas de bovino (Tipo I, C 0261, SIGMA[®]) a una concentración de 200 μ g de proteína ml^{-1} . Se determinó la hidrólisis espontánea del sustrato realizando la prueba con amortiguador de Tris-HCl en sustitución del E.C. Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado. La actividad se reportó como actividad específica.

6.4.3.4 Actividad Carboxipeptidasa B.

La actividad carboxipeptidasa B fue determinada, según la técnica descrita por Vega-Villasante (1998), por la tasa de hidrólisis de un sustrato sintético, HA (Hippuryl-Arginine) en amortiguador de Tris-HCl, 25 mM, pH 8.0 en presencia de NaCl 500 mM. La mezcla de reacción consistió de 1000 μ L de HA 10 mM y al tiempo cero (t_0) se añadió 10 μ l de E.C. La lectura del cambio de absorbancia a 254 nm se registró por un tiempo de 3 minutos. Como control positivo se utilizó la carboxipeptidasa B de páncreas de porcino (C 9584,

SIGMA[®]) a una concentración de 2 mg de proteína ml⁻¹. Se determinó la hidrólisis espontánea del sustrato realizando la prueba con el amortiguador de Tris-HCl en sustitución del E.C. Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado. La actividad se reportó como actividad específica.

6.4.3.5 Actividad Leucinaminopeptidasa.

La actividad leucinoaminopeptidasa fue determinada, según la técnica descrita por Vega-Villasante (1998), por la tasa de hidrólisis de un sustrato sintético, LPNA (Leucin *p*-Nitroanilida) en Tris-HCl, 100 mM, pH 8.0 en presencia de MgCl₂ 5 mM. La mezcla de reacción consistió de 900 µL de amortiguador de Tris-HCl, 100 µl de LPNA 100 mM (en metanol), y al tiempo cero (t₀) se añadió 10 µl de E.C. La lectura del cambio de absorbancia a 410 nm se registró por un tiempo de 3 minutos. Como control positivo se utilizó la Leucin aminopeptidasa de riñón de cerdo (Tipo VI, L 0632, SIGMA[®]) a una concentración de 11.25 µg ml⁻¹. Se determinó la hidrólisis espontánea del sustrato realizando la prueba con el amortiguador de Tris-HCl en sustitución del E.C. Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado. La actividad se reportó como actividad específica.

6.4.3.6 Efecto de inhibidores-activadores y SDS sobre actividad proteasa.

Para esta determinación se siguió el procedimiento descrito para el caso de las proteasas generales, donde se utilizaron diferentes inhibidores de proteasas en la mezcla de reacción, de tal manera que la concentración final de cada inhibidor en la mezcla de reacción fue de 5 mM. Los compuestos utilizados fueron: TLCK(Nα *p*-tosyl -L- lysine

chloromethyl ketone), PMSF(Phenylmethylsulfonyl fluoride), TPCK (N tosyl -L-phenylalanine chloromethyl ketone), ZPCK (N-CBZ L- phenylalanine chloromethyl ketone), EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) y SDS (Sodium dodecyl sulfate). La actividad se reportó como actividad específica.

Actividad enzimática digestiva y consumo de alimento durante el ciclo circadiano.

Experimento 5

6.5.1 Diseño Experimental.

El experimento fue realizado en el exterior, en un área cubierta con malla sombra para reducir la insolación. Se usaron seis tanques de 1.5 m de diámetro y 0.6 m de altura. La temperatura máxima fue de 28 °C y la mínima de 21 °C que correspondió a la variación diurna durante el muestreo. Se probaron dos tratamientos por triplicado: animales alimentados y sin alimentar. La concentración de oxígeno se mantuvo superior a 4 mg l⁻¹. El periodo de luz (06:00-18:00 hrs) fue el de la estación (12 hrs L-12 hrs O). En cada tanque se colocaron 150 individuos. Todos los animales fueron aclimatados previamente durante 48 horas y se encontraban en intermuda al iniciar el experimento. A cada unidad experimental se le puso una malla de nylon que sirvió como escondrijo para los organismos. Los juveniles usados para este experimento tenían un peso promedio de 4.46 g ± 0.21 y provenían de los estanques del CIBNOR.

El grupo de organismos utilizados para la evaluación de la actividad enzimática que recibieron alimento (CA), se alimentó una vez al día (15:00 horas) a razón de 3% de la biomasa total. El periodo de muestreo fue de 48 horas. Cada dos horas se tomaban al azar tres organismos de cada uno de los acuarios y se sacrificaban por congelación,

posteriormente la disección y extracción de la glándula digestiva se realizó en el laboratorio.

Al mismo tiempo se realizó otro experimento para evaluar el consumo de alimento. Para efectuar esto se usaron tres acuarios de 60 l de capacidad y en cada acuario se colocaron 20 organismos con un peso promedio de $4.46 \text{ g} \pm 0.21$. Los parámetros de oxígeno y luz fueron idénticos al experimento anterior. Para la evaluación del consumo de alimento, cada dos horas, durante 48 horas, se proporcionó alimento a los organismos, a razón del 3% de la biomasa total. El alimento no consumido era retirado y secado en la estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 12 horas. El peso se registró con una balanza analítica, con una precisión de 0.01 g.

Para el análisis enzimático se siguió la metodología descrita en los apartados 6.1.4.2.1, 6.1.4.2.2 y 6.1.4.2.3. La actividad se reportó como actividad total.

6.5.2 Análisis estadístico.

La actividad enzimática total y el consumo de alimento fueron analizados por análisis de varianza de una vía y en caso necesario se realizó una prueba de Tukey para determinar diferencias significativas entre los tratamientos y el consumo. El análisis se realizó con un nivel de significancia de 0.05 usando el paquete estadístico STATISTICA, Versión 6. Statsoft, Inc, Tulsa, USA.

7. RESULTADOS

Efecto del tipo de ingredientes en alimentos experimentales sobre la actividad enzimática digestiva. Experimento 1

7.1.1 Tasa de crecimiento relativo (TCR)

En la Tabla IV se muestra la composición proximal de los alimentos experimentales utilizados.

Tabla IV. Análisis proximal de los alimentos con diferentes ingredientes. (g/100 g de peso seco, excepto humedad)

Alimento	R	CAL	LANG	P60	P65	S	SY	T
Humedad	6.95	7.95	9.05	7.91	6.60	7.55	8.75	7.33
Proteína	38.9	44.9	38.7	41.7	43.1	34.0	40.4	35.8
Lípidos	7.5	7.2	7.0	7.4	8.3	7.1	7.2	6.4
Cenizas	9.5	9.2	13.9	11.0	10.0	8.2	9.0	8.3
Fibra cruda	1.2	1.0	2.8	1.0	1.0	1.1	1.3	1.3
E.L.N. ^a	42.9	37.7	37.6	38.7	37.6	49.6	42.1	48.2
Energía(Kcalg ⁻¹) ^b	4.5	4.5	4.1	4.5	4.6	4.5	4.3	4.5

R= Alimento de referencia; CAL= Harina de calamar; LANG= Harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*); P60= Harina de sardina con 60% de proteína; P65= Harina de sardina con 65% de proteína; S= Harina de sorgo; SY= Pasta de soya; T= Harina de trigo.

^a E.L.N. Extracto Libre de Nitrógeno.

^b Kilocalorías por gramo.

Los alimentos P60, S y T produjeron los valores más altos de la TCR para los juveniles, los valores mas bajos se obtuvieron en los animales alimentados con el alimento CAL (Fig. 2).

El análisis de regresión de Spearman no mostró relación entre la TCR y la cantidad de nutriente resultante de la inclusión de los diferentes ingredientes, se obtuvo un valor de

0.514 entre el contenido de carbohidratos en el alimento y la TCR, pero no fue significativo ($p=0.2$) (Fig. 3).

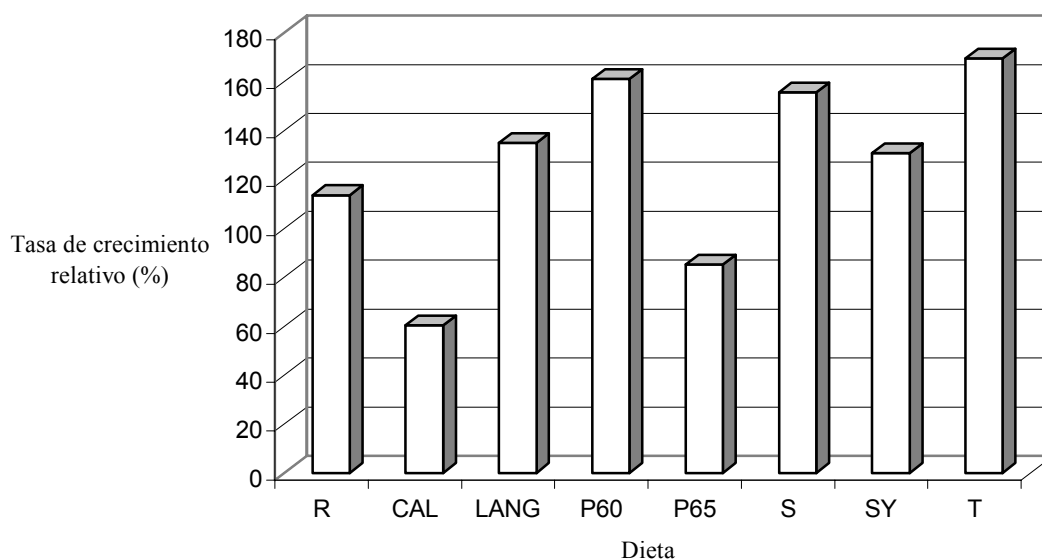


Figura 2. Tasa de crecimiento relativo de los juveniles a lo largo del experimento obtenido con los diferentes alimentos. R= Alimento de referencia; CAL= Harina de calamar; LANG= Harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*); P60= Harina de sardina con 60% de proteína; P65= Harina de sardina con 65% de proteína; S= Harina de sorgo; SY= Pasta de soya; T= Harina de trigo.

7.1.2 Actividad enzimática

El efecto de los alimentos experimentales sobre la actividad enzimática se muestra en la Tabla V. El valor inicial de la actividad amilasa fue de 8.949 U / mg de tejido. A los 15 días, la actividad disminuyó en todos los organismos experimentales, pero a los 30 días la actividad se incrementó en todos los animales analizados. Se observaron diferencias significativas en la actividad amilasa entre el primer y segundo periodo para un mismo tratamiento, excepto en los animales alimentados con el alimento LANG, que no presentó

diferencias significativas entre periodos. Al final del experimento los alimentos T, SY, P65, P60 y CAL produjeron la mayor actividad amilasa, pero no fueron significativamente diferentes entre ellos. ($p < 0.5$)

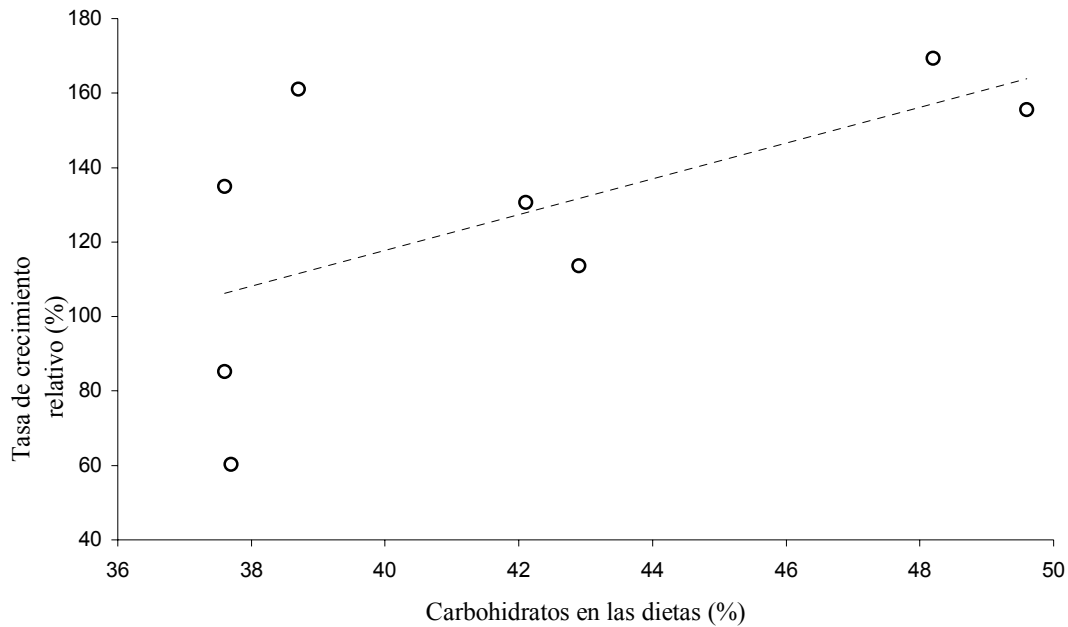


Figura 3. Tasa de crecimiento relativo de los juveniles con relación al contenido de carbohidratos en los alimentos.

Para la actividad lipasa, el valor inicial fue de 0.751 U / mg tejido. En el primer muestreo (15 días), los organismos alimentados con los alimentos LANG y S mostraron un incremento de la actividad lipasa (1.189 y 0.772 U / mg tejido, respectivamente), siendo el primer valor significativamente diferente respecto a los demás tratamientos. En el segundo periodo, la actividad lipasa se incrementó en todos los tratamientos, siendo los organismos alimentados con los alimentos CAL, P60 y T los que mostraron los valores mas altos y fueron significativamente diferentes en relación a los demás tratamientos (Tabla V).

El comportamiento de la actividad proteasa fue diferente con respecto a las actividades amilasa y lipasa. En el primer periodo de muestreo (15 días) los alimentos CAL y P60 produjeron valores altos de actividad respecto a valor inicial, pero no fueron significativamente diferentes entre ellos.

Tabla V. Actividad total (U/ mg de tejido húmedo de hepatopáncreas) para la amilasa, lipasa y proteasa en los juveniles tratados con los diferentes alimentos.

Tratamiento	Actividad amilasa		Actividad lipasa		Actividad proteasa	
Valor inicial (t ₀)	8.949		0.751		0.015	
	15 días	30 días	15 días	30 días	15 días	30 días
R	1.845 ^f	6.115 ^c	0.616 ^{cd}	1.291 ^c	0.009 ^e	0.022 ^a
CAL	5.388 ^b	7.197 ^{bc}	0.499 ^d	1.837 ^{ab}	0.018 ^{ab}	0.007 ^{bc}
LANG	7.012 ^a	6.080 ^c	1.189 ^a	1.630 ^{bc}	0.013 ^{cd}	0.004 ^c
P60	3.825 ^{cd}	6.918 ^c	0.700 ^b	2.050 ^a	0.020 ^a	0.022 ^a
P65	3.166 ^{de}	6.814 ^c	0.284 ^e	1.315 ^c	0.015 ^{bc}	0.008 ^b
S	4.227 ^c	6.400 ^c	0.772 ^b	0.934 ^d	0.008 ^e	0.007 ^{bc}
SY	2.833 ^e	8.152 ^{ab}	0.713 ^{bc}	1.668 ^b	0.010 ^{de}	0.024 ^a
T	3.802 ^{cd}	8.426 ^a	0.253 ^e	1.902 ^{ab}	0.016 ^b	0.006 ^{bc}

R= Alimento de referencia; CAL= Harina de calamar; LANG= Harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*); P60= Harina de sardina con 60% de proteína; P65= Harina de sardina con 65% de proteína; S= Harina de sorgo; SY= Pasta de soya; T= Harina de trigo. Diferentes letras dentro de las columnas marcan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Para el segundo periodo (30 días) la actividad proteasa disminuyó en casi todos los organismos analizados, excepto en los tratamientos con los alimentos R y SY. Siendo estos valores significativamente diferentes respecto al periodo anterior. Durante este último periodo los alimentos R, P60 y SY presentaron los máximos valores; no fueron significativamente diferentes entre ellos, pero sí respecto a los demás tratamientos (Tabla V).

A los 15 días, la relación amilasa/proteasa fue mayor en los animales alimentados con LANG y S (539 y 528 respectivamente). A los 30 días los alimentos CAL, LANG, S y T (1028, 1520, 914 y 1404 respectivamente) produjeron los valores más altos de este cociente.

Efecto del nivel de proteína en alimentos experimentales sobre la actividad enzimática digestiva. Experimento 2

7.2.1 Tasa de crecimiento relativo (TCR)

En la Tabla VI se muestra la composición proximal de los alimentos experimentales utilizados.

Tabla VI. Análisis proximal de los alimentos (g/100 g de materia seca)

Alimento	20%	26% P.	32%	38%	44%	50%	56%
	P.C.	P.C.	P.C.	P.C.	P.C.	P.C.	P.C.
Humedad	7.31	11.04	4.43	4.31	7.21	6.34	2.95
Proteína	20.13	25.47	30.93	37.06	43.26	49.16	54.85
Extracto Etéreo	7.9	7.94	7.67	8.75	8.85	9.45	10.85
Cenizas	7.85	8.73	9.88	10.85	11.94	13.06	14.19
Fibra Cruda	1.09	0.34	0.57	0.99	1.39	0.43	1.15
E.L.N.	63.4	57.52	50.95	42.35	39.56	27.9	18.96
E (Cal/g)	4471.5	4417.3	4536.9	4556.9	4812.3	5002.2	5125.1

E.L.N.= Extracto Libre de Nitrógeno. E.= Energía; PC= Proteína cruda

Al final del experimento (cuarenta y cinco días), el alimento A32 (32% de proteína) produjo la mayor TCR. (Fig. 4)

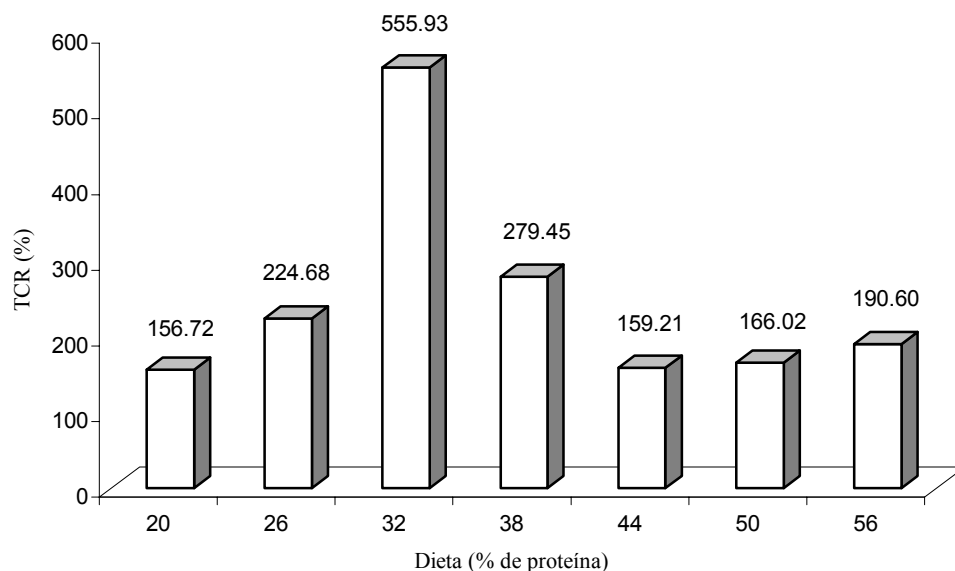


Figura 4. Tasa de crecimiento relativo obtenido en los juveniles alimentados con los diferentes alimentos. Los números sobre las barras indican el aumento porcentual de cada grupo al final del experimento.

7.2.2 Actividad enzimática digestiva en juveniles de langosta de agua dulce con alimentos de diferente nivel proteico.

7.2.2.1 Actividad amilasa.

La actividad específica de amilasa del hepatopáncreas de los juveniles sometidos a los diferentes alimentos puede verse en la Figura 5. Al inicio del experimento el valor (t_0) de la actividad específica fue de 189.5 U/mg proteína. La actividad amilasa se redujo en todos los organismos a los quince días de iniciado el experimento respecto al valor inicial. Los organismos alimentados con los alimentos A20, A50 y A56 presentaron los valores más

bajos de actividad específica, (66.3, 64.5 y 64.6 U/mg de proteína, respectivamente) no habiendo diferencias significativas entre ellos.

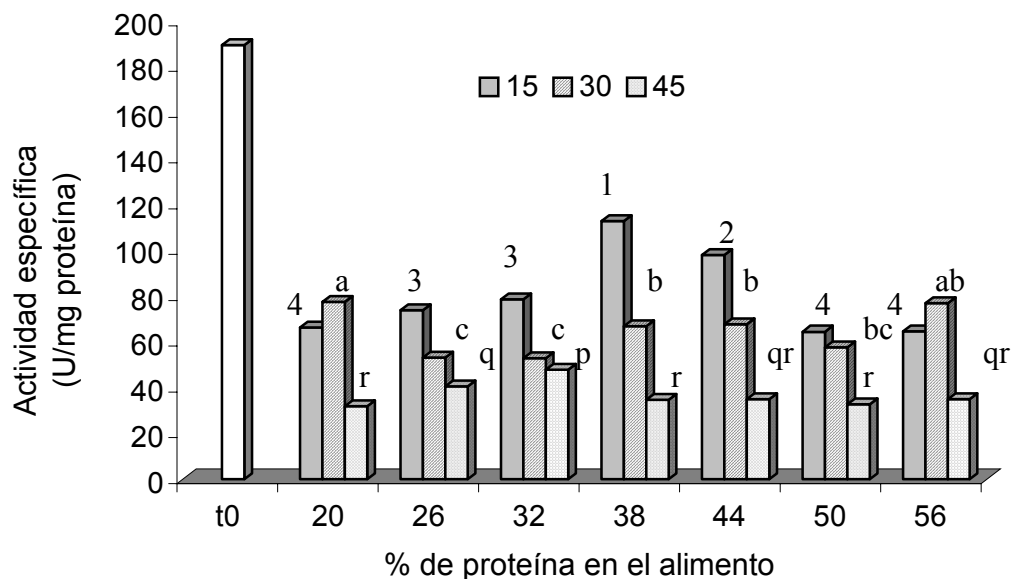


Figura 5. Actividad amilasa obtenida en los juveniles alimentados con los diferentes alimentos a lo largo del experimento. Las letras y números sobre las barras señalan diferencias estadísticas en la actividad enzimática para el mismo periodo de muestreo, ($p < 0.05$). t_0 indica el valor inicial.

Para este mismo periodo el valor más alto (112.6 U/mg proteína) fue el obtenido en los organismos alimentados con el alimento A38, que resultó ser diferente estadísticamente de los valores obtenidos con los alimentos A26 (73.8 U/mg proteína) y A32 (78.6 U/mg proteína). A los 30 días del experimento, los tratamientos con los alimentos A20 y A56 produjeron un aumento de la actividad enzimática respecto al periodo anterior, pero no alcanzó el valor inicial. Los valores obtenidos con los alimento A44 y A50 fueron estadísticamente diferentes de los obtenidos en los alimentos A26 y A32 que produjeron los valores más bajos para este periodo.

A los 45 días se mantuvo la tendencia de la reducción de la actividad enzimática, pero las diferencias entre los valores de las actividades fueron menos amplias; el valor más bajo fue el obtenido en los organismos alimentados con los alimentos A20 (31.9 U/mg proteína) y A50 (32.8 U/mg proteína), y el valor más alto (48 U/mg proteína) resultó en los animales alimentados con el alimento A32, este valor fue significativamente diferente de los valores obtenidos con los demás alimentos.

7.2.2.2 Actividad lipasa.

La actividad específica de lipasa al inicio del experimento (t_0) fue de 3.7 U/mg proteína. A los quince días el valor de la actividad específica aumentó en todos los tratamientos, siendo el valor más alto (16.1 U/mg proteína) el obtenido en los organismos alimentados con el alimento A26, y resultó ser estadísticamente diferente a todos los demás valores. El valor más bajo (7.6 U/mg proteína) se obtuvo en los organismos alimentados con el alimento A56, que mostró no ser diferente estadísticamente de los alimentos A20, A32 y A38 (Figura 6).

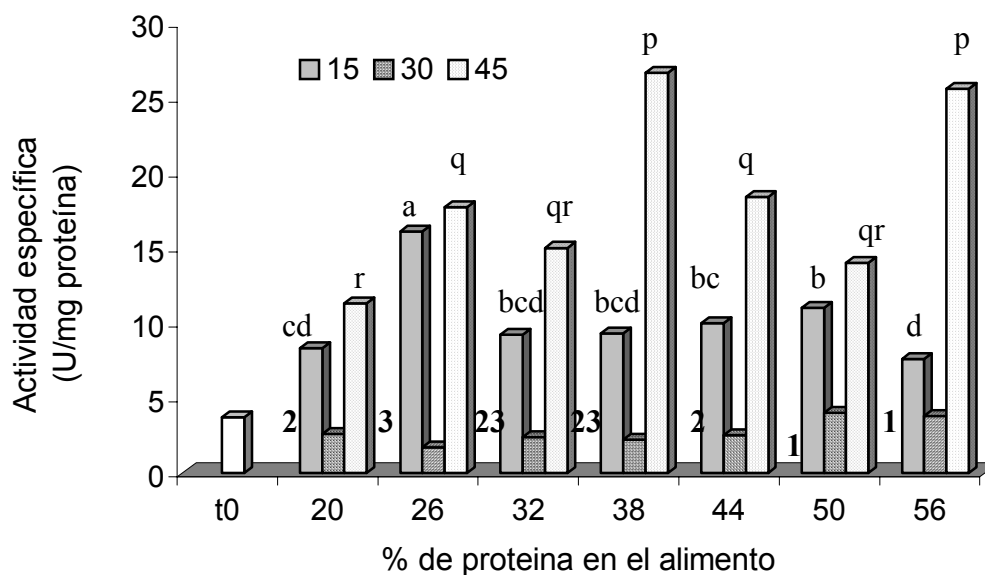


Figura 6. Actividad lipasa obtenida en los juveniles alimentados con los diferentes alimentos a lo largo del experimento. Las letras y números sobre las barras señalan diferencias estadísticas en la actividad enzimática para el mismo periodo de muestreo ($p < 0.05$). t_0 indica el valor inicial.

A los 45 días, la actividad aumentó en todos los tratamientos, inclusive fue mayor que al inicio del experimento. El valor más alto se obtuvo en el hepatopáncreas de organismos alimentados con el alimento A38 (26.7 U/mg proteína) que resultó ser estadísticamente similar al valor obtenido con el alimento A56 (25.6 U/mg proteína). El valor más bajo se obtuvo con los animales alimentados con el alimento A20 (11.3 U/mg proteína), valor que no mostró diferencias significativas con los alimentos A32 y A50.

7.2.2.3 Actividad proteasa.

En la figura 7 se muestra que el valor promedio inicial de la actividad proteasa fue de 0.67 U/mg proteína, este valor se redujo a los quince días de iniciado el experimento. Para este periodo el alimento A26 produjo un valor mas alto de actividad enzimática (0.54 U/mg

proteína) y presentó diferencias significativas con respecto a los valores obtenidos con los demás alimentos. El valor mínimo (0.06 U/mg proteína) se obtuvo en los organismos alimentados con el alimento A56.

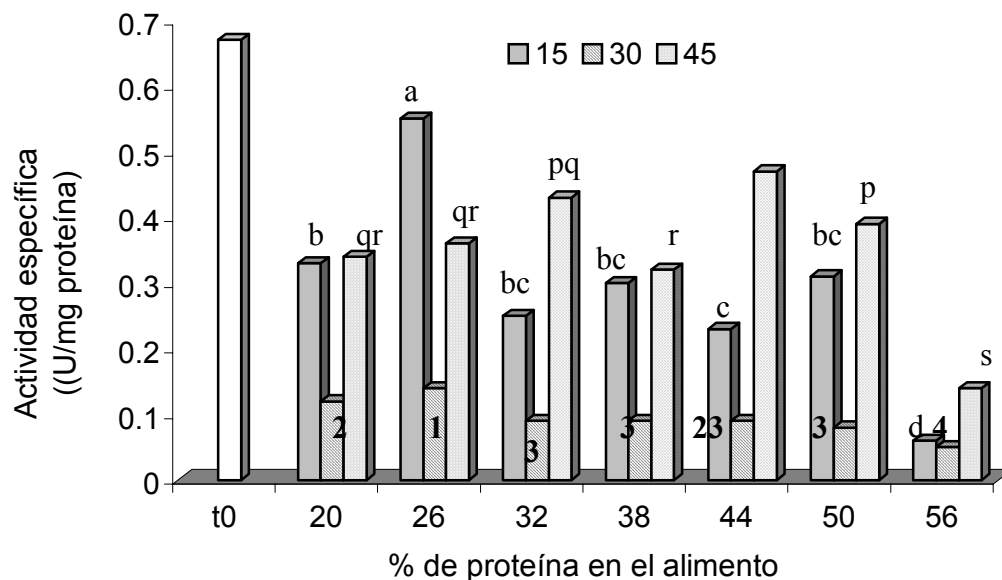


Figura 7. Actividad proteasa obtenida en los juveniles alimentados con los diferentes alimentos a lo largo del experimento. Las letras y números sobre las barras indican diferencias estadísticas en la actividad enzimática para el mismo periodo, ($p < 0.05$). t_0 indica el valor inicial.

A los 30 días del inicio, se redujeron los valores de actividad enzimática lipasa del hepatopáncreas de todos los organismos analizados. El valor máximo (0.14 U/mg proteína) se encontró en los animales alimentados con el alimento A26, y mostró diferencias significativas con los valores obtenidos con los otros alimentos. Los valores obtenidos en los animales alimentados con los alimentos A32, A38, A44 y A50 no mostraron diferencias significativas entre sí. El valor más bajo fue para los organismos alimentados con el alimento A56 (0.05 U/mg proteína).

Para el periodo de los 45 días, los valores de actividad enzimática mostraron un importante aumento respecto al muestreo anterior (30 días); el valor más alto se obtuvo en organismos alimentados con el alimento A44 (0.47 U/mg proteína); sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre los valores obtenidos con los alimentos A32 y A50. El valor más bajo se obtuvo en los animales alimentados con el alimento A56 (0.14 U/mg proteína) y este valor fue estadísticamente diferente del resto de los valores obtenidos. (Fig. 7).

Caracterización de la actividad esterasa-lipasa de la glándula digestiva de los juveniles. Experimento 3.

7.3.1 Actividad lipolítica del extracto crudo de juveniles.

La mayor actividad lipasa se observó entre los 35 y 40 °C (Fig. 8). La termoestabilidad de la lipasa decreció conforme aumentó la temperatura de exposición (Fig. 9). A una concentración de NaCl de 100 mM, se obtuvo la mayor actividad, no siendo estadísticamente diferente de los valores obtenidos a una concentración de 5 y 10 mM; arriba de 500 mM, o debajo de 5 mM la actividad lipasa fue menor (Fig. 10). A pH de 8.5 se obtuvo el mayor valor de actividad lipasa (Fig. 11), la actividad lipasa pareció ser más afectada por la condición de acidez que por la de alcalinidad.

La actividad lipasa no fue afectada significativamente por el ión magnesio; el ión calcio redujo la actividad aproximadamente un 20% y el EDTA redujo la actividad un 30% (Fig. 12). Los iones de los metales pesados inhibieron completamente la actividad lipolítica.

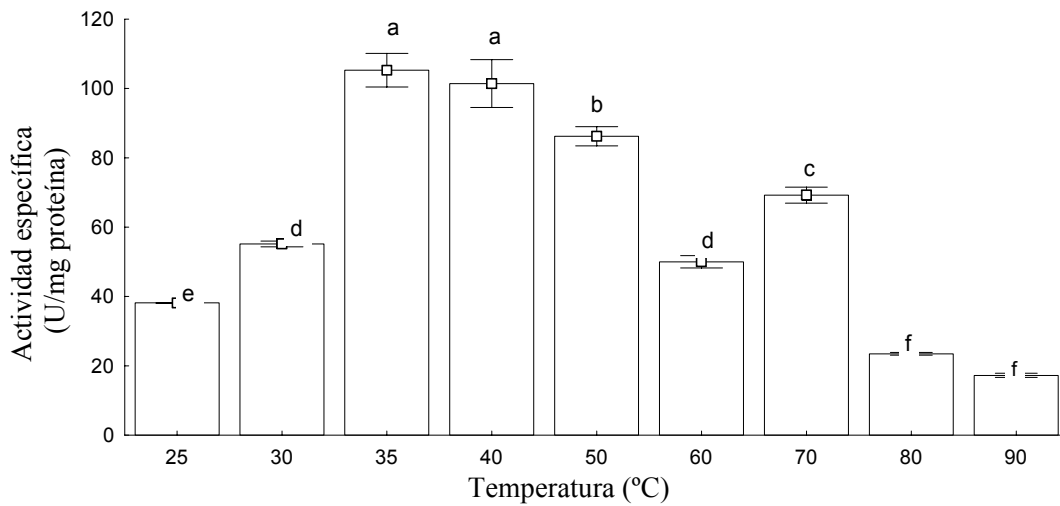


Figura 8. Efecto de la temperatura sobre la actividad lipasa, después de una incubación de 30 minutos. Se representa el promedio y la desviación estándar. Letras iguales señalan que no hay diferencias estadísticas. ($p < 0.05$).

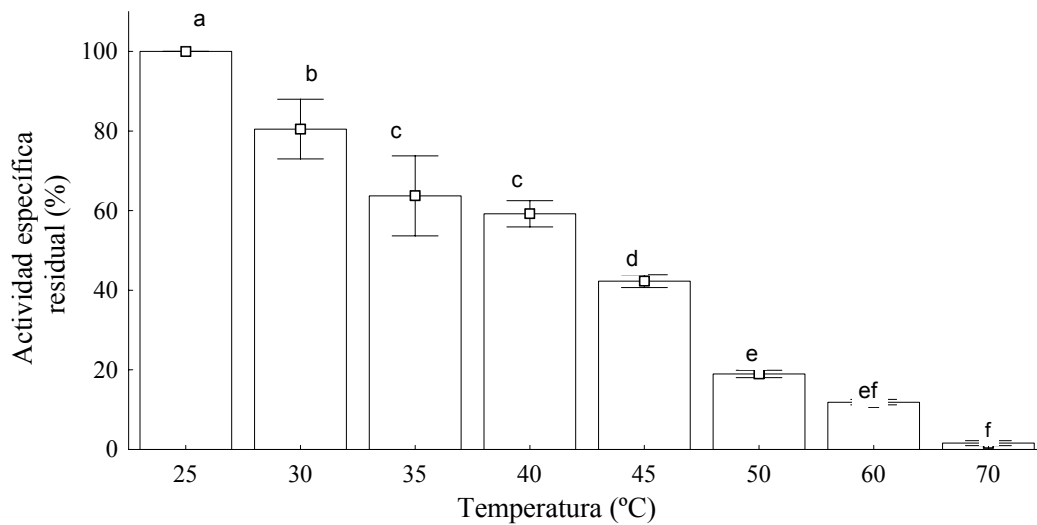


Figura 9. Termoestabilidad de la actividad lipasa. La actividad de referencia se efectuó a 25°C. Se representa el promedio y la desviación estándar. Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticas, ($p < 0.05$).

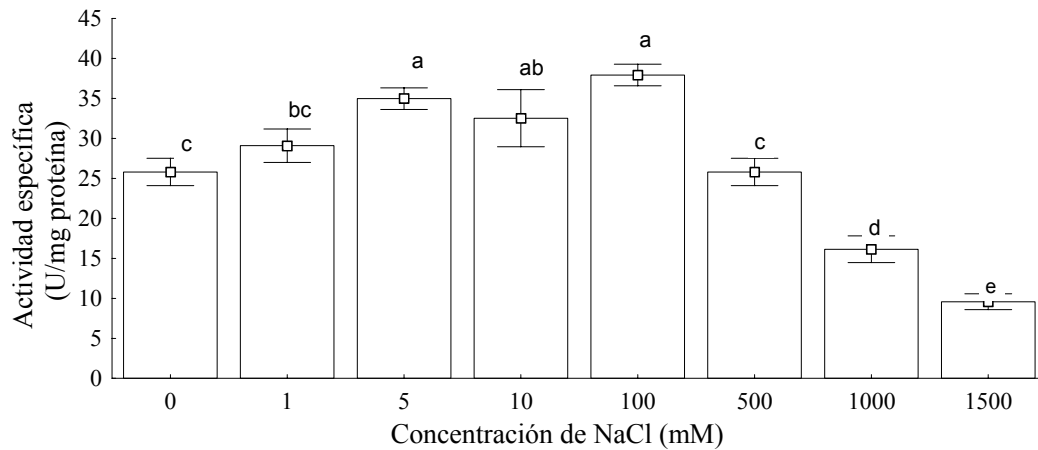


Figura 10. Efecto de la concentración de NaCl sobre la actividad lipasa. La concentración a 0 mM representa el valor de referencia sin NaCl. Se representa el promedio y la desviación estándar. Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

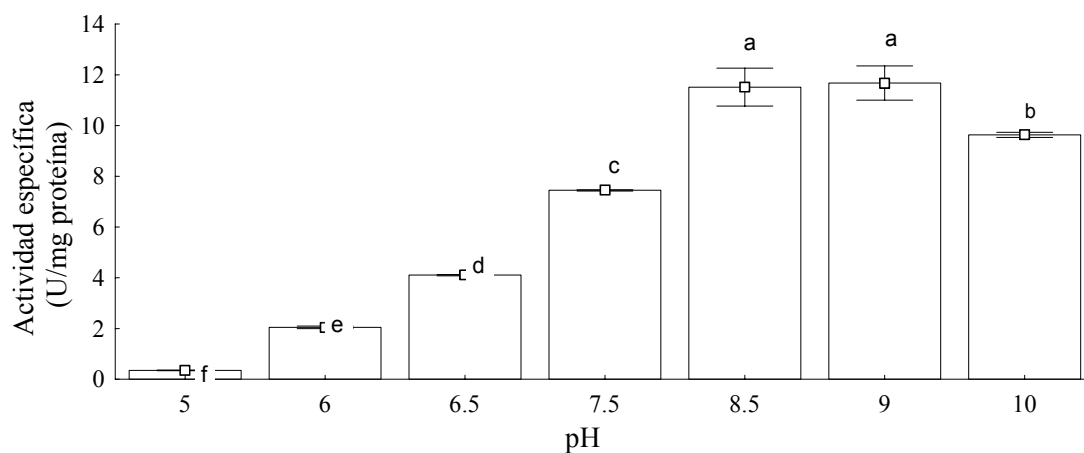


Figura 11. Efecto del pH sobre la actividad lipasa. Se representa el promedio y la desviación estándar. Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

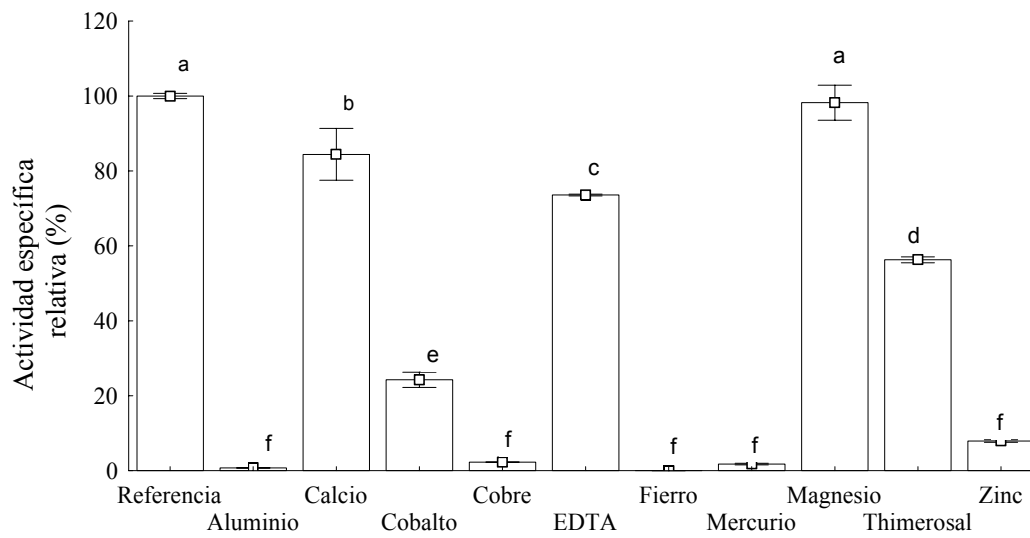


Figura 12. Efecto de iones metálicos y EDTA sobre la actividad lipasa. El valor de referencia (100%) no contiene sales metálicas. Se representa el promedio y la desviación estándar. Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

7.3.2 Actividad esterasa con compuestos derivados del α y β -naftil y *p*-nitrofenil-ácido graso.

De los compuestos derivados del α -naftil, la mayor actividad esterasa se obtuvo con el propionato y el valor mas bajo con el laurato, y con el α -naftil palmitato (Figs. 13 a y b) no se obtuvo actividad.

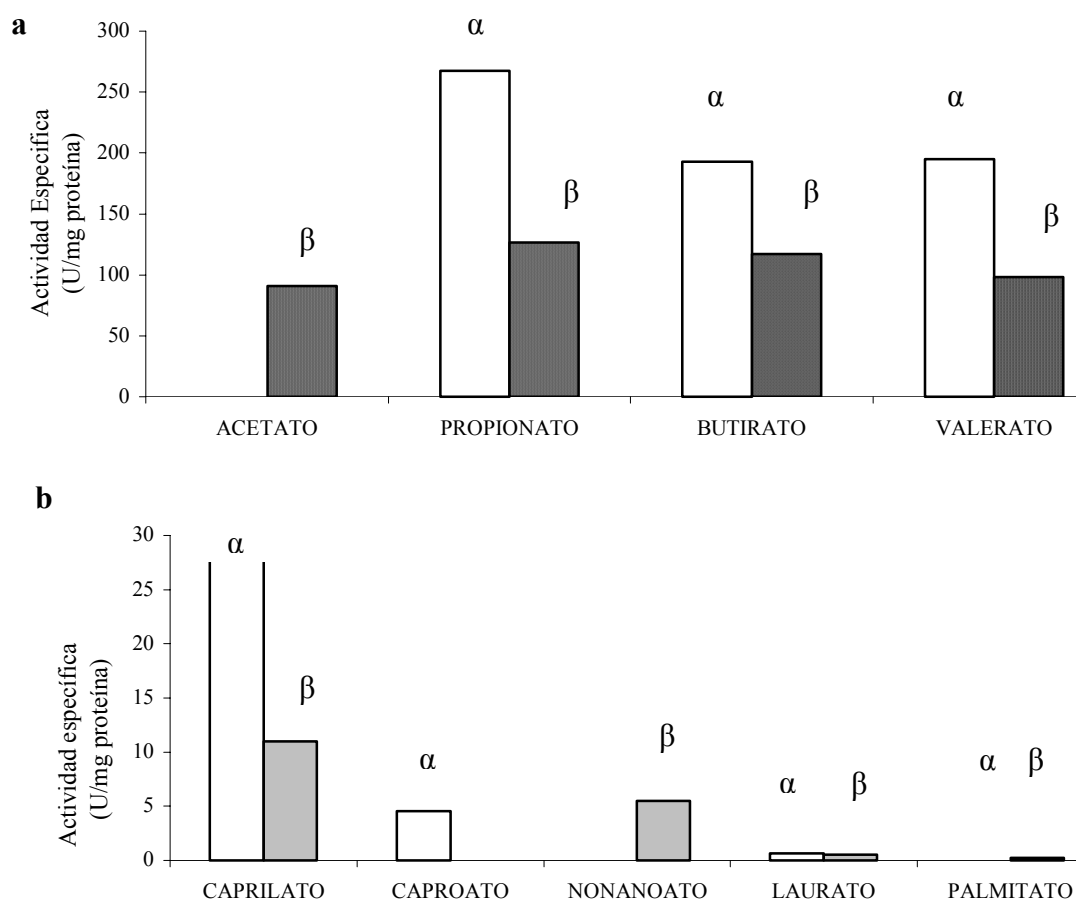


Figura 13. Actividad enzimática del E.C. del hepatopáncreas usando compuestos derivados del α - y β -naftil. a) Ácidos grasos de cadena corta. Los símbolos α y β representan el tipo de compuesto (El α -naftil acetato y β -naftil caproato no fueron probados); b) Ácidos grasos de cadena larga. La actividad con α - y β -naftil palmitato fue muy baja. En el eje equis se representan los diferentes sustratos utilizados.

De los compuestos derivados del β -naftil, la mayor actividad esterasa se obtuvo con el propionato y el valor mas bajo con el palmitato.

De los compuestos derivados del *p*-nitrofenil, la mayor actividad se obtuvo con el butirato y el valor mas bajo de actividad con el palmitato (Figs. 14 a y b).

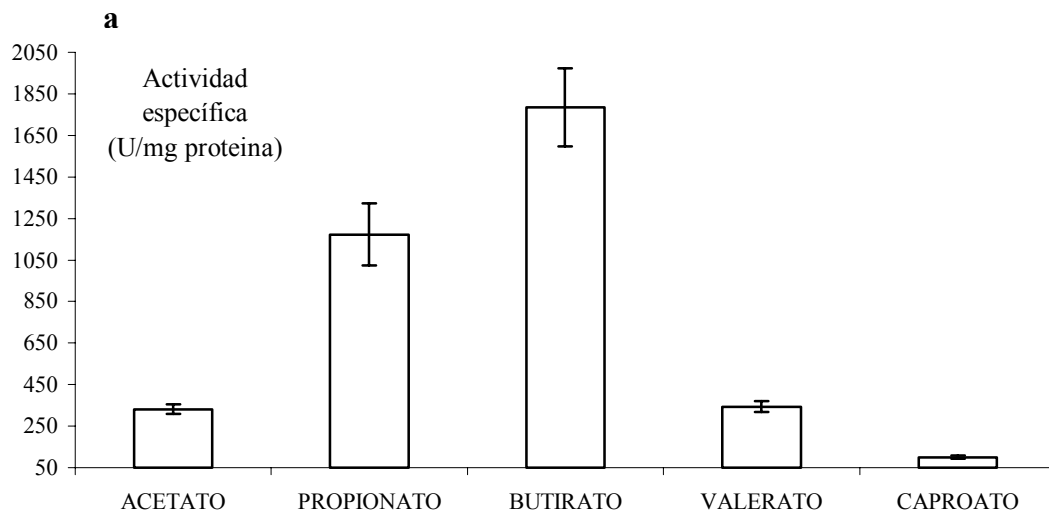


Figura 14. a) Actividad enzimática del E.C del hepatopáncreas usando compuestos derivados del *p*-nitrofenil de cadena corta. Valores con desviación estándar. En el eje equis se representan los diferentes sustratos.

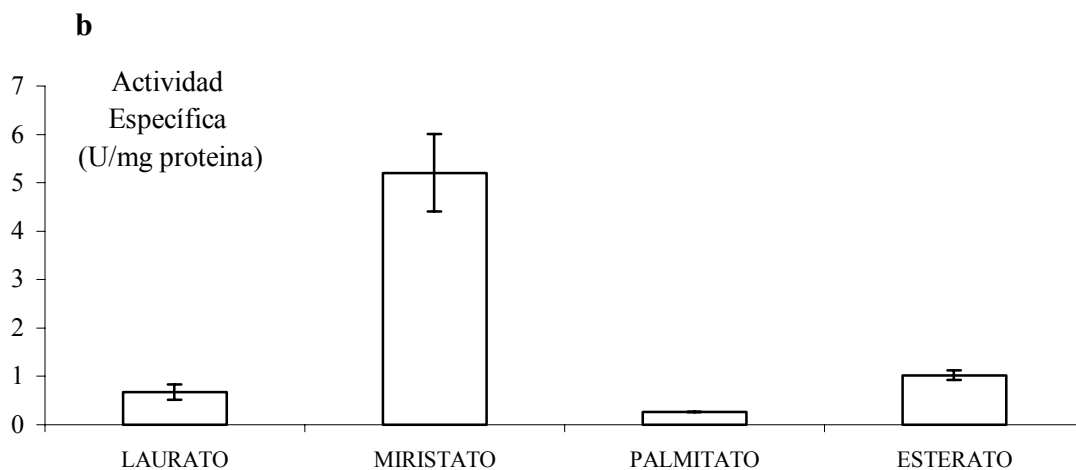


Figura 14. b) Actividad enzimática de E.C. del hepatopáncreas usando compuestos derivados del *p*-nitrofenil de cadena corta. Valores con desviación estándar. En el eje equis se representan los diferentes sustratos.

7.3.3. Análisis electroforético.

El Extracto crudo del hepatopáncreas mostró dos bandas de actividad esterasa cuando se usaron β -naftil acetato y butirato como sustratos. Los patrones de las isoenzimas fueron similares con ambos sustratos (Fig. 15). Para el caso del β -naftil caprilato se observaron tres bandas de actividad. Al menos una lipasa fue detectada en el gel usando tributirina como sustrato.

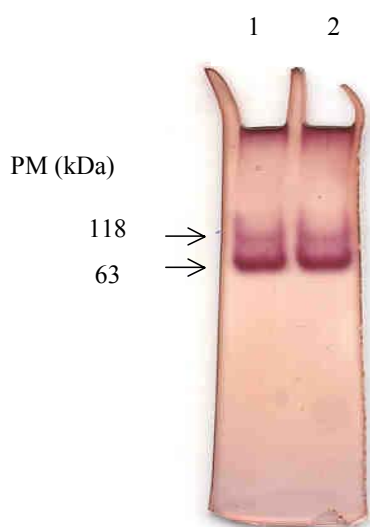


Figura 15. Zimograma de la actividad esterasa con β -naftil acetato (pozo 1) y β -naftil butirato (pozo 2) en geles de poliacrilamida en gradiente 4-30%. Las flechas señalan las bandas de actividad y el peso molecular. PM= Peso molecular; kDa= Kilodaltons

7.3.4 Actividad cinética sobre sustratos de *p*-nitrofeniles-ácido graso.

La mayor actividad se obtuvo con el *p*-nitrofenil butirato (1.12 ± 0.04 U/mg proteína), seguido por el *p*-nitrofenil acetato (0.28 ± 0.07 U/mg proteína) y el *p*-nitrofenil esterato (0.21 ± 0.02 U/mg proteína).

Caracterización parcial de amilasas y proteasas de la glándula digestiva.

Experimento 4.

7.4.1 Actividad amilasa del extracto crudo del hepatopáncreas

7.4.1.1 Temperatura.

El efecto de la temperatura sobre la actividad amilolítica fue determinado entre un rango de temperatura de 25 a 70 °C. (Figura 16). La actividad amilasa se incrementó con el aumento de la temperatura hasta alcanzar valores máximos entre 50 y 60 °C y luego disminuyó a los 70 °C. La menor actividad se registró a los 25 °C.

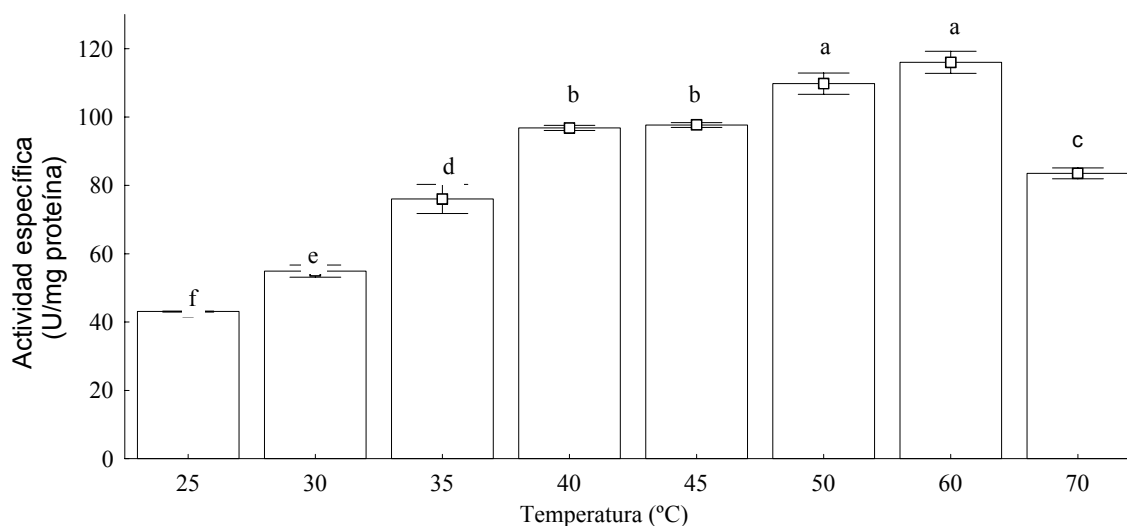


Figura 16. Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad amilasa del hepatopáncreas. Se representa el promedio y la desviación estándar. Las letras distintas sobre las columnas indican que hay diferencias estadísticas entre las actividades ($p < 0.05$)

El efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica fue determinado entre un rango de temperatura de 25 a 70 °C (Fig. 17). La mayor actividad se encontró a las temperaturas de 45 y 50 °C. Se observa una disminución a los 60 y 70 °C. La menor actividad se registró a los 25 °C.

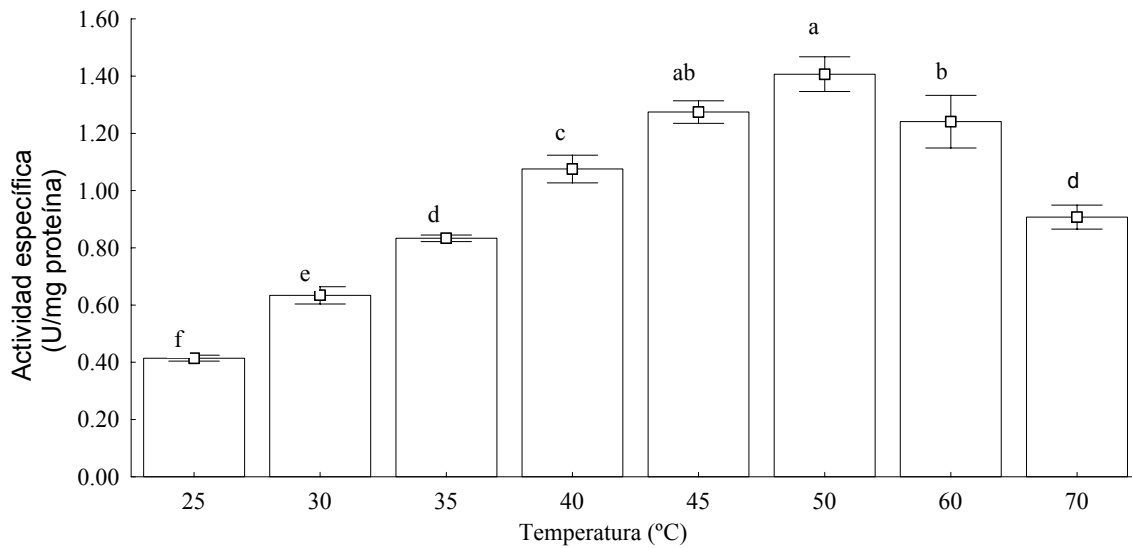


Figura 17. Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad proteasa del hepatopáncreas. Se representa el promedio y la desviación estándar. Las letras distintas sobre las columnas indican que hay diferencias estadísticas entre las actividades ($p < 0.05$)

7.4.1.2. Salinidad.

El efecto de la salinidad sobre la actividad amilolítica fue determinado entre un rango de concentración de NaCl desde 0 hasta 1500 mM (Fig. 18). La mayor actividad se encontró a una concentración de cloruro de sodio de 100 mM, no siendo diferente significativamente de los valores obtenidos a las concentraciones de 5 y 10 mM. Después de la concentración de 500 mM y debajo de 5 mM la actividad amilolítica fue menor.

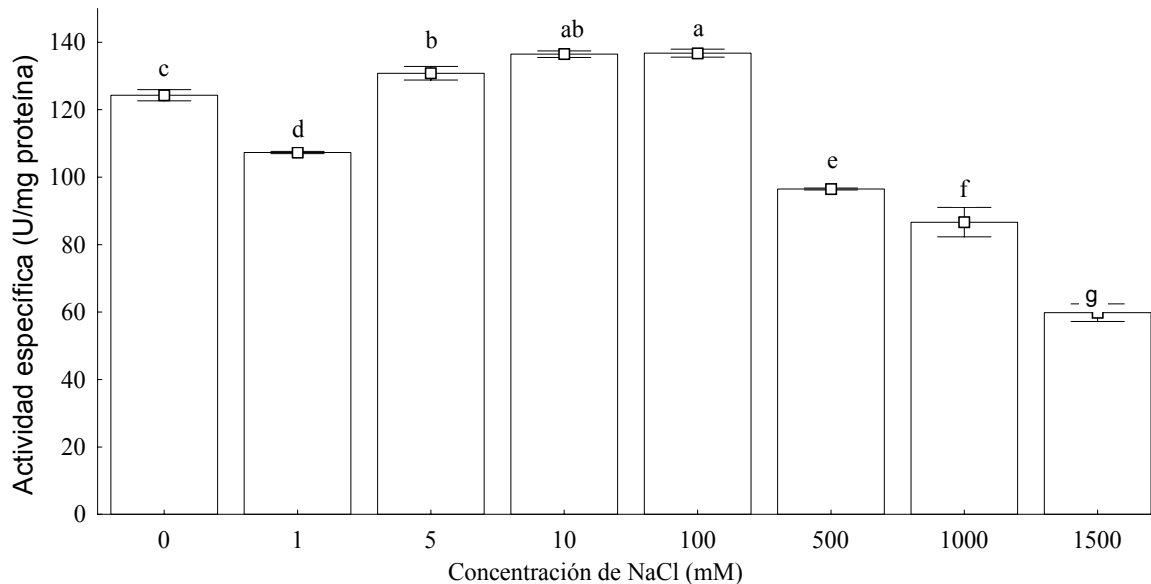


Figura 18. Efecto de la concentración de NaCl sobre la actividad amilasa del hepatopáncreas. Se representa el promedio y la desviación estándar ($p < 0.05$). La concentración 0 mM representa la actividad de referencia.

El efecto de la salinidad sobre la actividad proteasa fue determinado dentro un rango de concentración de NaCl de 0 a 1500 mM (Figura 19). La mayor actividad se encontró a una concentración de cloruro de sodio de 100 a 1000 mM, no siendo diferente significativamente de los valores obtenidos a las concentraciones de 0, 500 y 1000 mM. La actividad proteasa disminuyó a una concentración de 1500 mM.

7.4.1.3 pH

El ensayo del efecto del pH sobre la actividad amilasa se efectuó dentro de un rango de 5 a 10 (Figura 20). La mayor actividad se registró a pH 6, los valores de la actividad amilasa obtenida a pH de 5 y 6.5 no mostraron diferencias significativas entre sí. Conforme el pH se hacía más alcalino, la actividad amilasa se redujo.

Para el caso de las proteasas la determinación se efectuó dentro un rango de 5 a 10 (Figura 21). La mayor actividad se registró a pH 5. La actividad proteasa obtenida a pH de 7.5 y 8.5 fueron las menores, pero a pH de 9 y 10 la actividad proteasa volvió a aumentar.

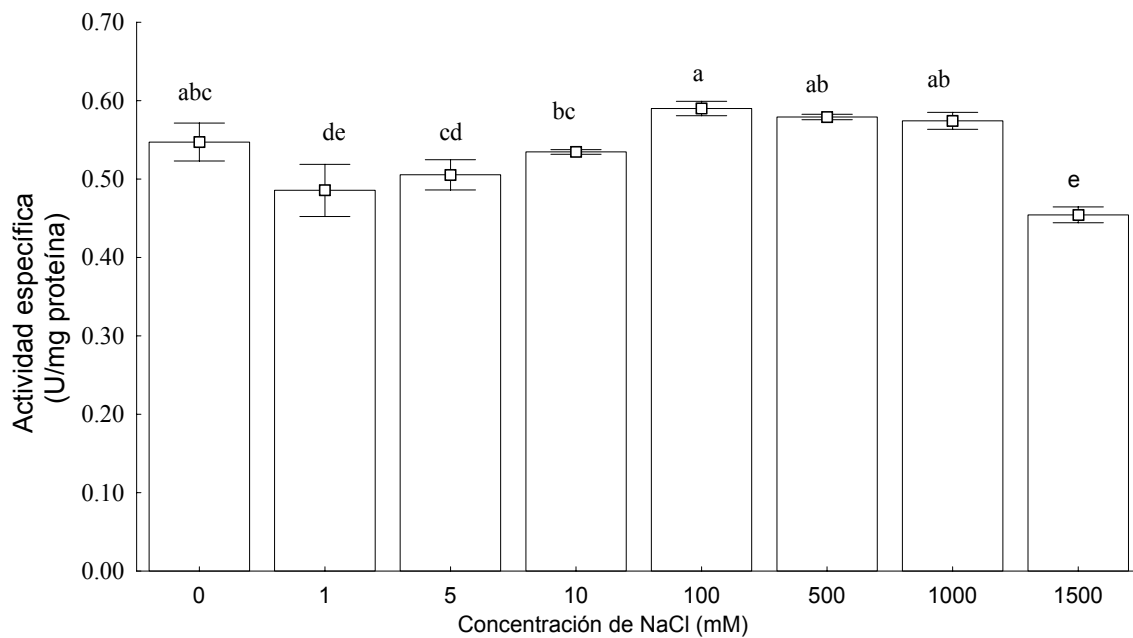


Figura 19. Efecto de la concentración de NaCl sobre la actividad proteasa del hepatopáncreas. Se representa el promedio y el error estándar ($p < 0.05$). La concentración 0 mM representa la actividad de referencia.

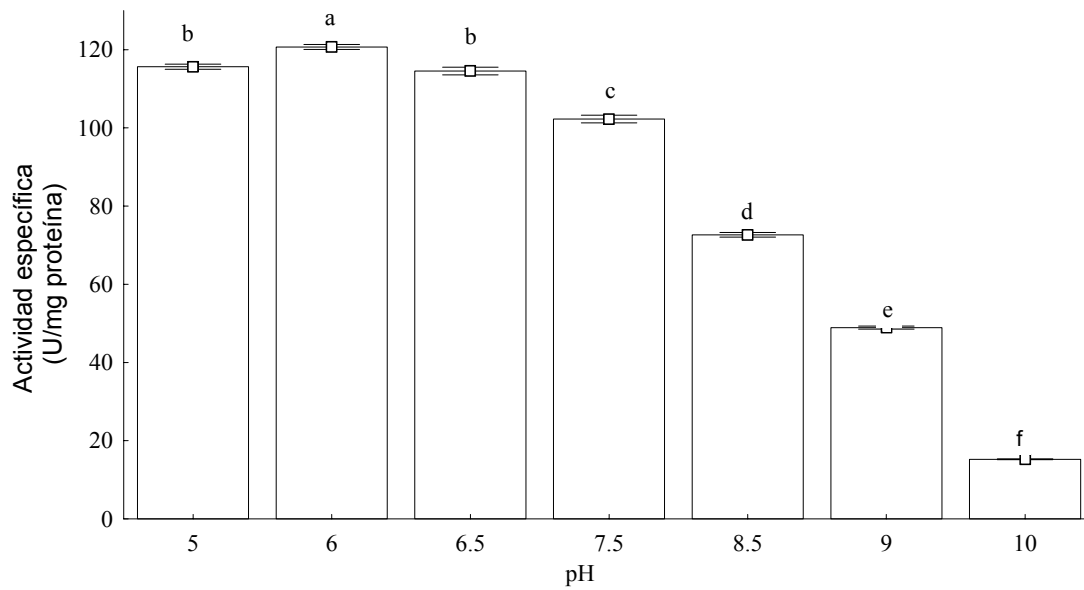


Figura 20. Efecto del pH sobre la actividad amilasa del hepatopáncreas. Se representa el promedio y el error estándar ($p < 0.05$). Las letras distintas sobre las columnas indican que hay diferencias estadísticas entre las actividades.

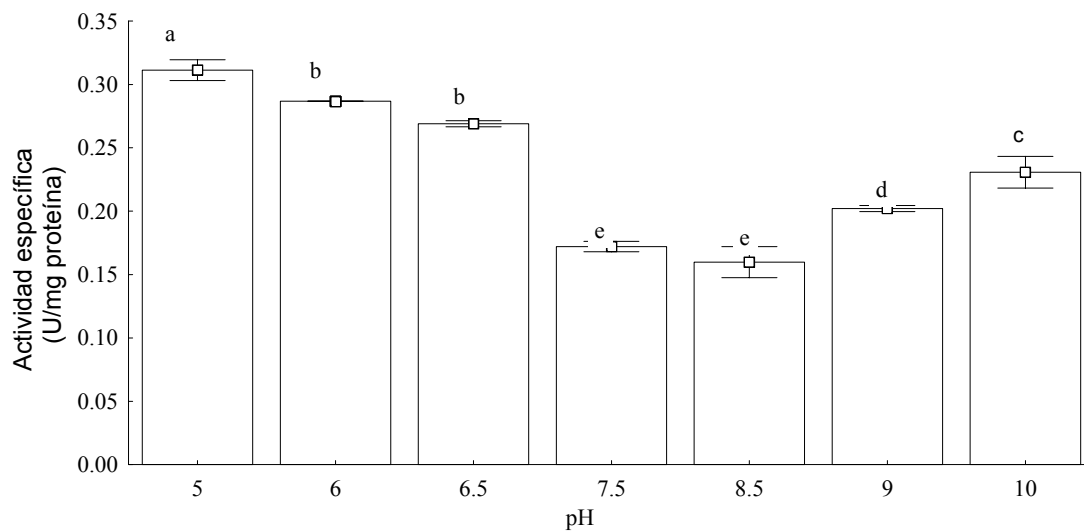


Figura 21. Efecto del pH sobre la actividad proteasa. Se representa el promedio y el error estándar ($p < 0.05$). Las letras distintas sobre las columnas indican que hay diferencias estadísticas entre las actividades.

7.4.1.4. Iones metálicos y EDTA.

La actividad amilasa no se vio afectada significativamente por los iones calcio, el EDTA, ni el thimerosal, ya que los valores no fueron significativamente diferentes respecto al valor de referencia (Fig. 22). El ión aluminio redujo la actividad hasta el 38%, mientras el resto de los iones, redujeron más del 90% de la actividad. La actividad proteasa no se vio afectada negativamente por los iones calcio, el EDTA, ni el magnesio, sino por el contrario, aumentaron la actividad proteasa respecto al valor de referencia (Fig. 23). El resto de los iones inhibieron más del 50% la actividad proteolítica. El ión hierro inhibió totalmente la actividad.

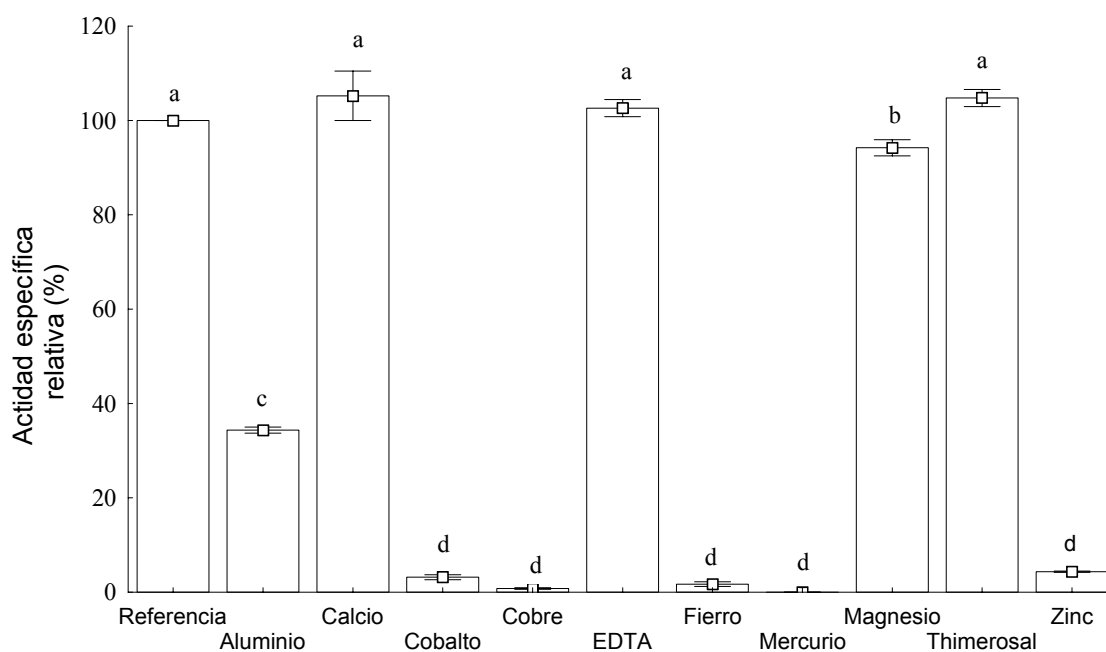


Figura 22. Efecto de algunos iones metálicos sobre la actividad amilasa del hepatopáncreas. Se representa el promedio y el error estándar ($p < 0.05$). Las letras distintas sobre las columnas indican que hay diferencias estadísticas entre las actividades.

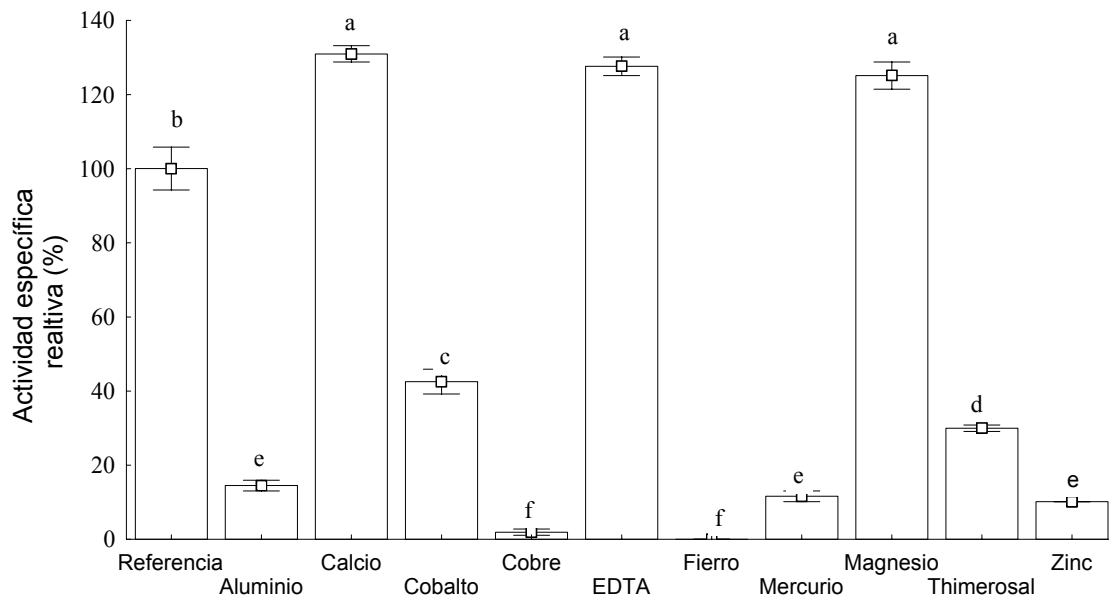


Figura 23. Efecto de algunos iones metálicos y EDTA sobre la actividad proteasa del hepatopáncreas. Se representa el promedio y el error estándar ($p < 0.05$). Las letras distintas sobre las columnas indican que hay diferencias estadísticas entre las actividades.

7.4.1.5 Termoestabilidad de la actividad amilasa y proteasa.

La actividad amilasa mostró una disminución de los valores conforme aumentaba la temperatura de exposición (Fig. 24). La actividad empieza a reducirse a los 40 °C. Como se ve en la Figura 25. La actividad proteasa empezó a ser afectada a los 45 °C y disminuyó drásticamente a partir de 50 °C.

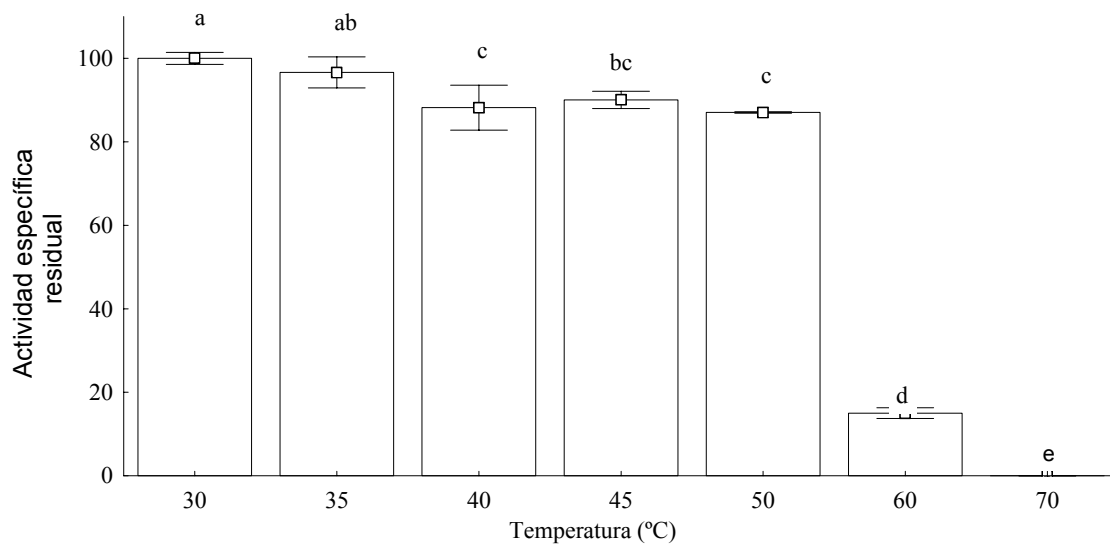


Figura 24. Termoestabilidad de la actividad amilasa del hepatopáncreas. Se representa el promedio y el error estándar ($p < 0.05$). Las letras distintas sobre las columnas indican que hay diferencias estadísticas entre las actividades.

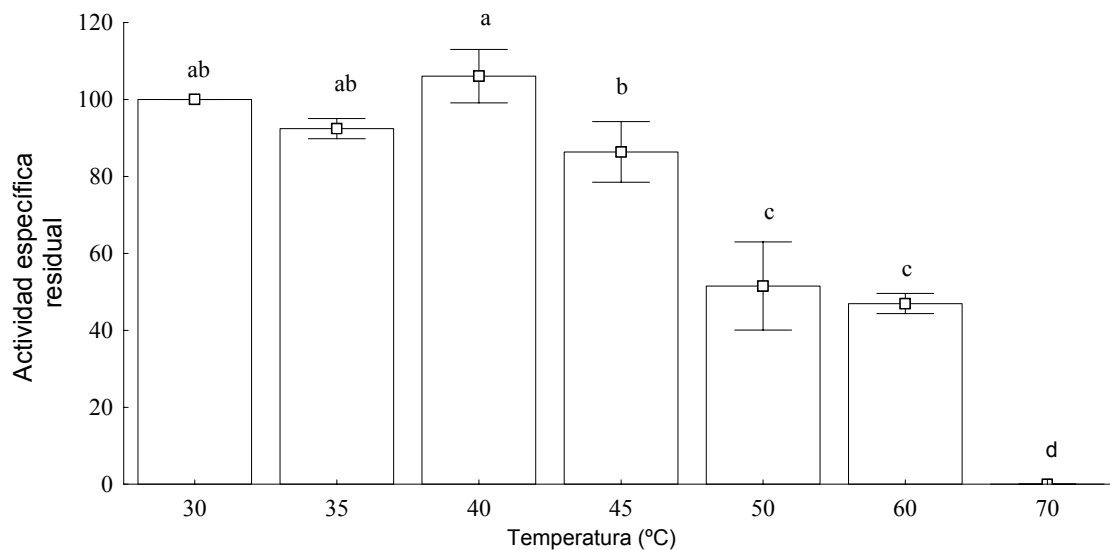


Figura 25. Termoestabilidad de la actividad proteasa del hepatopáncreas. Se representa el promedio y el error estándar ($p < 0.05$). Las letras distintas sobre las columnas indican que hay diferencias estadísticas entre las actividades.

7.4.1.6. Proteasas específicas.

En la Tabla VII se muestran los valores de actividad específica de los diferentes tipos de enzimas proteolíticas determinadas.

Tabla VII. Actividades de proteasas específicas del extracto de hepatopáncreas de juveniles de *Cherax quadricarinatus*.

Tipo de Actividad	Sustrato	Actividad específica¹
Quimotripsina	SAAPNA	0.0535
Tripsina	TAME	6.8163
Carboxipeptidasa A	HP	0.0123
Carboxipeptidasa B	HA	N/D
Leucinaminopeptidasa	LPNA	N/D

¹ U/ mg proteína

^{N/D} No se detectó bajo las condiciones experimentales empleadas.

7.4.1.7 Efecto de Inhibidores y activadores de proteasas.

La actividad proteolítica total del extracto de hepatopáncreas se cuantificó ante la presencia de diferentes inhibidores. No se encontró efecto alguno bajo las condiciones experimentales del ZPCK sobre la actividad proteolítica del E.C. El EDTA al parecer favoreció la actividad proteasa, ya que su valor con relación al valor de referencia fue 14% mas alto. El SDS y PMSF inhibieron más del 50% la actividad proteolítica (Fig. 26).

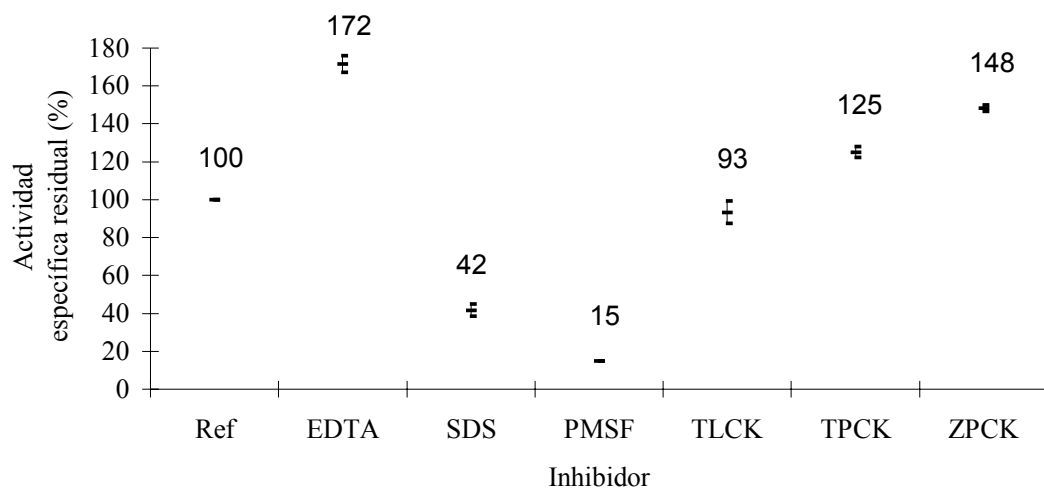


Figura 26. Efecto de algunos inhibidores y activadores sobre la actividad proteasa del hepatopáncreas. Los números señalan el valor promedio de la actividad específica. Las barras indican el error estándar. Ref= Actividad del control.

Actividad enzimática digestiva y consumo de alimento durante el ciclo circadiano. Experimento 5

7.5.1 Consumo de alimento.

La Figura 27 muestra el consumo promedio del alimento por parte de los juveniles a lo largo del experimento. El valor máximo promedio de consumo fue de 1.2 g y el mínimo de 0.51 g. Se observó un pico a las 18 horas y este fue significativamente diferente de otros dos picos observados (06:00 y 08:00).

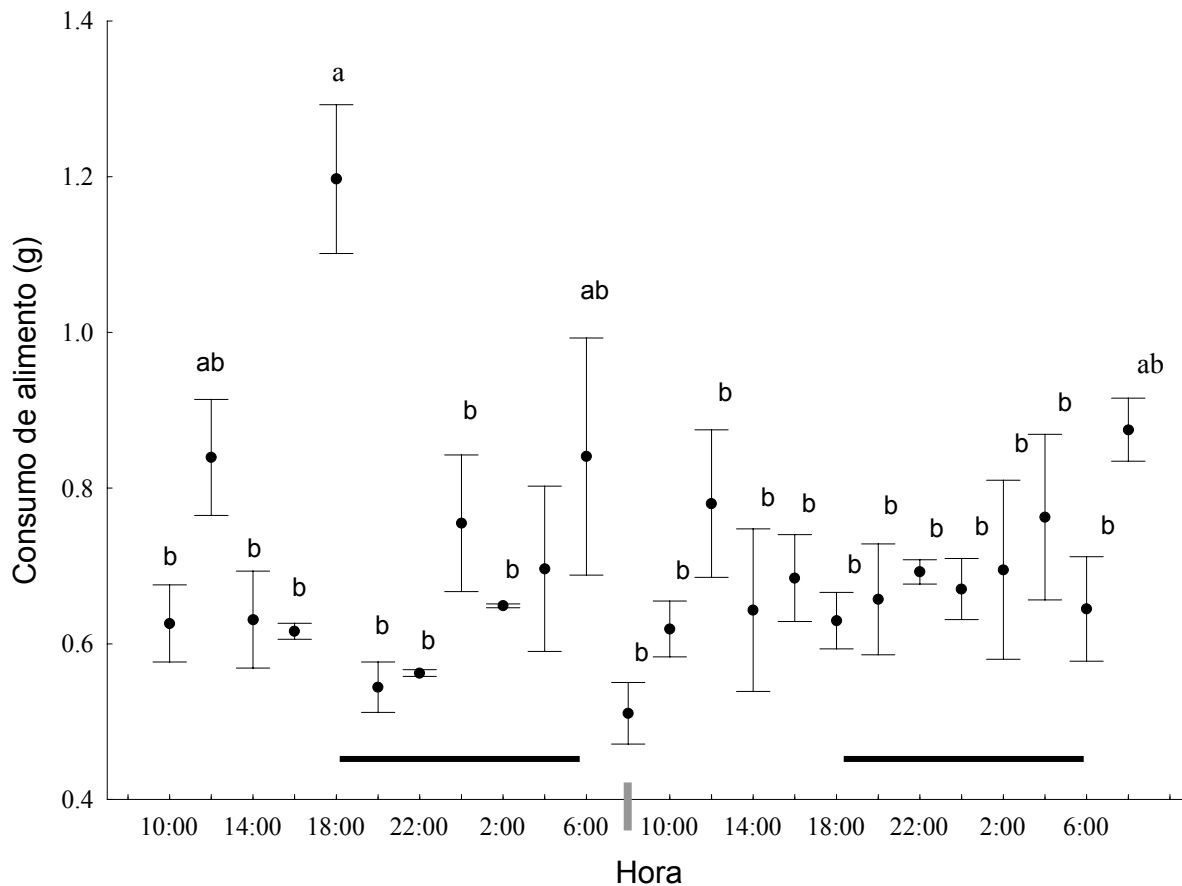


Figura 27. Consumo de alimento de los juveniles durante el ciclo circadiano. Las letras distintas indican que hay diferencias estadísticas en el consumo de alimento ($p < 0.05$). Las barras indican el error estándar. Las líneas negras horizontales indican las horas de oscuridad. La línea vertical gris sobre el eje X separa los días muestreo.

7.5.2 Actividad amilasa.

En los organismos alimentados un pico de actividad amilasa se observó a las 04:00 horas del primer día y otro a las 06:00 horas el segundo día, mostrando 2 horas de desfaseamiento entre un día y otro.

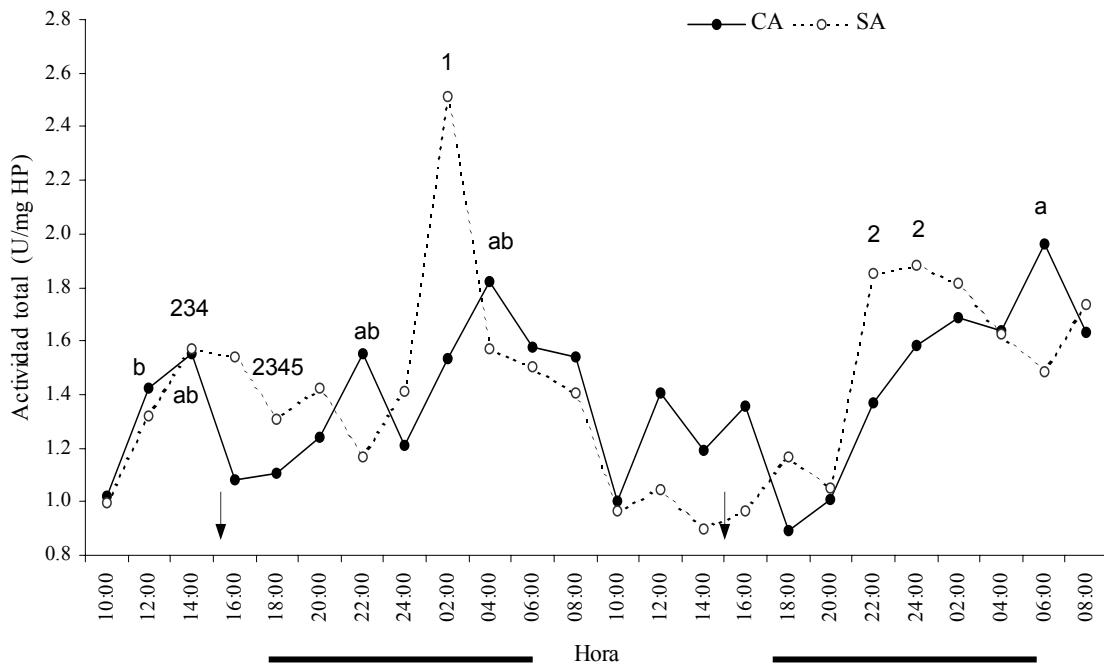


Figura 28. Actividad amilasa en el hepatopáncreas (HP) de juveniles. CA= Con Alimento; SA= Sin Alimento.- Las letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los organismos que recibieron alimento durante el experimento. Los números distintos indican diferencias estadísticas entre los organismos que no recibieron alimento durante el experimento. Las flechas señalan la hora de alimentación. Las líneas negras horizontales debajo del eje equis indican las horas de oscuridad.

Estos valores máximos observados (04:00, primer día y 06:00 horas, segundo día) no fueron diferentes estadísticamente entre sí. Otros picos más pequeños observados (14:00 y

22:00 horas, primer día; 02:00 horas, el segundo día) en el experimento no mostraron ser diferentes estadísticamente (Fig. 28).

En los organismos no alimentados, se obtuvo un valor máximo de actividad amilasa las 02:00 horas en el primer día; un pico mas bajo se observó entre las 22:00 y 24:00 horas para el segundo día, estos valores de actividad fueron diferentes estadísticamente entre si. (Fig. 28). Aunque los picos de mayor actividad para ambas condiciones experimentales no se presentan a la misma hora, si se observa un periodo de actividad enzimática hacia las horas de oscuridad.

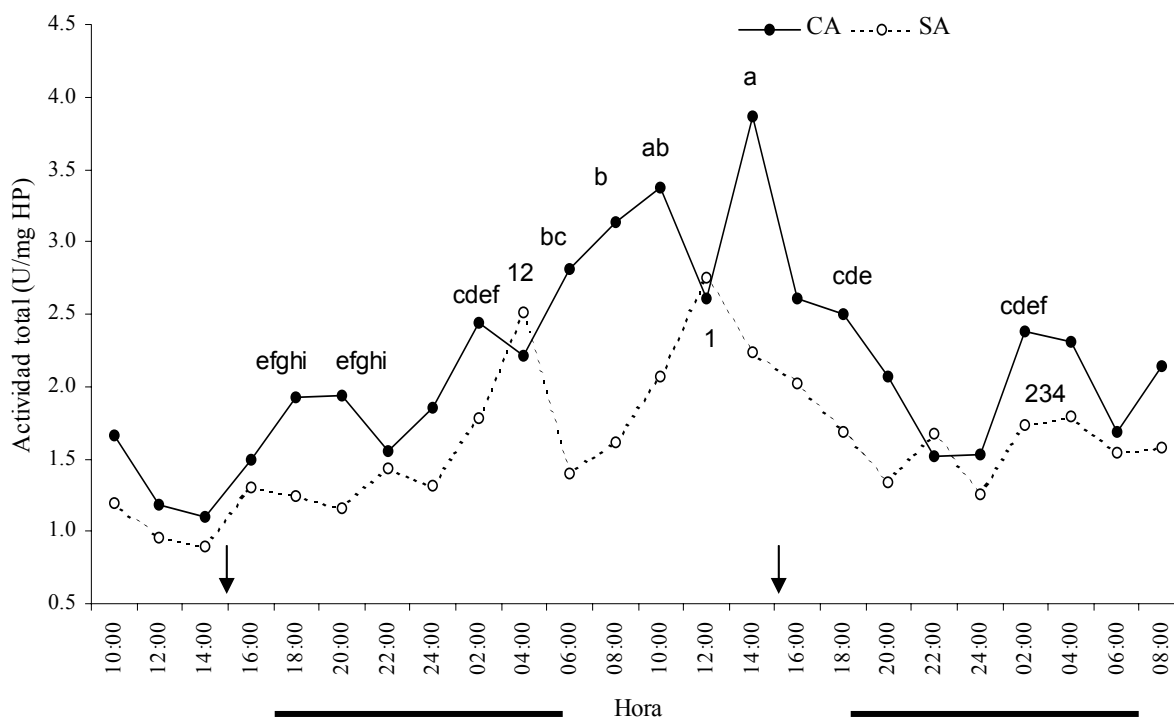


Figura 29. Actividad lipasa en el hepatopáncreas (HP) de juveniles. CA= Con Alimento; SA= Sin Alimento. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los organismos que recibieron alimento durante el experimento. Los números distintos indican diferencias estadísticas entre los organismos que no recibieron alimento durante el experimento. La flechas señalan la hora de alimentación. Las líneas negras horizontales debajo del eje equis indican las horas de oscuridad.

7.5.3 Actividad lipasa.

Los organismos alimentados en el primer día, no mostraron un pico definido de actividad lipasa, se observó incremento a lo largo del día, aparentemente el alimento indujo un incremento de la actividad. Sin embargo, en el segundo día no se observó el mismo patrón, se observó un pico de actividad a las 14:00 horas. La actividad lipasa no mostró un patrón regular bajo las presentes condiciones experimentales (Fig. 29).

Los organismos no alimentados mostraron un pico de máxima actividad lipasa a las 04:00 horas el primer día, y el segundo día presentaron un pico a las 12:00 horas; estos valores no fueron diferentes estadísticamente entre sí. Este mismo día, se observó un pico menor entre las 02:00 y 04:00 horas; este pico sí fue diferente estadísticamente respecto a los valores anteriores (Fig. 29).

7.5.4 Actividad proteasa

La actividad proteasa obtenida en los organismos alimentados mostró un solo pico máximo a las 02:00 horas del primer día de muestreo, once horas después del suministro del alimento; este valor fue diferente estadísticamente del resto de los valores obtenidos en el experimento. Sin embargo, cinco horas después del suministro del alimento, se observó un aumento en la actividad en ambos días. Estos últimos valores no fueron diferentes estadísticamente entre sí (Fig. 30).

En los organismos no alimentados se observó un pico de actividad entre las 20:00 y 22:00 horas para el primer día. Para el segundo día se observó un pico entre las 22:00 y las 24:00 horas; estos últimos valores no fueron diferentes estadísticamente entre sí. Durante todo el muestreo se presentaron fluctuaciones sin ningún patrón definido (Fig. 30).

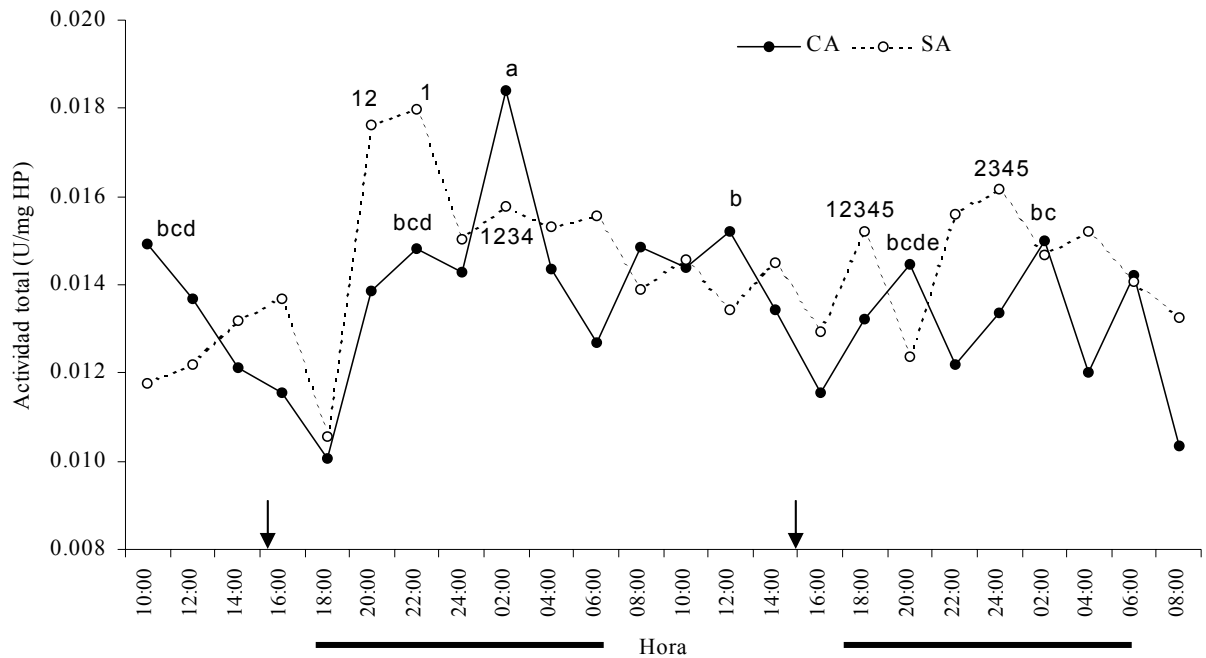


Figura 30. Actividad proteasa en el hepatopáncreas (HP) de juveniles. CA= Con Alimento; SA= Sin Alimento. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los organismos que recibieron alimento durante el experimento. Los números distintos indican diferencias estadísticas entre los organismos que no recibieron alimento durante el experimento. Las flechas señalan la hora de alimentación. Las líneas negras horizontales debajo del eje equis indican las horas de oscuridad.

8. DISCUSION

Efecto del tipo de ingredientes en alimentos experimentales sobre la actividad enzimática digestiva. Experimento 1

8.1 Crecimiento de juveniles

Se encontró una correlación positiva entre la TCR y el contenido de carbohidratos en el alimento y una correlación negativa entre la TCR y el contenido de proteínas en el alimento, en ambos casos las correlaciones no fueron significativas. Respecto a la TCR y el contenido de lípidos en los alimentos no se encontró correlación. El contenido de nutrientes en los alimentos no mostró correlaciones con la TCR's.

En este trabajo, los juveniles crecieron mejor con los alimentos P60 (41.7% PC) S (34% PC) y T(35.8% PC). Considerando los resultados obtenidos y los reportados por otros autores, existe coincidencia que el nivel óptimo de proteína en el alimento para juveniles es de al menos del 30%. El alimento P60 que tiene un mayor porcentaje de proteína, produjo un crecimiento comparable con el alimento S. La calidad del ingrediente del alimento P60 pudo favorecer el crecimiento más que la cantidad del insumo, probablemente por su composición de aminoácidos y/o ácidos grasos esenciales.

En este trabajo, los alimentos T y S tuvieron los valores más bajos de la relación proteína/energía (P/E) y produjeron mayor TCR, por otro lado, el alimento CAL que tenía el mayor valor de P/E produjo la menor TCR en los organismos.

Debido a que los niveles de energía de los alimentos experimentales fueron muy similares (Tabla IV), estos valores no pueden explicar las variaciones encontradas en las tasas de crecimiento, por lo tanto, las diferencias en el crecimiento podrían explicarse por

las proporciones de los ingredientes y la posible interacción entre ellos, mas que por el nivel de inclusión en los alimentos (Samain et al. 1980).

Cruz-Suárez et al. (1992) reportaron que un nivel de inclusión del 10% de harina de calamar mejoró el crecimiento de *Penaeus monodon*. Por otro lado, Cruz-Ricque et al. (1987) encontraron que la fracción proteica extraída de calamar (FPC) a niveles del 6 al 16% tuvo un efecto promotor del crecimiento en diferentes especies de camarón. En nuestro experimento, este ingrediente se incluyó en un 15%, pero no favoreció el crecimiento de los juveniles de *Cherax*. La fuente del insumo hace variar su calidad del mismo en cuanto a la disponibilidad de nutrientes y tipo de aminoácidos esenciales para el crecimiento (Cruz-Ricque et al. 1987). Esto podría explicar el poco crecimiento obtenido por los juveniles de *C. quadricarinatus*, ya que este ingrediente no aportó los nutrientes necesarios que favorecieran el crecimiento de los juveniles. Además, Campaña (2001) reportó una digestibilidad aparente de proteína del 71% para este insumo, por parte de los juveniles de *Cherax quadricarinatus*, que resultó bajo comparado con otras fuentes vegetales. Sin embargo, se necesitan realizar más trabajos para poder conocer mejor la respuesta a este insumo por parte de la especie.

8.1.1. Actividad enzimática digestiva.

Jover et al (1999) reportaron que un nivel de inclusión de carbohidratos en el alimento entre 36 y 41% es apropiado para el crecimiento de *Procambarus clarkii*. En nuestro estudio, los alimentos T (48.2%) y S (49.6%) tuvieron los más altos niveles de carbohidratos y produjeron las más altas TCR; sin embargo, el alimento P60 con un valor de 38.7% de inclusión produjo buen crecimiento en los organismos, este valor cae dentro del rango reportado por otros autores. Galgani et al. (1988) reportaron que alimentos con un

alto porcentaje de harina de soya no mejoraron el crecimiento de *Penaeus vannamei* y sugirieron que este ingrediente podría ser incluido en los alimentos a niveles menores o iguales del 10%. En el presente experimento todas los alimentos contenían 21% o más de pasta de soya, provocando el mismo resultado que el reportado por Galgani et al. (1988). *Cherax* puede usar este ingrediente pero sin mejorar el crecimiento. El alimento SY produjo menor crecimiento en relación con otros alimentos que contenían ingredientes vegetales (S y T), pero produjo un crecimiento similar al alimento de referencia.

Campaña (2001) encontró altos valores de digestibilidad de materia seca y carbohidratos para los ingredientes sorgo y trigo. En concordancia con la digestibilidad del ingrediente, el mayor crecimiento fue obtenido con los alimentos suplementados con trigo y sorgo, los cuales mostraron altos valores de digestibilidad, 93.7% y 92.6% respectivamente. El rango de correlación de Spearman entre el porcentaje de inclusión de carbohidratos en los alimentos y el coeficiente aparente de digestibilidad de carbohidratos fue del 0.75. Cruz-Suárez et al. (1994) reportaron alta digestibilidad del trigo en relación con otras fuentes de carbohidratos para *Litopenaeus vannamei*.

La digestibilidad del almidón es afectada por la fuente de origen (Cruz, et al. 1994; Davis and Arnold, 1993; Reigh, Braden y Craig, 1990) y por el proceso de tratamiento del almidón durante la preparación del alimento (Glass y Stark, 1995). Además, la fuente del almidón puede afectar la expresión de la actividad amilasa (Le Moullac, et al. 1996). Brunson et al. (1997) propusieron que las diferencias de digestibilidad podrían ser debidas a la naturaleza de los ingredientes y no a la cantidad en los alimentos. La fuente de almidón de los diferentes ingredientes vegetales (S, SY y T) y animales (CAL, LANG, P60 y P65) usados en la elaboración de alimentos no produjo ninguna correlación entre actividad amilasa y el contenido de carbohidratos en los alimentos, considerando además que los

insumos tenían otro tipo de carbohidratos diferentes al almidón. Según Hoyle (1973), variando el porcentaje de almidón en los alimentos para *Homarus americanus* no se presentó una correlación directa entre la actividad amilasa y la cantidad de almidón en el alimento. En contraste, Moreau et al. (1985) encontraron que el almidón pregelatinizado incrementó la síntesis de glucosidasas. Considerando estos resultados, si los alimentos con altos niveles almidón (S y T) produjeron los mas altos valores de actividad amilasa y mayor crecimiento, entonces el sorgo y el trigo son buenas fuentes de almidón y energía para juveniles de *Cherax quadricarinatus*, por lo tanto la participación de la amilasas en la hidrólisis del almidón podría ser muy importante.

Rosas et al. (2000) trabajaron con varias especies de decápodos marinos y encontraron que el incremento de carbohidratos en el alimento puede incrementar la actividad amilasa, pero altos niveles pueden detener la actividad. Ellos reportan que *Litopenaues setiferus* tolera niveles de carbohidratos hasta 40%.

Un incremento progresivo en el uso de carbohidratos-lípidos como fuente de energía causa una disminución en el uso de energía. Hay especies que acumulan gran cantidad de glucógeno en la glándula digestiva como *Litopenaues setiferus* (Rosas et al. 2002) cuando se utilizan altos niveles de carbohidratos en el alimento. Aunque en este estudio no se determinó glucógeno en la glándula digestiva, nosotros podríamos pensar que *Cherax quadricarinatus* tiene una estrategia similar. No obstante, se deben hacer estudios específicos sobre el metabolismo de carbohidratos en esta especie.

Johnston y Yellowless (1998), trabajando con la langosta zapatilla (*Thenus orientalis*), propusieron que la proporción de ingredientes animales/vegetales podría explicar las diferencias en las actividades enzimáticas de los organismos experimentales. En nuestro experimento, el alimento T produjo el valor más alto de actividad amilasa, pero

no se encontró correlación con el contenido de carbohidratos en el alimento. Johnston y Yellowlees (1998) propusieron que los animales omnívoros muestran una mayor actividad de carbohidrolasas.

Fotadar et al. (1999) reportaron que altos niveles (12%) de aceite de pescado en el alimento inhibieron el crecimiento de los juveniles del acocil marrón (*Cherax tenuimanus*), cultivado bajo condiciones de laboratorio, argumentando que el requerimiento mínimo de aceite de pescado parece ser del 2%. El nivel de lípidos reportado como óptimo para crecimiento de especies similares, tales como *Procambarus clarkii* es del 6% en el alimento (Jover et al. 1999). En concordancia con lo anterior el alimento T con 6.4% de lípidos produjo el más alto crecimiento, pero no se obtuvo correlación entre el contenido de lípidos y el crecimiento.

No se encontró correlación entre la actividad proteasa y el contenido de proteína en los alimentos. Lee et al. (1984) encontraron variaciones en la actividad proteasa en *Litopenaeus vannamei* donde se relacionó la proporción proteína animal/proteína vegetal y el tamaño del organismo, pero no encontró relación entre actividad enzimática y crecimiento. Mackeviciene (1999) encontró que los juveniles de *Astacus* y *Pacifastacus* mostraron mayor actividad proteasa que los adultos.

Galgani et al. (1988) encontraron que altos niveles de harina de soya y harina de pescado no favorecieron el crecimiento de *L. vannamei* y que no tuvieron ningún efecto sobre la actividad enzimática. Por otro lado, Cahu & Zambonino (1994), reportaron cambios en la actividad tripsina en larvas del pez *Dicentrarchus labrax* por cambios en el nivel de proteína y el perfil de aminoácidos de la proteína. Shick et al. (1984) encontraron que los mamíferos presentaron cambios en los patrones de isoenzimas de proteasas cuando se incrementaba la proteína en el alimento. En algunos casos, la actividad proteasa ha sido

influenciada por el alimento (Le Vay et al. 1993). En otros casos, no se ha encontrado ningún efecto (Biesot and Capuzzo, 1990).

Una alta actividad amilasa se ha usado para designar a un organismo omnívoro, mientras que un carnívoro presenta una gran actividad proteasa (Johnston y Yellowlees, 1998). Con excepción del tratamiento con el alimento T, donde la relación amilasa/proteasa fue mayor al final del experimento, esta relación amilasa/proteasa fue muy similar. Si la actividad amilasa aumentaba en los diferentes tratamientos, la actividad proteasa también lo hacía. Samain et al. (1980) en un estudio con *Artemia* encontraron que la actividad enzimática está relacionada con los cambios de la composición química del alimento (para nuestro caso, la diferente composición de cada alimento), la tasa de ingestión (no fue evaluada en este experimento), la expresión genética del individuo, la cual está modulada por factores ecológicos, y la relación entre el alimento y los requerimientos nutricionales.

Nuestros resultados indican que los juveniles del acocil *C. quadricarinatus* tiene una amplia capacidad para usar diferentes ingredientes alimenticios, como fue reportado por D' Abramo y Robinson (1989). La gran actividad amilasa y lipasa en los organismos alimentados con el alimento T sugiere que la harina de trigo (rica en almidón) es un buen ingrediente para favorecer el crecimiento de los juveniles, mismo que coincide con los resultados de Cousin et al. (1996) y Brunson et al. (1997). Además, estos resultados coinciden con los reportados por Campaña (2001), que encontró en *Cherax quadricarinatus* una alta digestibilidad para las harinas de trigo y sorgo. Figueiredo, et al. (2001), en un estudio de actividad enzimática con adultos de la misma especie mostraron que estos organismos tienen un amplio perfil de enzimas hidrolíticas.

Cherax quadricarinatus tiene la capacidad de usar eficientemente carbohidratos, especialmente fuentes de almidón, para el crecimiento, lo cual representa una ventaja sobre otros organismos, principalmente porque se reduce la adición de ingredientes animales (aunque contengan glucógeno en pequeñas cantidades) en los alimentos, reduciendo los costos, y haciendo de esta especie un buen prospecto para la acuicultura. *Cherax quadricarinatus* tiene la capacidad de hidrolizar diversos polímeros dietéticos, lo que explica su comportamiento omnívoro, capacitándolo para el uso de diferentes ingredientes para el crecimiento. Estudios relacionados con la modificación y regulación de la síntesis de enzimas digestivas ayudarían a comprender mejor el proceso digestivo de esta especie.

Efecto del nivel de proteína en alimentos experimentales sobre la actividad enzimática digestiva. Experimento 2.

8.2. Crecimiento de juveniles con diferentes niveles de proteína.

La mayor TCR se obtuvo con el alimento A32 (32% de proteína). Los alimentos A20, A44, A50 y A56 dieron los valores más bajos ganancia en peso. Resultados semejantes fueron reportados por Jones et al. (1996) quienes encontraron que un alimento con 30% de PC produjo el mejor crecimiento para dos especies del género *Cherax*. Cortés et al. (2003) encontraron que un alimento alrededor de 30% de PC para juveniles de *C. quadricarinatus* produjo un mejor crecimiento bajo condiciones controladas de laboratorio. Baillet et al. (1997), trabajando con *Litopenaeus stylirostris*, encontraron un nivel óptimo para el crecimiento con alimentos conteniendo 30% de PC y que niveles altos de proteína en el alimento reducen la eficiencia de utilización de proteína en estos organismos. En el presente trabajo se obtuvo bajo crecimiento con los alimentos que contenían menos de 30% de proteína o bien superior al 40%.

En contraste, Ackefors et al. (1992) encontraron mejor crecimiento en *Astacus astacus* con alimentos de 40% de PC; por su parte Jones (1995) sugirió un nivel de proteína en el alimento alrededor del 40%. Para estos autores la relación proteína/energía (P/E) así como la proporción carbohidratos/lípidos y la edad de los organismos son factores importantes para el crecimiento. De igual manera, *Homarus gammarus* produjo gran actividad proteasa cuando fue se proporcionaron alimentos que contenían 40% de proteína (Moreau et al. 1985). La diferencias en los porcentajes encontrados por otros autores y este trabajo pudiera explicarse por las diferentes condiciones experimentales y la condición de los organismos.

Se encontró una correlación positiva entre la TCR y el contenido de carbohidratos en el alimento y una correlación negativa entre la TCR y el contenido de proteínas en el alimento, en ambos casos las correlaciones no fueron significativas. Se realizó una correlación entre la razón proteínas/carbohidratos pero no mostró correlación.

Según los trabajos revisados, el mejor porcentaje de inclusión de proteína en los alimentos para géneros relacionados con *Cherax* y otros crustáceos presenta variaciones que van desde 20% hasta el 40 % de inclusión (Baillet et al. 1997, Jones, et al, 1996, Ackefors, et al. 1992, Van Wormhoudt et al. 1980, Moreau et al. 1985, Tsvetnenko et al. 1995, Keefe and Rouse, 1999). Los resultados presentados en este experimento coinciden mas con los reportados por Keefe y Rouse (1999) que trabajaron con juveniles de *Cherax quadricarinatus*, donde reportan que el alimento que mejor crecimiento produjo en juveniles está dentro del rango de 20 y 30% de proteína, aunque mencionan que se pueden usar alimentos con mayor inclusión de proteínas durante al crianza en sistemas cerrados por la brevedad del tiempo de esta fase de desarrollo. Van Wormhoudt (1980), trabajando con la especie *Palaemon serratus* señala que un alimento pobre en proteína y rico en

carbohidratos, produce alta mortalidad y poco crecimiento. Este resultado concuerda con lo encontrado en el presenta trabajo, que fue el caso del alimento A20.

8.2.2 Actividad enzimática digestiva.

La actividad amilasa detectada del hepatopáncreas de la langosta de agua dulce en todos los tratamientos fue siempre menor respecto al valor inicial del experimento. Para tratar de explicar la reducción de la actividad amilasa con los diferentes alimentos, respecto al inicio, debemos considerar la naturaleza y nivel de inclusión de los ingredientes en la elaboración del alimento de mantenimiento, este fue un alimento comercial peletizado, de la cual desafortunadamente sólo se tiene la composición proximal. La diferencia en peso inicial de los organismos también pudo influir en la actividad amilasa así como el tiempo de aclimatación a las condiciones experimentales. Se sabe también que en la elaboración de loss alimentos, los ingredientes sufren modificaciones que los pueden hacer más digeribles, de tal modo que posibilita una mejor digestión del insumo utilizado (Le Moullac et al. 1994). Por otro lado, comparando los valores de actividad amilasa por periodo para todos los alimentos, podemos decir que a pesar de la reducción de la actividad amilasa en los organismos, esta tendió a hacerse homogénea entre los tratamientos conforme pasaba el tiempo. Van Wormhoudt, (1980) propone una adecuación de los organismos a los diferentes alimentos lo que podría explicar las variaciones de la actividad enzimática.

La actividad lipasa subió a los 15 días del inicio en todos los tratamientos, bajando a los valores iniciales a los 30 días. A los 45 días volvió a subir esta actividad para todos los tratamientos, siendo estos valores los mayores en todo el ensayo. No se pudo establecer una relación entre la actividad lipasa y el crecimiento, no obstante que los valores de actividad obtenidos en el último periodo sobrepasan al valor inicial y a pesar de que el crecimiento

fue mayor en los alimentos A32 y A38, los valores mayores de actividad lipasa fueron compartidos por los alimentos A38 y A58. La cantidad de lípidos en el alimento de mantenimiento era de 12.66%, los porcentajes de lípidos proporcionados en los alimentos experimentales no sobrepasaron el 11%. Cox y Wilson, 1981, citados por Le Moullac, et al. 1996, en un estudio con un copépodo mostraron que el cambio de alimento indujo cambios en las enzimas. Harris et al. (1982), citado por Lovett y Felder, (1990), proponen que la secreción de grandes cantidades de enzimas pueden maximizar el uso de un nutriente escaso en el alimento, con lo que aumentaría la hidrólisis; si esto es cierto, al bajar la cantidad de lípidos en los alimentos proporcionados, se pudo haber provocado mayor cantidad de enzimas, resultando una mayor actividad a los 15 días de iniciado el experimento y regresando a valores similares una vez que el organismo se adecuó a los niveles de lípidos disponibles, no produciendo mas enzimas. Sin embargo, este comportamiento de baja actividad lipasa en el segundo periodo de muestreo (30 días) y ascenso en el tercer periodo (45 días) fue muy parecido a la actividad proteasa. Probablemente la explicación esté relacionada con la actividad esterasa no específica de las proteasas que pudieran estar involucradas en la hidrólisis (Lovett y Felder, 1990).

La actividad proteasa al inicio del experimento tuvo el valor más alto, a los 15 días se redujo, a los 30 días se redujo aún más, y al final del experimento presentó un aumento, este comportamiento se observó en todos los tratamientos. La menor actividad se registró en el alimento A56.

Van Wormhoudt, (1980) menciona que la variación en la síntesis de enzimas digestivas está en función de cantidad de alimentos asimilables. Las actividades enzimáticas parecen responder a diferencias en los alimentos en menor tiempo que la respuesta a la tasa crecimiento (Chen y Fu Lin, 1992). Considerando la adaptabilidad a los

alimentos, se podría explicar la reducción de la actividad proteolítica en el hepatopáncreas de *Cherax*. Sin embargo las respuestas resultaron muy diferentes entre los tratamientos, y esto no explica del todo la variabilidad observada. Quizás reduciendo los rangos del nivel de proteínas en los alimentos y aumentando las réplicas podrían ayudar a comprender mejor la respuesta enzimática. Al final del experimento, los alimentos A26 y A50 produjeron valores de actividad cercanos entre ellos. Para este tipo de actividad tampoco se encontró una relación directa con el crecimiento. Sin embargo, se puede decir que la actividad proteasa de los organismos a los que se les proporcionaron los alimentos A32 y A38 no presentó tanta variación en la actividad y que estos alimentos produjeron el mejor crecimiento durante el experimento. De acuerdo a lo reportado, los alimentos con inclusión de proteína de al menos 30% producen un mejor crecimiento y mejor actividad proteasa. Si se considera la relación de α -amilasa/proteasa mencionada por algunos autores como Fang y Lee (1992) acerca de la tendencia de un crustáceo a ser herbívoro o carnívoro, para el caso de los juveniles de la langosta de agua dulce utilizados aquí, no se pudo poner en evidencia un comportamiento, por lo que se deberán hacer mas estudios.

Caracterización de la actividad esterasa-lipasa de la glándula digestiva de los juveniles. Experimento 3

La actividad lipasa de la glándula digestiva de los juveniles de *Cherax quadricarinatus* usando β -naftil caprilato como sustrato fue óptima entre los 35 y 45 °C y decreció cuando la temperatura subió a mas de 50 °C. Un resultado similar fue reportado por Biesot y Capuzzo (1996a) en el estadio I de la langosta *Homarus americanus* cuando usaron trioleína como sustrato. Ramana-Rao y Surendranath (1991) reportaron una mayor

actividad a 37 °C en *Metapenaeus monoceros*. Trellu y Ceccaldi (1980) reportaron que la temperatura modificó la presencia de diferentes isoenzimas esterases, pero que en general la actividad disminuía arriba de 30 °C. Para nuestro caso, aunque la actividad óptima *in vitro* fue a 35-45 °C, la especie en condiciones naturales no tolera altas temperaturas por periodos prolongados (Jones, 1990).

No se tiene información acerca del efecto de la salinidad sobre la actividad esterasa de crustáceos. En este trabajo, el E.C. de *C. quadricarinatus* mostró una mayor actividad entre 5 y 100 mM de NaCl. Arriba de 500 mM la actividad disminuyó. Al parecer la esterasa de esta especie es menos halotolerante que la esterasa de mamíferos (Albro *et al.* 1985). Jones (1990b) encontró que a 282 mM de NaCl el 70% de los individuos de *C. quadricarinatus* sobrevivían durante 21 días de exposición. Aparentemente esta especie no tolera altas salinidades por periodos prolongados. En este trabajo, altos niveles de salinidad afectaron la actividad esterasa. Se puede esperar un efecto negativo de altas salinidades sobre la actividad esterasa de la especie, ya que se emplearía energía en mantenerse y no emplearía los metabolitos en formar parte de los tejidos.

Se han reportado algunos estudios del efecto del pH sobre la actividad esterasa y lipasa en crustáceos. Brockeroff *et al.* (1970) usando el jugo gástrico de *H. americanus* encontraron una actividad óptima de lipasas a pH de 6.8 usando trioleína y tributirina como sustratos. Biesot y Capuzzo (1990a) reportaron gran actividad lipasa a pH de 5.5, usando trioleína como sustrato y baja actividad a pH alcalino en el hepatopáncreas de larvas de *H. americanus*. Ramana-Rao y Surendranath (1991) estudiando el efecto del keltano sobre la actividad lipasa en *Metapanaues monoceros* reportaron tres picos de actividad entre 4.5 y 8.5 de pH. En organismos control, la actividad de la lipasa en medio neutro fue superior que en medio ácido. Tietz y Shuey (1993) indicaron que el pH óptimo para la lipasa fue

entre 7.4 y 10 dependiendo del tipo de sustrato y amortiguador usado. La pureza de la enzima puede afectar los resultados finales (Biesot y Capuzzo, 1990a). López-López et al. (2003) encontraron actividad enzimática a pH ácido, pero los valores fueron bajos; la mayor actividad fue encontrada entre 8.5 y 9.0 de pH. Figueiredo et al. (2001) encontraron en el jugo gástrico de organismos adultos de *C. quadricarinatus* un valor alto de actividad a pH de 8.0, pero no encontraron actividad en el hepatopáncreas. Esta ausencia de lipasa en el hepatopáncreas sugiere la síntesis de una proenzima, sin embargo, en su estudio no se consideró el estado de muda del organismo, por ello quizás no detectó actividad lipasa en este órgano. En contraste, en este trabajo si se encontró actividad lipasa en el E.C. del hepatopáncreas. La fuente de la enzima, así como la condición fisiológica del organismo podría explicar las diferencias encontradas por otros autores (Vogt, 1989)

La actividad lipolítica en los juveniles de *C. quadricarinatus* fue parcialmente inhibida por el ión calcio (20%) y una inhibición total fue producida por los iones de metales pesados, excepto el ión cobalto (reducción del 80%) y el ión zinc (reducción del 90%). El ión magnesio no tuvo efecto sobre la actividad lipasa. No se dispone de información sobre el efecto de metales pesados sobre la actividad lipasa en otros decápodos.

Iijima *et al.* (1998) purificaron y aislaron una lipasa de un pez (*Pagrus major*) y encontraron que la adición de iones calcio no afectó la actividad, como se ha demostrado en mamíferos. En contraste, la actividad lipasa en *C. quadricarinatus* fue afectada por los iones calcio, reduciéndola un 20%. No se ha encontrado ningún trabajo que relacione el efecto de los iones magnesio sobre la actividad lipasa, esto permite abrir un área de investigación al respecto.

En *C. quadricarinatus*, la estabilidad *in vitro* de las esterasas fue afectada desde 30 hasta 70 °C tras 30 minutos de incubación. Resultados similares fueron reportados por Brun y Wojtowicz (1976) para *Cancer borealis* y *Cancer irroratus* encontrando que arriba de 40 °C durante 20 minutos de incubación la actividad disminuía.

La actividad esterasa fue determinada con compuestos derivados de α -naftil, β -naftil y *p*-nitrofenil-ácido graso con diferente número de carbonos en la cadena. Se encontró menor actividad con los compuestos que tenían mayor número de carbonos en la cadena de ácidos grasos. Similares resultados fueron encontrados por Lovett y Felder (1990). Existe una discusión sobre la designación de actividad esterasa o lipasa dependiendo del sustrato usado. Sin embargo, la hidrólisis de triglicéridos supone una verdadera actividad lipasa. Con esta consideración, se puede establecer que el E.C. de la glándula digestiva de los juveniles de *C. quadricarinatus* mostró una verdadera actividad lipasa al hidrolizar la tributirina.

En el análisis electroforético del E.C. de la glándula digestiva cuando se uso β -naftil acetato y β -naftil butirato como sustratos se obtuvieron dos bandas similares de actividad esterasa. Con el β -naftil caprilato se observó una banda adicional de 118 kDa. El peso molecular de las isoenzimas reportadas aquí para *C. quadricarinatus* son similares a las reportadas para *H. americanus* (43 kDa) obtenida por el método de filtración en gel. Una isoenzima de 63 kDa para *C. quadricarinatus* fue similar a la encontrada por Iijima et al. (1998) en *Pagrus major*.

En este trabajo se encontraron dos enzimas (63 y 118 kDa) que hidrolizan compuestos con cadenas cortas de ácidos grasos, mientras que otra enzima de menor masa molecular (46 kDa) ha sido designada como una verdadera lipasa (Brockeroff et al. 1970) e hidroliza compuestos de ocho carbonos y la tributirina. Se requieren estudios adicionales para

verificar la especificidad de estas enzimas. Estos resultados indican que *C. quadricarinatus* tiene la capacidad de hidrolizar compuestos de diferente longitud de ácidos grasos, apoyando los resultados reportados por Figueiredo et al. (2001) donde se menciona que esta especie tiene un amplio rango de enzimas digestivas.

Caracterización parcial de amilasas y proteasas de la glándula digestiva.

Experimento 4.

8.4. Actividad amilasa del extracto crudo del hepatopáncreas.

8.4.1 Temperatura.

La actividad amilasa del hepatopáncreas mostró un aumento conforme lo hacia la temperatura, y a 70 °C la actividad disminuye. La mayor actividad se presentó a los 50 y 60 °C, no habiendo diferencia significativa entre estos valores. Una prueba realizada por Vega-Villasante et al. (1993) sobre la actividad amilasa del camarón café reporta que la mayor actividad amilasa se detectó 30 y 40 °C, solo que la determinación se realizó después de una incubación por 20 minutos de la mezcla de reacción a esa temperatura y con un amortiguador de acetato (pH 6). Estos mismos autores citan los resultados obtenidos por otros investigadores sobre la actividad amilasa de *Palaemon serratus* (Van Wormhoudt, 1980), *Parapenaopsis harwickii* y *P. stylifera*, con los mismos resultados que ellos, pero difiriendo de la actividad encontrada en *Homarus americanus* cuyo óptimo fue a 50°C, esta misma temperatura se encontró para *Cherax quadricarinatus* en este estudio. Omondi y Stak (1995) encontraron que a un pH de 6.8 la mayor actividad de amilasa para *Penaeus vannamei* fue a 22°C y para *P. indicus* al mismo pH, la mayor actividad fue a 37°C.

8.4.2. Salinidad.

En el presente trabajo, la actividad amilasa del hepatopáncreas mostró una mayor actividad a una concentración de 100 mM, aunque no hay diferencia significativa con el valor encontrado a 10 mM, y este valor no fue significativamente diferente del valor obtenido a una concentración de 5 mM; a partir de una concentración de 500 mM la actividad amilasa empezó a disminuir. Vega-Villasante et al. (1993), encontraron que la mayor actividad amilasa de *P. californiensis* fue a concentración de NaCl de 10 mM. Según Van Wormhoudt, (1980) la actividad amilasa parece ser favorecida por los iones cloruro. En base a lo anterior podría decirse que las enzimas hidrolíticas del almidón de esta especie son más halotolerantes respecto a las de camarón café, lo que implica una mejor respuesta ante condiciones adversas del ambiente.

8.4.3. pH

En *Cherax quadricarinatus*, la actividad amilasa más alta se presentó entre un pH de 5 y 6, en tanto para el camarón café se reportó alrededor de 7.5 (Vega-Villasante et al. 1993). Van Wormhoudt (1980), reportó que la mayor actividad amilasa para *Palaemon serratus* fue entre 7 y 8. Omondi y Starck (1995) reportaron valores altos de actividad amilasa a pH de 6.8 a 37°C para *Penaeus indicus* y valores altos a 30 °C en el mismo valor de pH para *P. vannamei*. Xue, et al. (1999), reportaron que la mayor actividad para la celulasa fue entre 4 y 5. Maugle (1982), citado por Divarakan et al. (1998), encontró en *Penaeus japonicus* un tipo de amilasa con actividad óptima a pH de 6.8. Por lo anterior, el pH óptimo para la actividad amilasa encontrada en la langosta de agua dulce es ligeramente ácido comparado con los resultados reportados para las especies marinas.

8.4.4 Iones metálicos y EDTA.

La actividad amilasa en *Cherax quadricarinatus* no se vio afectada por los iones de calcio, ni el agente quelante EDTA; se redujo ligeramente con los iones de magnesio. El ión aluminio redujo la actividad alrededor del 60%. Los iones de metales pesados inhibieron casi toda la actividad. Vega-Villasante et al. (1993) encontraron que la actividad amilasa del camarón café fue afectada por cationes divalentes Hg^{+2} , Cu^{+2} , Cr^{+2} $Zinc^{+2}$. Los resultados del presente trabajo concuerdan con los reportados. Se tiene poca información del efecto de estos iones sobre la actividad amilasa. Es importante remarcar que la calidad del agua en cuanto a estos componentes metálicos puede tomarse como criterio para la elección del lugar del cultivo de esta especie.

8.4.5. Actividad proteasa en el extracto crudo del hepatopáncreas.

8.4.5.1 Temperatura y termoestabilidad

El valor máximo de actividad enzimática para la langosta de agua dulce se encontró a los 50 °C, y a partir de los 60 °C la actividad empezó a bajar. Van Wormhoudt (1980) reporta la mayor actividad proteasa de *Palaemon serratus* entre una temperatura de 40 y 50 °C. González-Agraz (2000) evaluó la actividad proteolítica total de cuatro especies de decápodos, encontrando que a 50 °C se presentó el máximo pico para las cuatro especies, coincidiendo con los resultados de este trabajo.

García-Carreño, et al. (1994) en un trabajo con langostilla (*Pleuroncodes planipes*) y con un decápodo de agua dulce (*Pacifastacus astacus*), reportaron una actividad residual del 100% después de una exposición del extracto de langostilla durante 30 minutos a temperaturas de 20 y 30 °C, a los 45 minutos la actividad descendió cuando se expuso a 40 °C. El extracto del hepatopáncreas del decápodo de agua dulce presentó mayor resistencia a

la temperatura, pues a los 45 minutos de exposición a 40 °C todavía presentaba una actividad remanente cercana al 100%. González-Agraz (2000), encontró que a 40 °C y 20 minutos de exposición del extracto, la actividad proteasa en adultos de *Cherax* y *Procambarus* se redujo casi a la mitad del valor de referencia. Para nuestro caso, fue a partir de los 45 °C que la actividad residual comenzó a reducirse. Estas diferencias en los resultados reportados pudieran deberse a la fuente del EC y a las condiciones experimentales.

8.4.5.2 Salinidad

Los valores más altos de actividad proteasa se dieron en las concentraciones de 100, 500 y 1000 mM. Ello hace pensar en general, que las enzimas involucradas en la hidrólisis de proteínas para esta especie toleran niveles altos de salinidad. A la concentración de 1500 mM de NaCl, la actividad comenzó a bajar. Se encontró poca información para otros crustáceos acerca del efecto de la salinidad sobre esta actividad enzimática. Fang y Lee (1992), mencionan que a altas concentraciones de sal (400mM), la actividad tripsina decrece, pero la actividad quimotripsina aumenta, representando esto una ventaja fisiológica para el organismo. Las enzimas con actividad proteolítica de la especie *C. quadricarinatus* toleran altas concentraciones de NaCl, lo que puede hacernos pensar que esta especie puede vivir en agua con ciertos niveles de salinidad.

8.4.5.3 pH

La mayor actividad proteolítica se presentó a pH de 5, aunque también hubo actividad importante a pH entre 6.5 y 7.5. García-Carreño et al. (1993), reportan una mayor actividad proteinasa (quimotripsina) para la langostilla entre 6 y 8, pero para el acocil *Pacifastacus*

astacus, el valor óptimo lo reporta cercano a 6. Para una actividad tipo colagenasa, los valores de actividad para ambos organismos es cercano a un pH de 7. Van Wormhoudt (1980), reporta un pico de máxima actividad proteolítica para *Palaemon serratus* en un rango de pH entre 7 y 8. García-Carreño (1992), determinó el pico de mayor actividad en un extracto de prensado de *Pleuroncodes planipes*, a un pH entre 7 y 8 para actividad proteolítica total. Comparando los resultados de este trabajo, se puede decir que *Cherax quadricarinatus* presenta un pico de máxima actividad muy similar al acocil *Pacifastacus astacus* (García-Carreño,1993). González-Agraz (2000), registró para cuatro decápodos el óptimo de actividad proteasa a diferentes valores de pH, siendo para *P. stylirostris* y para *P. californiensis* el rango entre 7 y 8, mientras que para *Procambarus clarkii* y *Cherax quadricarinatus* el pico máximo está alrededor de 7.5. Es importante hacer notar que este autor trabajó con organismos adultos y extracto liofilizado, mientras que en el presente estudio se hizo con organismos juveniles y extracto crudo, por ello quizá la pequeña diferencia en los valores encontrados para la misma especie.

8.4.5.4 Iones metálicos y EDTA.

Los iones calcio y magnesio promovieron un aumento de la actividad proteasa. Aunque se esperaría que el EDTA produjera una disminución de la actividad o al menos se mantuviera igual que el valor de referencia, también produjo un aumento de la actividad, esto sugiere que puede estar presente un ión metálico en el hepatopáncreas diferente a los utilizados, que el EDTA secuestra, y que favorece la actividad proteasa. Sin embargo, se necesitan realizar estudios mas detallados para comprobar esta suposición.

8.4.6 Termoestabilidad de la actividad amilasa.

Con treinta minutos de exposición del extracto de hepatopáncreas a las diferentes temperaturas, la actividad amilasa empieza a bajar desde los 50 °C. Se obtuvieron resultados semejantes a los presentados por Vega-Villasante et al. (1993), aunque el periodo de exposición del extracto a las diferentes temperaturas fue de 20 minutos. No se encontraron mas trabajos que reporten la estabilidad de este tipo de enzimas en crustáceos. Este es un aspecto poco estudiado en crustáceos.

8.4.7 Proteasas específicas

En este estudio se pudieron determinar actividades tipo tripsina y quimotripsina, y una metaloproteasa como la carboxipeptidasa A. No se pudo detectar carboxipeptidasa B con la metodología utilizada, aunque no se puede hablar aún de su inexistencia en el hepatopáncreas de la langosta de agua dulce. De las proteasas analizadas del extracto de hepatopáncreas, la enzima que mayor actividad presenta en los decápodos es la tripsina, ya que cerca representa tres cuartas partes de la actividad proteolítica total (Galgani et al. 1984): En menor cantidad se presenta otra serinproteasa como la quimotripsina.. González-Agraz (2000) encontró en el extracto de hepatopáncreas de *Cherax quadricarinatus* de organismos adultos ambas serinproteasas, pero no detectó carboxipeptidasa A ni B. Vega-Villasante et al. (1993) reportó ambas serinproteasas, además de Carboxipeptidasas A y B y Leucinoaminopeptidasa en el extracto crudo del camarón café. Se resalta que al menos para la especie *Cherax quadricarinatus* se debe estudiar mas acerca de la detección de la carboxipeptidasa B que no se detectó en este trabajo ni en el reportado por González-Agraz.

8.4.7.1 Efecto de inhibidores, agentes quelantes y SDS sobre la actividad proteasa.

El compuesto ZPCK es un inhibidor de actividad tipo quimotripsina, en mamíferos, probablemente por eso no se presentó una reducción de la actividad proteasa en *Cherax*. El TLCK (inhibidor de tripsina) inhibió el 38% de la actividad. El PMSF que es un inhibidor de serinproteasas, inhibió el 77% de la actividad proteasa de la langosta. El TPCK solo inhibió el 7% de la actividad proteasa. En un trabajo realizado por García-Carreño et al. (1994) sobre el acocil *Pacifastacus astacus* reportaron que el TPCK y el ZPCK prácticamente no redujeron la actividad proteasa, usando azocaseína como sustrato. Un resultado similar se encontró en este trabajo. Por otro lado, García-Carreño et al. (1994) reportan que la presencia de SDS no modifica la hidrólisis *in vitro* de la azocaseína a una concentración de 0.1% (3.5 mM); sin embargo en este trabajo se vio que el SDS a una concentración de 5 mM en la mezcla de reacción redujo la actividad proteolítica 73%. Algunas enzimas necesitan ciertos elementos para ser activadas, como ejemplo, calcio o EDTA (García-Carreño et al. 1993). Este hecho se presentó para el caso del EDTA que aumentó 14% la actividad respecto al valor de referencia.

Actividad enzimática digestiva y consumo de alimento durante el ciclo circadiano.

Experimento 5

8.5.1 Actividad amilasa.

Se determinó la actividad enzimática digestiva en juveniles de *Cherax quadricarinatus* bajo dos condiciones experimentales. La actividad amilasa en los organismos alimentados presentó un pico a las 04:00 horas el primer día y a las 06:00 horas el segundo día. Se presentó un pequeño pico a las 14:00 hrs el primer día, pero no se repitió al segundo día. Hay que resaltar que el primer día se dio un aumento de actividad a las

22:00 horas (aunque después se detectó una reducción, 24:00 y 02:00 horas) y seis horas después se presentó el pico más alto (04:00 horas), pero estos valores no fueron significativamente diferentes entre sí. El segundo día se detectó un aumento de actividad a las 22:00 horas y ocho horas después se presentó el pico más alto para este segundo día. Los picos más altos observados no fueron significativamente diferentes. A pesar de ello se puede decir que la mayor actividad enzimática se presentó durante en la oscuridad o cercana al amanecer.

En los organismos sin alimento, se observó un pico a las 02:00 horas el primer día, pero no se repitió al segundo día. En el segundo día se observó un aumento entre las 22:00 y 24:00 horas, estos últimos valores fueron diferentes significativamente respecto al valor encontrado a las 02:00 horas del primer día. Igual que para los animales que recibieron alimento la mayor actividad se presentó durante la oscuridad.

Van Wormhoudt (1980) encontró que en *Palaemon serratus* sin alimento y en estado de intermuda, las amilasas presentaron un pico entre las 16:00 y las 17:00 horas y otro a las 24:00 horas, esta respuesta enzimática fue atribuida al periodo de iluminación y al ciclo de mareas en el área de muestreo. Rodríguez et al. (1976) en un estudio hecho con la misma especie encontró que la actividad amilasa presentó un pico a las 13:00 horas y otro pico entre las 21:00 y 23:00 horas, estableciendo un ciclo bifásico regulado por el horario y por la etología del organismo. *Palaemon serratus* presenta un periodo de actividad alimenticia preferentemente en la oscuridad; comparando esta característica con la especie *Cherax quadricarinatus*, parece indicar que al menos para esta actividad, ambas especies presentan similar comportamiento en inanición.

Molina et al. (2000) reportaron una gran actividad amilasa en *Litopenaeus vannamei* a las 14:00 horas, independientemente del horario de alimentación. Por el comportamiento

observado en este experimento fue difícil establecer un patrón definido en esta especie para la actividad amilasa bajo las condiciones experimentales. Por otro lado, el alimento afectó la respuesta enzimática porque varios picos de actividad fueron observados en el periodo experimental, en contraste con la condición de no alimentación. En este trabajo, el pico de actividad enzimática observado a las 02:00 horas en condiciones de inanición puede atribuirse a la producción natural de esta enzima, que aunque no se vio un pico tan evidente el segundo día de muestreo si se observó un aumento de la actividad para horas cercanas a las 02:00 horas.

8.5.2 Actividad lipasa.

Con excepción de algunos picos de actividad lipasa observados, los valores de esta actividad fueron superiores en los animales alimentados en relación a los no alimentados. El comportamiento de la actividad lipasa fue muy similar en el extracto de la glándula digestiva de los animales para ambas condiciones experimentales. En los animales que recibieron alimento se observaron varios picos de actividad. El primer pico de mayor actividad se obtuvo a las 10:00 horas del segundo día y el segundo pico más grande apareció a las 14:00 horas también del segundo día. Después de este pico, la actividad lipasa comenzó a disminuir, posteriormente un pequeño incremento fue observado entre las 02:00 y 04:00 horas.

En los organismos no alimentados apareció un primer pico a las 04:00 horas el primer día y un segundo pico a las 12:00 horas el segundo día. Moureau et al. (1984) determinó la actividad esterasa en la hemolinfa de las hembras y machos *Panaeus japonicus* en inanición y obtuvo un ciclo con tres picos. Dos fueron obtenidos a las 22:00 y a las 06:00 horas y el pico más pequeño a las 14:00 horas, indicando que los machos presentaron más variaciones

que las hembras. La posible explicación propuesta fue, por mecanismos de regulación por sexo y heterogeneidad de enzimas (isoenzimas). Para la especie *C. quadriacarinatus* no se hizo diferenciación por sexo, además de que el material de estudio fue diferente.

Vázquez-Boucard et al. (1989) estudiaron la variación de lípidos en el hepatopáncreas de *Penaeus japonicus* durante un ritmo circadiano y encontraron la mayor cantidad de lípidos totales alrededor de las 20:00 horas y un pico menor a las 12:00 horas. Molina et al. (2000), reportaron una gran actividad lipasa a las 14:00 horas en *Litopenaeus vannamei*, independientemente del horario de alimentación. Para nuestro caso, durante el muestreo de 48 horas no se pudo definir un patrón de actividad lipasa porque no hubo repetición en el comportamiento de esta actividad. El comportamiento de la actividad lipasa en ambas condiciones experimentales fue muy similar sin considerar los valores obtenidos de las 06:00 a las 10:00 horas. Se observaron valores mayores de actividad en los organismos alimentados; sin embargo, el comportamiento fue similar a los organismos no alimentados. Por los resultados obtenidos, se puede decir que el estímulo alimenticio provoca una mayor actividad lipolítica, pero con respuesta similar al comportamiento mostrado por los animales en inanición.

8.5.3 Actividad proteasa.

En los animales alimentados se obtuvo un pico máximo de actividad a las 02:00 horas el primer día, pero no se repite en el segundo día. Para las demás horas de muestreo se observaron fluctuaciones de la actividad sin ningún patrón definido. Se observaron dos picos de máxima actividad proteolítica en los animales en inanición. El primer pico fue observado entre 20:00 y 22:00 horas el primer día y entre 22:00 y 24:00 horas el segundo

día. No se obtuvieron diferencias significativas en las actividades debido a la gran dispersión de datos registrados (no mostrados en las gráficas).

Van Wormhoudt (1980) en *Palaemon serratus* reportó dos picos de actividad proteasa a las 16:00 y a las 04:00 horas. Rodríguez et al. (1976) reportaron un ciclo bifásico de actividad proteasa (23:00 y 21:00 horas) en *Palaemon serratus*. González et al. (1995) reportaron un ciclo bifásico alrededor de doce horas para la actividad proteolítica total y un pico de actividad tipo quimotripsina en *Penaeus notialis*. Mientras que en *Penaeus schmitti* la actividad quimotripsina mostró un comportamiento bifásico (10:00 y 22:00 horas), las proteasas generales mostraron solamente un pico a las 22:00 horas. El trabajo fue realizado con animales alimentados y en inanición. *P. schmitti* mostró una respuesta entre cuatro y seis horas después de la alimentación, por otro lado *P. notialis* mostró una respuesta siete horas y media después de la alimentación. Los trabajos anteriores están referidos principalmente para peneidos porque no se ha reportado la actividad enzimática digestiva en acociles. Solo se tiene un reporte para *Astacus astacus*.

Cherax quadricarinatus mostró un incremento de la actividad proteasa cinco horas después de proporcionarle alimento en ambos días. Sin embargo, se presentó un valor aún más alto a las 02:00 horas que fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) del resto de los valores obtenidos, pero este valor no se repitió durante todo el muestreo. Los juveniles de esta especie no mostraron un patrón definido de actividad proteolítica cuando los organismos eran alimentados. Mackeviciene (1983) reportó las variaciones circadianas de la actividad proteolítica en *Astacus astacus* y no encontró un patrón definido para esta especie. El autor argumentó que el incremento del proceso metabólico en crustáceos decápodos es causado por el estímulo luminoso. Sin embargo, este autor no menciona nada respecto a la condición de muda de los organismos analizados.

Los animales en inanición mostraron un primer pico entre las 20:00 y 22:00 horas el primer día. El segundo se presentó entre las 22:00 y 24:00 horas, estos valores no fueron diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).

González et al. (1995a) reportaron que la frecuencia de alimentación afectó la actividad proteolítica en *Penaeus schmitti*. Cuando los organismos eran alimentados una vez, solamente un pico de actividad era observado y cuando eran alimentados dos veces, se observaban dos picos de actividad. En los organismos no alimentados, dos picos de actividad se observaron (10:00 y 18:00 horas), pero estos valores no fueron diferentes estadísticamente.

En este trabajo los juveniles de *Cherax* fueron alimentados una vez al día y sólo se observó un pico máximo de actividad durante las 48 horas de muestreo. Se observaron otros picos más pequeños que no mostraron diferencias estadísticas.

Para el caso de los animales que no fueron alimentados, se observaron varios picos de actividad; sin embargo, podemos decir que se observó un pico máximo entre las 20:00 y 24:00 horas para ambos días, al parecer durante estas horas se presentó una mayor actividad proteolítica. Comparando ambas condiciones experimentales, podemos decir que el estímulo alimenticio sí afecta la actividad enzimática en cuando a un retraso o adelanto, de la respuesta enzimática, es decir, el alimento no causó un aumento de actividad proteolítica, ya que en los organismos no alimentados se presentaron picos muy cercanos y no diferentes estadísticamente de los obtenidos en los organismos alimentados.

Varios trabajos han tomado en consideración la frecuencia de alimentación para obtener mejor crecimiento y factor de conversión alimenticia. Galindo et al. (1996) reportaron que una alta frecuencia de alimentación produjo mejor crecimiento en juveniles de *Penaeus schmitti*. En contraste, Velasco et al. (1999) reportaron que la frecuencia

alimenticia o cambios en la tasa de alimentación no mejoró significativamente la sobrevivencia o crecimiento en *Litopenaeus vannamei*.

El comportamiento alimenticio también ha sido analizado para explicar la relación entre factores internos y externos a los organismos. Reymond y Lagardère (1990) realizaron un análisis estomacal en *Penaeus japonicus* e indicaron que la actividad alimenticia fue mayor durante la noche, pero no encontraron relación con las variaciones de luz. Los relojes biológicos están regidos por zeitgebers (dadores de tiempo) externos los cuales varían de acuerdo a las especies, dentro de las especies y al estado fisiológico individual. Sin embargo, algunas veces los resultados contradictorios sugieren que estos mecanismos pueden ser inhibidos o disparados. Castañon-Cervantes et al. (1995) encontraron que un ciclo luz-oscuridad (12 horas) produjo mejor desarrollo gonadal que otros periodos de iluminación en *Procambarus clarkii*. Por otro lado, Cheng y Cheng (2002) encontraron que una alimentación mayor del 0.5% del peso del cuerpo no afectó la cantidad de hemocitos que tiene relación con la respuesta inmune en crustáceos; sin embargo, los cambios ambientales modificaron la respuesta.

Cortés et al. (2002) reportaron que una frecuencia alimenticia de cuatro veces al día produjo mejores resultados de crecimiento que frecuencias menores, para juveniles de *Cherax quadricarinatus*. Por otro lado Loya-Javellana et al. (1995), en un estudio con *C. quadricarinatus* reportaron que la producción fecal y la evacuación no fueron afectados por la frecuencia de alimentación y que esta especie es potencialmente capaz de regular su procesos digestivo de acuerdo a la disponibilidad de alimento. Esto podría explicar el comportamiento en el consumo del alimento, que de acuerdo con Jones (1990a) se establece que *C. quadricarinatus* es un alimentador oportunista intermitente. Si bien este comportamiento no queda establecido en el presenta trabajo si puede observarse que este

organismo bajo la condiciones experimentales empleadas, presenta actividad enzimática digestiva predominantemente en la oscuridad y dado que no se obtuvieron patrones bien definidos de actividad enzimática y no se mostraron diferencias estadísticas marcadas en el consumo el organismo como mientras disponga de alimento.

En general, las diferentes especies de acociles están consideradas como omnívoras con una gran actividad al anochecer o con periodos de alimentación y descanso a lo largo del día. Varios factores pueden ser mencionados para explicar la variación en los resultados reportados por diferentes autores, entre estos se puede mencionar las condiciones experimentales, la condición fisiológica de los animales (estadio de muda, sexo, edad), inanición, estación anual, horas de muestreo y otros factores que pueden afectar la respuesta enzimática.

No obstante, aunque obvios, los aspectos genéticos no han sido considerados en ningún caso. Werner (2002), en una revisión del ritmo circadiano tomando como modelo a la especie *Chlamydomona reinhardtii*, consideró los aspectos de regulación transcripcional de los genes que controlan los relojes circadianos y su significado adaptativo. Estos aspectos no han sido considerados aún en los crustáceos. El tomar en cuenta este aspecto nos daría elementos para entender y manejar los ritmos circadianos, además saber como afecta el comportamiento alimentario y la producción de enzimas digestivas en especies de importancia comercial.

Por los resultados obtenidos en este experimento, podemos decir que *Cherax quadricarinatus* no presentó un patrón bien definido de actividades enzimáticas como se ha descrito para otras especies de crustáceos marinos, al parecer esta especie presenta un actividad permanente de las enzimas analizadas durante todo el día. Sin embargo, presentó picos mejor definidos de actividad amilasa entre los animales alimentados y los no

alimentados, por lo que estos picos de actividad amilasa refuerzan la observación de comportamiento activo al amanecer y durante la noche para esta especie. El comportamiento descrito aquí puede ayudar a explicar porque esta especie ha estado recibiendo la atención para desarrollar y mejorar su cultivo.

9. CONCLUSIONES

Cuando a los juveniles de esta especie se sometieron a diferentes ingredientes en los alimentos, no se encontró ninguna correlación entre la actividad enzimática digestiva y el crecimiento de los juveniles de *C. quadricarinatus*. Esta especie mostró una preferencia por los ingredientes de origen vegetal predominantemente los que fueron ricos en almidones. (sorgo y trigo). La respuesta enzimática por parte de las amilasas se evidenció mejor cuando se relacionó con alimentos ricos en carbohidratos. Las otras actividades aunque se manifestaron presentaron mayor variación ante los diferentes tratamientos.

Altos niveles de proteína en los alimentos inhibe la actividad proteolítica total, por ello la inclusión de altos niveles de este nutriente no favorece la actividad proteasa general. Se encontró que a un nivel de proteína en el alimento alrededor del 30%, la actividad proteolítica general fue mayor. Concordando con los resultados reportados para otras especies de decápodos.

La hidrólisis de lípidos en el hepatopáncreas de los juveniles se realiza por la presencia de varias esterasas y al menos una lipasa que se encontró en este tejido. Contrastando con los resultados encontrados por otros autores en los que no se evidenció actividad lipasa

Cherax quadricarinatus no presentó un patrón bien definido de actividades enzimáticas en relación al ciclo circadiano, como se ha descrito para otras especies de crustáceos marinos, al parecer esta especie presenta una actividad permanente de las enzimas analizadas durante todo el día. Sin embargo presentaron picos mejor definidos de actividad amilasa, por lo que estos picos de actividad amilasa refuerzan la observación de comportamiento durante la noche para esta especie.

10. SUGERENCIAS

- Utilización de alimentos purificados con ingredientes de origen animal únicamente y alimentos con ingredientes de origen vegetal para obtener la respuesta enzimática por la naturaleza del ingrediente.
- Realizar estudios sobre el metabolismo de carbohidratos en esta especie.
- Realizar bioensayos comparativos de actividad enzimática digestiva en organismos que procedan de la misma madre para reducir en lo posible la variabilidad genética.
- El uso potencial de diferentes sustratos lipídicos para la suplementación de alimentos en acuicultura.
- Se proponen nuevos estudios sobre algunos cofactores en la activación o inhibición de la actividad lipolítica en crustáceos.
- Se propone una metodología para analizar la actividad lipasa en geles de poliacrilamida.
- Se propone realizar ensayos de hidrólisis sobre lípidos insaturados.
- Como estudio complementario realizar trabajos de biología molecular para localizar péptidos reguladores y mensajeros de la síntesis enzimática digestiva.

11. REFERENCIAS.

- Ackefors, H. Castell, J.D. Boston, L:D. Rätty, P. and Svensson, M. 1992. Standard experimental diets for crustacean nutrition research. II. Growth and survival of juvenile crayfish *Astacus astacus* (Linné) fed diets containing various amounts of protein, carbohydrate and lipid. *Aquaculture*, 104, 341-356.
- Albro, W. P., Hall, D. R., Corbett, T. J., Schroeder, J., 1985. Activation of nonspecific lipase (EC 3.1.1.) by bile salts. *Biochim. Biophys. Act.* 835, 477-490.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis of the Association of Official. *Analytical Chemist.* Vol. I, 16th ed. Washington, D. C., USA. 1234 pp.
- Baillet, C., Cuzon, G., Cousin, M. and Kerleguer, C. 1997. Effect of dietary levels on growth of *Penaeus stylirostris* juveniles. *Aquaculture Nutrition* **3**, 49-53.
- Berner, L. D., Hammond, G. E., 1970. Phylogeny of lipase specificity. *Lipids.* 6, 558-562.
- Biesot, M.P. Capuzzo, J. M. 1990. Changes in digestive enzyme activities during early development of the American lobster *Hommarus americanus* Milne Edwards. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 136: 107-122.
- Biesot, M. P., Capuzzo, M. J., 1990a. Digestive protease, lipase and amylase activities in stage I larvae of the American lobster, *Homarus americanus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 95A, 47-54.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (2): 248-254.
- Brockeroff, H. Hoyle, R. J., Hwang, P. C., 1970. Digestive enzymes of the American lobster (*Homarus americanus*). *J. Fish. Res. Bd. Canada.* 27, 1357-1370.

- Brun, L. G., Wojtowicz, B. 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.* 53B, 387-391.
- Brunson, J.F. Romaine, R.P. and Reigh, R.C. 1997. Apparent digestibility of ingredients in diets for white shrimp *Penaeus setiferus* L. *Aquaculture Nutrition*, **3**, 9-16.
- Brusca, C. R. & Brusca, J. G. 1990. Phylum arthropoda: The crustaceans. pp. 595-666 *In*: *Invertebrates*,. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Mass. USA.
- Cahu, C.L. and Zambonino Infante, J.L. 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A, 213-222.
- Campaña. T. Alfredo. 2001. Digestibilidad de dietas e ingredientes para juveniles y preadultos de la langosta australiana de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Redclaw). Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S. México. 58 pp.
- Carrillo, O. González, R y Suárez, A. 1997. Ritmo circadiano de las proteasas generales en adultos de *Penaeus schmitti*. I. Efecto del horario de alimentación. *Revista de Investigaciones Marinas* 18: 162-168.
- Carrillo, F. O. and González, R. 1998. Control de la digestión en camarones. pp.138-148. *En: Avances en Nutrición Acuicola IV*. (Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. eds). *Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola* La Paz, B.C.S., México.
- Castañón-Cervantes, O., Lugo, C., Aguilar, M., González-Moran, G. and Fanjul-Moles, M. L. 1995. Photoperiodic induction on the rate and gonads maturation in the crayfish *Procambarus clarkii* during ontogeny. *Comp. Biochem. Physiol.* 110A:2, 139-146.

- Ceccaldi, J.H. 1997. Anatomy and Physiology of the digestive system. pp. 261-272. *In*: Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture. Vol.6. (D'Abramo, R.L., Conklin, and Akiyama, D.M. eds.). World Aquaculture Society.
- Chamberlain, G. W. 1996. Investigación de frontera en nutrición acuícola *In*: Memorias del Segundo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mendoza, R., Cruz, S. E. y Ricque Eds. pp. 27-43, Monterrey, N. L. México.
- Chen, H.Y and Lin, H.F. 1992. Effects of different *Artemia* diets on the growth and digestive enzyme activities of early postlarval *Penaeus monodon*. *Asian Fisheries Science*. 5: 73-81.
- Chen, W. and Chen, J.C. 2002. Effects of environmental factors on the immune responses of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and others decapods crustaceans. *J. Fish. Soc. Taiwan*. 29: 1-19.
- Civera, R. and Guillaume, J. 1989. Effect of sodium phytate on growth and tissue mineralization of *Penaeus japonicus* and *Penaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 77: 145-156.
- Cortés, J. E. Villarreal, C. H. y Rendón, R.M. 2002. Efecto de la frecuencia alimenticia en el crecimiento y sobrevivencia de juveniles de langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Decapoda:Parastacidae). I Congreso Iberoamericano virtual de Acuicultura (<http://www.civa2002>):882-890.
- Cortés-Jacinto, E. Villareal-Colmenares, H. Civera-Cerecedo, R. & Martínez-Córdoba, R. 2003. Effect of dietary protein level on growth and survival juvenile freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Aquaculture Nutrition*. 9, 207-213.

- Cousin, M, Cuzon, G, Guillaume, J. and AQUACOP. 1996. Digestibility of starch in *Penaeus vannamei*: in vivo and in vitro study on eight samples of various origin. *Aquaculture*, 140, 361-372.
- Cruz-Suárez, L.E., Denis Ricque and AQUACOP. 1992. Effect of squid meal on growth of *Penaeus monodon* juveniles reared in pond pens and tanks. *Aquaculture*, 106, 293-299.
- Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Pinal-Mansilla, Wesche-Ebelling, P. 1994. Effect of different starch sources on the growth of *Penaeus vannamei*: economical impact. *Aquaculture*. 123, 349-360.
- Cruz-Ricque, L.E., Guillaume, J., Cuzon, G. and AQUACOP. 1987. Squid effect on growth of four penaeid shrimp. *J. World Aquaculture Soc.* 18: 209-217.
- D'Abramo, L. and Robinson, E.H. 1989. Nutrition of crayfish. Reprinted from *CRC Critical Reviews in Aquatic Sciences*. Vol 1, 711-728.
- D' Abramo, L. & Sheen, S. D. J. 1996. Requerimientos nutricionales, formulación de dietas y prácticas alimenticias para el cultivo intensivo del langostino de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii*. pp. 81-101. En: Memorias del segundo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mendoza, R., Cruz, S.E. y Ricque, D. eds. , Monterrey, N. L., México.
- Davis, D.A. and Arnold, C.R. 1993. Evaluation of five carbohydrate sources for *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 114, 285-292.
- Díaz-Granda, E. 1997. Horarios de alimentación del camarón *Penaeus schmitti* en condiciones de cultivo semi-intensivo. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Marinas, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba. 75 pp.

- Divakaran, S., Ostrowski, C. A. 1990. Enzymes present in pancreatic extracts of the dolphin *Coryphaena hippurus*. *J. World Aquacult. Soc.* 1, 35-40.
- Fang, Lee S and Lee, Bon N. 1992. Ontogenic change of digestive enzymes in *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B. No. 4 1033-1037.
- Figueiredo M.S.R.B. Krickler, J.A. and Anderson, A.J. 2001. Digestive enzyme activities in the alimentary tract of redclaw, *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: PARASTACIDAE). *Journal of Crustacean Biology*, 21(2), 334-344.
- Fotedar, R., Knott, B. & Evans, L.H. 1999. Effect of a diet supplemented with cod liver oil and sunflower oil on growth, survival and condition indices of juvenile *Cherax tenuimanus* (Smith). *Freshwater Crayfish* 12: 478-493.
- Galindo, J., Jaime, B. y Alvarez, J.S. 1996. Influencia de la tasa de alimentación sobre el engorde del camarón blanco *Penaeus schmitti*. *Rev. Invest. Mar.* 17(2-3): 235-242.
- Galgani, M.L. Benjamin Y, Ceccaldi, H.J. 1984. Identification of digestive proteinases of *Penaeus kerathurus* (Forsk.) : a comparison with *Penaeus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 78B: 355-361
- Galgani, F., Ceccaldi, H.J. et AQUACOP. 1988. Effet de l'incorporation de farines de soja et de poisson dans l'aliment sur la croissance et les enzymes digestives de *Penaeus vannamei*. *Aquat. Living Resour.* 1, 181-187.
- García-Carreño, F. 1992. The digestive proteases of langostilla (*Pleuroncodes planipes*, Decapoda): their partial characterization, and the effect of feed on their composition. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B, 575-578.
- García-Carreño, F. and Haard, N.H. 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pascifastacus astacus*) extracts. *J. Food Biochem.* 17: 97-113.

- García-Carreño, F. Hernández-Cortés, M.P. and Haard N.F. 1994. Enzymes with peptidase activity of freshwater and a marine decapod. *J. Agricu. and Food Chemistry*. 42(7): 1456-1461.
- García-Carreño, F. L. and Navarrete del Toro, M. A. 1997. Classification of proteases without tears. *Biochemical Education*, 25(3).
- Gibson, R., and Barker, P.L. 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 17, 285-346.
- Glass, H.J. and Stark, J.R. 1995. Carbohydrate digestion in the european lobster *Homarus gammarus* (L.). *Journal of Crustacean Biology*, 15(3), 424-433.
- González, R., Gómez, M. and Carrillo, O. 1995. Variaciones cronobiológicas en la actividad de las principales enzimas proteolíticas de *Penaeus schmitti* y *Penaeus notialis*. *Revista de Investigaciones Marinas*, 16 (3), 177-183.
- González, R. Gómez, M. y Carrillo, O. 1995a. Ritmo circadiano de las proteasas generales en adultos de *Penaeus schmitti*. I. Efecto del horario de alimentación. *Rev. Invest. Mar.* 16 (4),162-168.
- González-Agraz, L.A. 2000. Estudio comparativo del perfil de algunas enzimas digestivas importantes en *Penaeus stylirostris*, *Penaeus californiensis*, *Procambarus clarkii* y *Cherax quadricarinatus*. Tesis de Maestria. CICESE, México, pp. 74
- Hobbs, H. Horton, Jr. 1988. Crayfish distribution, adaptative radiation and evolution. pp. 52-82. *In: Freshwater Crayfish, Biology, Management and Exploitation*. D. M. Holdich and R.S. Lowery, eds.. The University Press, Cambridge, Great Britain.
- Holdich, D.M. and Lowery, R.S. 1988. Crayfish an Introduction. pp.1-7. *In: Freshwater Crayfish, Biology, Management and Exploitation*. D. M. Holdich and R.S. Lowery, eds. The University Press, Cambridge, Great Britain.

- Hoyle, J.R., 1973. Digestive enzyme secretion after dietary variation in the American lobster (*Homarus americanus*). *J. Fish. Res. Board Can.* 30, 1647-1653.
- Huner, J. V. 1995. An overview of the status of freshwater crawfish culture. *Journal of Shellfish Research* 14(2): 539-543.
- Iijima, N., Tanaka, S., and Ota, Y. 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.* 18: 59-69.
- Johnston D.J. and Yellowlees, D. 1998. Relationships between dietary preferences and digestive enzyme complement of the slipper lobster *Thenus orientalis* (Decapoda: SCYLLARIDAE). *Journal of Crustacean Biology*, 18(4), 656-665.
- Jones, C. M. 1990. Effect of temperature on growth and survival of the tropical freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Von Martens) (Decapoda, Parastacidae pp. 391-398. In: Romaine, R. P. (Ed.), Papers from the *Eighth International Symposium on Astacology*. Baton Rouge, LA, 22-26 April 1990.
- Jones, C.M., 1990a. The biology and aquaculture potential of the tropical Freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*. Fisheries Branch, Queensland Department of Primary Industries, Brisbane, 109 pp.
- Jones, C.M. 1990b. Salinity tolerance of the tropical freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Von Martens) (Decapoda, Parastacidae). pp. 399-409. In: Romaine, R. P. (Ed.), Papers from the *Eighth International Symposium on Astacology*. Baton Rouge, LA, 22-26 April 1990.
- Jones, C.M. 1995. Evaluation of six diets fed to redclaw *Cherax quadricarinatus* (von Martens), held in pond enclosures. *Freshwater Crayfish* 10: 469-479.

- Jones, P.L., De Silva, S.S. and Mitchell, B.D. 1996. Effect of dietary protein content on growth performance, feed utilization and carcass composition in the Australian freshwater crayfish, *Cherax albidus* Clark and *Cherax destructor* Clark (Decapoda, Parastacidae). *Aquaculture Nutrition* 2; 141-150.
- Jover, M., Fernández-Carmona, J. Del Río, M.C. and Soler, M. 1999. Effect of feeding cooked-extruded diets, containing different levels of protein, lipid and carbohydrate on growth of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Aquaculture*. 178, 127-137.
- Keefe, A. and Rouse, D. 1999. Protein requirements for juvenile Australian red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Freshwater Crayfish* 12: 471-477.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
- Lawrence, C. and Jones, C. 2002. *Cherax*. In: Biology of freshwater crayfish. (David, M. Holdich ed.). pp. 635-669. Blackwell Science. U.K.
- Lee, P.G., Smith, L.L. and Lawrence, A.L. 1984. Digestive proteases of *Penaeus vannamei* Boone: Relationship between enzyme activity, size and diet. *Aquaculture* 42. 225-239.
- Lee, P.G., and 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.
- Lee, S. M., Cho, S. H. and Kim, K. D. 2000. Effect of dietary protein and energy levels on growth and body composition of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. World Aquacult. Soc.* 30: 306-315.
- Le Moullac, G. Van Wormhoudt, A. and AQUACOP. 1994. Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fibre levels and influence of protein and

- carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapoda). *Aquat. Living Resour.* 7: 203-210.
- Le Vay, L., Rodríguez, A. Kamarudin, M.S. and Jones, D.A. 1993. Influence of live and artificial diets on tissue composition and trypsin activity in *Penaeus japonicus* larvae. *Aquaculture*, 118, 287-297.
- Le Moullac, G., Klein B., Sellos, D. and Van Wormhoudt, A. 1996. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and α -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 208, 107-125.
- López-López, S. Nolasco, H. and Vega-Villasante, F. 2003. Characterization of digestive gland esterase-lipase activity of juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Comp. Biochem. and Physiol. Part. B* 135, 337-347.
- Lovett D.L. and Felder, D.L. 1990. Ontogenic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Biol. Bull.* 178: 144-159.
- Loya-Javellana, G.N., Fielder, D.R., and Thorne, M.J. 1995. Foregut evacuation, return of appetite and gastric secretion in the tropical freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*, *Aquaculture*, 134: 295-306.
- Maugle, P.D., Deshimaru, O., Catayama, T., and Simpson, K.L. 1982. Effect of short necked clam diets on shrimp growth and digestive enzyme activities. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 48, 1759-1764.
- Mackeviciene, G. 1983. Circadian variations of proteolytic activity in the digestive system of the crayfish *Astacus astacus* L. *Freshwater Crayfish* 4, 459-463. San Diego, Calif.

- Mackeviciene, G. 1999. A comparative study of physiological and biochemical indices of native european and alien species of crayfish in Lithuania. *Freshwater Crayfish*. 12: 205-220.
- Medley, B. P., Jones, M.C. and Avault, J. W. Jr. 1994. A global perspective of the culture of Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*: production, economics and marketing. *World Aquaculture* 25 (4).
- Molina, C., Cedena, E. y Orellana, F. 2000. Alimentación del camarón en relación a la actividad enzimática digestiva como una respuesta natural al ritmo circadiano y el ciclo de muda. pp. 358-379. En. Cruz-Suárez, L.E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V *Symposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Noviembre 19-22, Mérida, Yucatán, México.
- Moreau, C. E., Boucard, C. G., et Ceccaldi, H.J. 1984. Variations circadiennes des activités estérases de l'hémolymphe de *Penaeus japonicus*. *Biochemical Systematics and Ecology* 12:1, 103-107.
- Moreau, G. Henocque, Y. Van Wormhoudt, A. Martin, B.J. et Ceccaldi, H.J. 1985. Adaptations biochemiques a des aliments compose et croissance chez le homard juvenile, *Homarus gammarus* L.: resultats preliminaires. *Aquaculture*, 48, 313-329.
- Nolasco-Soria, H. y F., Vega-Villasante. 1998. Actividad enzimática digestiva, ritmos circadianos y su relación con la alimentación del camarón pp. 149-165. En: Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del *IV Symposium Internacional de Nutrición Acuicola* (Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. eds) La Paz, B.C.S., México.

- Omondi, J.G. and Stark, J.R. 1995. Some digestive carbohydrases from the midgut gland of *Penaeus indicus* and *Penaeus vannamei* (Decapoda:Penaeidae). *Aquaculture* 134: 121-135.
- Ramana-Rao, K. V., Surendranath, P. 1991. Effect of kelthane on pH dependency of lipase in tissue of the penaeid prawn, *Metapenaeus monoceros* (Fabricius) under sublethal exposure. *Pesticide Biochem. Physiol.* 39, 205-209.
- Reigh, R.C., Braden, S.L. and Craig, R.J. 1990. Apparent digestibility coefficients for common feedstuffs in formulated diets for red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Aquaculture*, 84, 321-334.
- Reymond, H. and Legardère, J.P. 1990. Feeding rhythms and food of *Penaeus japonicus* Bate (Crustacea, Penaeidae) in salt marsh ponds: Role of halophitic entomofauna. *Aquaculture*, 84: 125-143.
- Rodriguez, D., Van Wormhoudt, A. and Le Gal, Y. 1976. Separation, properties localization and nycthemeral variations of DNase a phosphodiesterase, a RNase and an alkaline phosphorase from the hepatopancreas of *Palaemon serratus* (Crustacea Natantia) *Comp. Biochem Physiol.*, 54B:181-191.
- Roenneberg, T. and Merrow, M. 2000. "What watch?... such much" Complexity and evolution of circadian clocks. Review. *Cell Tissue Res.* 309: 3-9.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Brito, R., Chimal, M. E. y Van Wormhoudt, A. 2000. El metabolismo de los carbohidratos de *Litopenaeus setiferus*, *L. vannamei* y *L. styliostris*. pp. 340-358 En: Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V *Simposium Internacional de Nutrición Acuícola* (Cruz-Suárez, L.E. Ricque, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa. M.A. y Civera-Cerecedo, R. eds.). Mérida, Yucatán. México

- Samain, J. F., Moal, J. Y., Daniel, J.R., Le Coz and Jezequel, M. 1980. The digestive enzymes amylase and trypsin during the development of *Artemia*: effect of food conditions. pp. 239-255. In: *The Brine Shrimp Artemia, Physiology, Biochemistry, Molecular Biology*. (G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers eds.) 1980. Vol. 2., University Press, Wetteren, Belgium.
- Schick, J., Verspohl, R., Kern, H. and Scheele, G. 1984. Two distinct adaptive responses in the synthesis of exocrine pancreatic enzymes to inverse changes in protein and carbohydrate in the diet. *Am. J. Physiol.* 247 (*Gastrointest. Liver Physiol.* 10): G611-G616.
- Stauffer, C. 1989. Effect of pH on activity In: Van Nostrand Reinhold/ AVI (Ed.) *Enzyme Assay for Food Scientists*. New York.
- Tacon, G.J. and Forster, I. P. 2000. Trends and challenges to aquaculture and aquafeed development in the new millennium. pp. 1-11. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M., Civera-Cerecedo, R. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del Quinto Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Mérida, Yucatán, México.
- Tacon, A. G. and Akiyama, D. M. 1997. Feed ingredients. pp. 411-472. In: *Crustaceans nutrition. Advances in World Aquaculture Society*. D'Abramo, R. L. Conlkin, E. D. Eds. Vol 6., Louisiana. USA.
- Tietz, W. N., Shuey, F. D. 1993. Lipase in Serum—the elusive enzyme: An Overview. *Clin. Chem.* 39/5, 746-756.
- Trellu, J., Ceccaldi, H. J., 1980. Influence de la température sur quelques activités enzymatiques chez *Palaemon serratus*. *Biochem. System. Ecol.*, 8, 171-179.

- Tsvetnenko, Y. Santelices M. & Evans, L.H. 1995. Effect of dietary protein and beta-carotene on growth of marron *Cherax tenuimanus* in an intensive culture system. *Freshwater Crayfish* 10: 611-622.
- Van Wormhoudt, A., Legal, Y., and Ceccaldi H.J. 1972. Activités des amylases et des protéases digestives chez *Penaeus kerathurus*. Existence d'un rythme circadien. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 274, 1208-1211.
- Van Wormhoudt, A. 1973 Variation des protéases, des amylases et des protéines solubles au cours du développement larvaire chez *Palaemon serratus*. *Marine Biology*, 19: 245-248.
- Van Wormhoudt, A. 1980. Regulation d'activité de l' α -amylase à différentes températures d'adaptation et en fonction de l'ablation des pédoncules oculaires et du stade de mue chez *Palaemon serratus*. *Biochem. Syst. Ecol.* 8, 193-203.
- Van Wormhoudt, A. Ceccaldi, H.J. et Martin, B.J. 1980. Adaptation de la teneur en enzymes digestives de l'hepatopancreas de *Palaemon serratus* (Crustacea, Decapoda), a la composition d'aliments experimentaux. *Aquaculture* 21: 63-78.
- Vázquez-Boucard, C.G., Galois, R. et Ceccaldi, H.J. 1989. Variations circadiennes des lipides et lipoprotéines de l'hémolymphe, et des lipides de l'hepatopancréas, chez la crevette *Penaeus japonicus*. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie.* 97:87-93.
- Velasco, M. Lawrence, L. A. and Castille, F.L. 1999. Effect of variation in daily feeding frequency and ratio size on growth of shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Bonne), in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture.* 179: 141-148.

- Vega-Villasante, F., Nolasco, H. and Civera, R. 1993. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*. I. Properties of amylase activity in the digestive tract. *Comp. Biochem. Physiol.* 106, 547-550.
- Vega-Villasante, F., Nolasco, H. and Civera, R. 1995. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*. II. Properties of protease activity in the whole digestive tract. *Comp. Biochem. Physiol.* 112B, 123-129.
- Vega-Villasante, F. 1998. Estudio de la actividad enzimática digestiva del camarón café del Pacífico *Penaeus californiensis*. Tesis de Maestría.. U.N.A.M. México, pp. 110
- Versaw, W.K., Cuppett, S.L., Winters, D.D. & Williams, L.E. 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *Journal of Food Science*, 54, 1557-1558.
- Villarreal, C.H. y Pelaez, P. J. I. 1999. Biología y cultivo de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste y Acuacultivos de Santo Domingo. México, pp.
- Vogt, G., Stöcher, W., Storch, V. & Zwiiling, R. 1989. Biosynthesis of *Astacus* protease, a digestive enzyme from crayfish. *Histochemistry*, 91, 373-381.
- Vogt, G. 1994. Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreatic cells of *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda). *Zoomorphology*, 114. 83-101.
- Vogt, G. 2002. Functional anatomy. pp. 53-151. In: Biology of freshwater crayfish. (David, M. Holdich ed.). Blackwell Science. U.K.
- Werner, R. 2002. *Chlamydomonas reinhardtii* as an unicellular model for circadian rhythm analysis. Review. *Chronobiology International*. 19(2). 325-343.

Xue, X., Mather, A., Anderson, P., Richardson, N., Anderson, A., Xue, G.P., Mether, P.B.
1999. Characterisation of cellulase activity in the digestive system of the redclaw
crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Aquaculture*. 180: 373-386.