



00344 4
29.
Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE
ENZIMAS DIGESTIVAS DEL CAMARON
BLANCO *Penaeus setiferus* EN
CONDICIONES CONTROLADAS
DE ALIMENTACION.

T E S I S
Que para Obtener el Grado Académico de
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA DE SISTEMAS Y RECURSOS
ACUATICOS).

P r e s e n t a
**BIOLOGA MARIA DEL CARMEN
GUZMAN MARTINEZ**

Director de Tesis: Dr. Alfonso M. Torre Blanco

MEXICO, D. F.

1987

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado
en el Laboratorio de bioquímica
de la Facultad de Ciencias, de la
Universidad Nacional Autónoma de México
bajo la dirección del Dr. Alfonso M. Torre Blanco.

A mis Padres

A mis Hermanos

y

A mis sobrinas

(Gaby y Mari Fer)

Agradecimientos

Este trabajo ha sido el producto del apoyo y de la confianza que me brindaron las personas involucradas en este, así que quiero brindar mi reconocimiento a:

A mi director de tesis el Dr. Alfonso M. Torre Blanco por su enseñanzas, su interés en la realización de la tesis, apoyo, confianza y por impulsarme en el área bioquímica y enriquecer mi formación académica.

Al Dr. Carlos Rosas Vázquez y a la Dra. Gabriela Gaxiola Cortes por su apoyo, confianza y su interés al impulsarme a seguir adelante, y por sus valiosos consejos durante todos mis estudios y para mejorar el trabajo escrito.

A los sinodales: Dr. René de Jesús Cardenas Vázquez, Dra. Luisa Alba Lois, Dra. Alejandra Mainero del Paso y M. en C. Adolfo Sánchez, que aportaron muchas e importantes sugerencias para mejorar el trabajo escrito.

A la Dra. Annie Pardo por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio: Remedios, Laura Alicia, Angélica, María Isabel, Daria y Jorge.

Al todos los integrantes del Laboratorio de Ecofisiología por su apoyo en especial a la Dra. Cecilia Vanegas, Dra. Guillermina Alcaráz Z. y al Biol. Fabián Contreras.

A la Biol. Ana Isabel Bieler Antolin por las diapositivas que tomó para la presentación del trabajo oral.

A la Biol. Perla Estañol Pérez por su amistad.

A mi nueva amiga y querida Maestra Dra. Tere Reyna por sus consejos, su apoyo, y confianza para no decaer y quien me impulsó a seguir adelante.

A mis queridas amigas la Hidrobiol. Ma. del Socorro Cardenas Villanueva y la M. en Biol. Exp. Patricia Ramirez porque siempre han estado en las buenas y en las malas.

A Consuelo López Rivas por su amistad y animarme a seguir luchando.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, por la beca otorgada para realizar mis estudios.

A todos los maestros de mi escuela UAM-I que me impulsaron a seguir adelante y no decaer nunca.

**A TODOS USTEDES,
MIL GRACIAS.**

RESUMEN

En el presente estudio se midió la actividad de enzimas digestivas de postlarvas 40 (PL₄₀) del camarón blanco *Penaeus setiferus* crecido en condiciones controladas de alimentación, así como la actividad en postlarvas, juveniles y adultos del medio natural. Las postlarvas de condiciones controladas se alimentaron durante 30 días, con dietas purificadas, se empleo el diseño factorial con 5 niveles de proteína (20, 30, 40, 50 y 60 %) y 2 niveles de energía (3 y 4 kcal/g). La energía dietética se ajusto mediante la variación de los carbohidratos (Experimento 1) o de los lípidos (Experimento 2). Una vez terminadas las pruebas de alimentación, las postlarvas se homogenizaron para obtener los extractos enzimáticos los cuales se utilizaron para determinar el contenido de proteína y para evaluar la actividad de las enzimas digestivas (proteinasas totales, quimotripsina, tripsina y α -amilasa). Los resultados muestran una influencia directa del alimento sobre la actividad de las enzimas digestivas al variar los niveles de proteína total. En el experimento 1 la actividad (proteinasas totales, tripsina y α -amilasa) cuantitativamente mayor se observo con 40 % de proteína (3 kcal/g). La actividad de quimotripsina fue inferior a los anteriores, pero fue la más elevada en las dietas de baja energía. En la dieta de alta energía (4 kcal/g) se observo la mayor actividad con 30 % de proteína en todas las actividades evaluadas. En el experimento 2 no se observo una dieta con la cual coincidan las actividades enzimáticas más altas, como en el caso del experimento 1; sin embargo si hay un efecto al variar el contenido de proteína y la energía. Se observo que la mejor tasa instantánea de crecimiento, la más alta supervivencia y el mejor IRB se obtuvieron con las postlarvas que se alimentaron con 40 % de proteína, 3 kcal/g y 11.47 % de carbohidratos. Los resultados indican una alta correlación entre la actividad enzimática, sustrato metabólico y crecimiento, lo cual permite continuar el requerimiento de las proteínas y la energía total de las postlarvas para el experimento 1. En el experimento 2 los resultados de la respuesta nutricional y fisiológica no mostraron una correlación entre la actividad enzimática, sustrato metabólico y crecimiento. Al comparar ambos experimentos se observo que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) principalmente con 40 % de proteína (3 kcal/g) y con 30 % de proteína (4 kcal/g) para el experimento 1, los otros resultados no muestran diferencias significativas. En cuanto a la actividad de postlarvas, juveniles y adultos del medio natural se observo un aumento significativo conforme el camarón paso de postlarva a adulto. Se compararon los resultados de las postlarvas de condiciones controladas (mejores tratamientos), con las del medio natural observando diferencias significativas entre la actividad enzimática evaluada. El resultado cuantitativamente mayor es la actividad de la α -amilasa en las postlarvas del medio natural.

Evaluation of the activity of digestive enzymes in the white shrimp *Penaeus setiferus*
under controlled conditions of feeding.

Abstract

In this study we measured the activity of digestive enzymes in the white shrimp *Penaeus setiferus* under controlled conditions of feeding and in postlarvae, juveniles and adults from their natural environment. The postlarvae under controlled conditions were fed for 30 days with purified diets. A factorial design was used with 5 levels of protein content (20, 30, 40, 50 and 60 %) and 2 energy levels (3 and 4 kcal/g). The dietary energy was adjusted by varying the amount of carbohydrates (Experiment 1) or lipids (Experiment 2). After finishing the feeding experiments, the postlarvae were homogenized and a soluble extract was obtained to evaluate total proteolytic activity, chymotrypsin, trypsin and α -amylase. The results showed a direct effect of the diet on the activity of the digestive enzymes when the protein levels varied. In experiment 1 the highest activities were observed at 40 % protein (3 kcal/g), chymotrypsin activity was lower but, it showed the highest activity at diets with low energy. In the diets with high energy levels (4 kcal/g) the highest activity was observed at 30 % protein for all the activities evaluated. In experiment 2 the highest activities did not coincide with any specific diet; however there is an effect when the protein content and the energy levels vary. The best instant growth rate and IRB, as well as the highest survivorship were obtained with postlarvae feed with 40 % protein, 3 kcal/g and 11.47 % of carbohydrates. The results show a high correlation among the enzymatic activity, metabolic substrate and growth, this confirms the dietary protein requirement and total energy of the postlarvae in experiment 1. In experiment 2 the results of the nutritional and physiological response did not show a correlation among the enzymatic activity, metabolic substrate and growth. However, there are significant differences ($P < 0.05$) between experiments 1 and 2 particularly at 40 % protein (3 kcal/g) and at 30 % protein (4 kcal/g) for experiment 1, the rest of the results did not show significant differences. The digestive activities of postlarvae, juveniles and adults from the natural environment, had a significant increase with age. When comparing the results of the postlarvae in controlled conditions (best treatments) with those of the environment, significant differences were observed on the enzymatic activities evaluated. The α -amylase activity in postlarvae from the natural environment was several orders of magnitude higher than in artificially fed postlarvae.

INDICE

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	2
ANTECEDENTES	3
MATERIALES Y METODOS	19
OBTENCION DE LAS POSTLARVAS	
A) Condiciones controladas	19
B) Medio natural	19
PREPARACION DEL EXTRACTO ENZIMATICO	23
DETERMINACION DE PROTEINAS	23
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA	23
Proteinasas totales	24
Quimotripsina	24
Tripsina	25
α -Amilasa	25
METODOS DE ANALISIS DE DATOS	26
RESULTADOS	27
CONTENIDO DE PROTEINA	
A) Condiciones controladas	27
Experimento 1	
Experimento 2	
B) Medio natural	27
PROTEINASAS TOTALES	
A) Condiciones controladas	
Experimento 1	27
Experimento 2	34
B) Medio natural	34
QUIMOTRIPSINA	
A) Condiciones controladas	
Experimento 1	34
Experimento 2	38
B) Medio natural	38
TRIPSINA	
A) Condiciones controladas	
Experimento 1	42
Experimento 2	42
B) Medio natural	42
α -AMILASA	
A) Condiciones controladas	
Experimento 1	46
Experimento 2	46
B) Medio natural	50
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	58
BIBLIOGRAFIA	59

INTRODUCCION

Entre los crustáceos de importancia comercial que han sido cultivados con mayor intensidad, se encuentran los camarones peneidos. En México y en muchos países el camarón constituye uno de los mayores recursos pesqueros por su volumen de captura y su alto valor en el mercado nacional e internacional (Sáenz, 1987). Por lo tanto, la camaronicultura se ha constituido como una industria relevante en respuesta al incremento de la demanda de camarón en el mundo (Martínez, 1993). El desarrollo de la camaronicultura se ha fortalecido por el conocimiento cada vez más profundo de la biología de las especies sujetas a cultivo. Un aspecto esencial es el conocimiento básico de los requerimientos nutricionales de los animales (Tacon, 1990). Como parte de los estudios, se han realizado análisis con el objeto de buscar fuentes proteicas adecuadas para la cría intensiva del camarón (Forrellat, *et al.*, 1988). Para ello ha sido necesario desarrollar técnicas que permitan evaluar la calidad proteica del alimento en condiciones controladas y así obtener respuestas biológicas apropiadas, comparando las diferencias con poblaciones no controladas. La mayor parte de los estudios nutricionales realizados en los camarones se han dirigido a la prueba de diferentes tipos de dietas, mientras que los estudios de los cambios ontogénicos relacionados con las actividades digestivas y el crecimiento, las investigaciones de bioenergética y fisiología digestiva son menos numerosas (Lee y Lawrence, 1984, 1985).

Las investigaciones actuales de los procesos digestivos tienen como objetivos principales conocer el potencial digestivo y la eficiencia de este proceso, es decir la habilidad que tiene un organismo para poder hidrolizar los diferentes nutrientes (proteínas, lípidos, fibras, etc.) contenidos en la dieta y la capacidad que tienen para ser absorbidos y asimilados por el organismo. Estos factores pueden ser evaluados por medio del análisis de la actividad de las enzimas digestivas con el objeto de formular dietas óptimas con base en el entendimiento de la capacidad fisiológica del organismo (Lee y Lawrence, 1984).

Las enzimas digestivas tienen como principal función hidrolizar las proteínas, péptidos, carbohidratos y lípidos del alimento, por lo tanto su análisis es una herramienta útil en los estudios de nutrición. La acción de las actividades hidrolíticas en el aparato digestivo de un animal depende de la composición y forma del alimento y el grado de trituración de éste, además la descomposición química del alimento determina el tipo de nutriente disponible para la absorción (Lee y Lawrence, 1984). Por lo tanto la

identificación de las enzimas digestivas y el conocimiento de sus cambios y su modo de acción, son útiles para la formulación de dietas adaptadas a la fisiología de las especies estudiadas, así como el conocimiento de sus características bioquímicas constituye un aspecto básico (González *et al.*, 1995).

El presente estudio tuvo como principal objetivo evaluar diversas actividades enzimáticas hidrolíticas del aparato digestivo del camarón blanco del Golfo de México *Penaeus setiferus*, en relación a la dieta, natural y artificial. Este objetivo se pretende cumplir mediante los siguientes objetivos particulares:

- 1.-Determinar el efecto de los carbohidratos de la dieta sobre la actividad de diversas enzimas hidrolíticas de postlarvas (PL₄₀) de *Penaeus setiferus*.
- 2.-Determinar el efecto de los lípidos de la dieta sobre la actividad de diversas enzimas hidrolíticas de postlarvas (PL₄₀) de *Penaeus setiferus*.
- 3.- Conocer las variaciones de la actividad de diversas enzimas hidrolíticas de acuerdo al origen de los organismos del medio natural y de laboratorio.

ANTECEDENTES

Se ha planteado que las preferencias del alimento, requerimientos nutricionales y actividad de enzimas digestivas cambian conforme el organismo se desarrolla, sobre todo en las primeras fases y también de acuerdo a la especie, ya que se ha observado que ocurren transformaciones en sus hábitos alimenticios porque cambian de una vida planctónica a una bentónica (Jaime y García, 1990).

Después de la eclosión en mar abierto, las larvas de *Penaeus setiferus* pasan a través de 5 estadios de nauplios (no se alimentan (N₁-N₅), 3 estadios de protozoa (Z₁-Z₃) y 3 estadios de mysis (M₁-M₃) antes de la transformación a postlarva (PL₁). Todas estas etapas son planctónicas. Las postlarvas migran hacia aguas costeras y adoptan una vida bentónica, exhibiendo cambios en los hábitos alimentarios. En muchas especies de decápodos tales como los cangrejos y langostas, la muda metamórfica está acompañada por un cambio abrupto en los hábitos planctónicos a bentónicos. Sin embargo este cambio en el género *Penaeus* se prolonga a un periodo de dos semanas y ocurre gradualmente mientras que las primeras postlarvas migran cerca de la costa a las zonas de crianza (Perez-Farfante, 1969; Lovett y Felder 1990b) (Fig. 1).

Con el propósito de conocer los requerimientos de proteínas, lípidos y carbohidratos, se han realizado estudios para conocer los hábitos alimenticios del camarón en el medio natural, que consisten en análisis del contenido estomacal y análisis proximal (McTigue y Zimmerman, 1991). Al distinguir sus necesidades en condiciones naturales es posible elaborar dietas adecuadas que satisfagan sus necesidades nutricionales en condiciones controladas.

El camarón es un animal omnívoro cuya dieta incluye crustáceos, moluscos, poliquetos, oligoquetos, poliquetos epibénticos, copépodos, harpaticoides, pericáridos y foraminíferos; se alimentan también de algas filamentosas, diatomeas y detritus de origen diverso y en menor proporción de pastos o vegetación sumergida (O'Brien, 1994; Mc Tigue y Zimmerman, 1991; Fernández *et al.*, 1988)

Por sus características de importancia nutricional y porque es uno de los componentes más caros en las dietas artificiales, se han estudiado con mayor interés los requerimientos de proteínas (Fernández *et al.*, 1988). Hwang-Yung *et al.* (1985), plantea

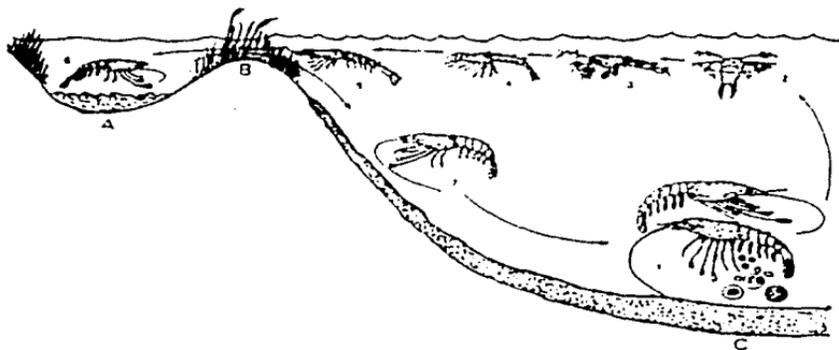


Figura 1. Ciclo de vida de un camarón peneido típico. 1. maduración y reproducción; 2. nauplios; 3. protozoas; 4. mysis; 5. postlarvas; 6. juveniles; 7. adultos. A. zona de poca profundidad; B. zona de pastos; C. mar abierto (Martínez, 1993).

que en pruebas de alimentación el requerimiento de proteínas en las primeras etapas es muy alto, excede al 40 % de proteína cruda y disminuye a menos de 30 % en los últimos estadios del ciclo de vida.

Existen numerosos estudios que han determinado y analizado los requerimientos de proteína, sobre todo en la fase postlarval, de diversas especies. A continuación se presentan los niveles óptimos de varias especies del género *Penaeus*.

ESPECIE	NIVEL OPTIMO DE PROTEÍNA (%)	REFERENCIA
<i>Penaeus aztecus</i>	40	Venkataramiah <i>et al</i> 1975,
	43-51	Zein-Eldin y Corliss, 1976
<i>Penaeus californiensis</i>	31	Colvin y Brand, 1977
<i>Penaeus japonicus</i>	54	Deshimaru y Kuroki, 1974
<i>Penaeus merguensis</i>	34-42	Sedgwick, 1979
<i>Penaeus monodon</i>	34-40	Khonnapa, 1977,
	35	Bages y Sloane, 1981
<i>Penaeus stylirostris</i>	30-44	Colvin y Brand, 1977
<i>Penaeus schmitti</i>	60	García y Galindo, 1990, y Gaxiola, 1991
<i>Penaeus vannamei</i>	30-35	Colvin y Brand, 1977
<i>Penaeus setiferus</i>	40 en PL ₄₀	Gaxiola, 1994
<i>Penaeus duorarum</i>	50 en PL ₃₀	Gaxiola, 1994
	40 en PL ₄₀	Gaxiola, 1994

Los requerimientos de lípidos han sido poco estudiados, sin embargo se considera que el requerimiento de lípidos debe ser menor o igual al 10 % de la dieta y se sugiere que los ácidos grasos principalmente de la serie linoléica y linoléica son importantes en la nutrición del camarón (Fenucci *et al.*, 1981)

Kanazawa (1985) concluyó que los fosfolípidos tienen efectos favorables para promover el crecimiento y supervivencia en los camarones.

Por otro lado los requerimientos de carbohidratos no han sido estudiados ampliamente. Se ha demostrado la presencia de carbohidrasas, incluyendo α y β -amilasa, maltasa, sacarasa, quitinasa y celulasa. Las dos últimas probablemente pueden ser producidas por las bacterias celulolíticas y quitinolíticas presentes en el aparato digestivo

de estos animales (Fernández *et al.*, 1988). Sin embargo se ha demostrado la presencia de actividad quitinolítica en *Penaeus setiferus* según Marin (1995).

Los estudios de nutrición para los camarones peneidos han sido enfocados a valorar la respuesta orgánica (el crecimiento y la supervivencia). En la actualidad principalmente se realizan investigaciones integrales que incluyen aspectos de bioenergética y fisiología digestiva (Clifford y Brick, 1983; Dall y Smith, 1986; Hewitt e Irving, 1990; Du Preez *et al.*, 1992 y Rosas *et al.*, 1993) Las cuáles son necesarias para valorar el efecto del alimento sobre las respuestas fisiológicas del organismo como el consumo de oxígeno, el incremento de calor aparente (ICA o ADE), la relación oxígeno consumido/nitrogeno excretado (O/N) y la excreción nitrogenada postalimentaria. Con ello se evalúa la capacidad digestiva del organismo y las diversas vías por las que se canaliza la energía producida por el alimento (metabolismo). Las respuestas fisiológicas de la digestión se manifiestan en la tasa metabólica de los organismos. Así la relación del alimento con el aumento del consumo de oxígeno, asociado con el uso de la energía para la transportación del alimento en el tracto alimentario, digestión, absorción y procesos postabsortivos, se define como incremento de calor aparente (ICA) (Beamish y Tripell, 1992; y Chakraborty *et al.*, 1992).

En los camarones peneidos el incremento de la tasa metabólica posterior a la ingestión del alimento está correlacionada con la excreción de productos nitrogenados. Los camarones peneidos catabolizan proteínas cuando sus necesidades de energía no son cubiertas de manera adecuada por el alimento. El catabolismo de las proteínas con fines energéticos implica la desviación de proteínas para la construcción de nuevo tejido para obtener energía (Bages y Sloane, 1981; Bautista, 1986; Hajra *et al.*, 1988, y Sedgwick, 1979). La relación O/N (oxígeno consumido/nitrogeno excretado) es definida por Mayzaud y Conover (1988) como un índice del catabolismo de nutrientes, es decir la relación entre el número de átomos de oxígeno consumido y el número de átomos de nitrógeno excretado, esta relación nos permite conocer el sustrato metabólico energético utilizado.

El aparato digestivo, está formado por 3 regiones principales, la región anterior, la media y la posterior. Lovett y Felder (1989) describen que en *PL-35* la anterior ya está constituida como en el adulto, en la cual el estómago está formado por la cámara del cardias la cual está constituida por pliegues (inferior y superior) y junto con el piso del cardias forman los canales del cardias inferior y superior, poseen un diente medio y un

denticulo terminal, presentan un molino gástrico, en PL₃₅ no está tan quitinizado como en la forma adulta y una cámara pilórica (fig. 2).

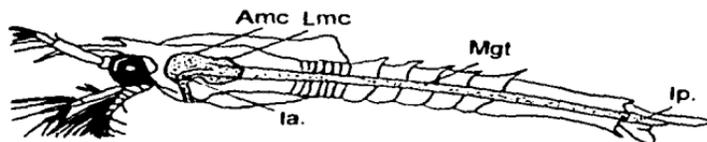
El intestino medio está constituido por el tronco del intestino medio, el divertículo anterior del intestino medio, el hepatopáncreas y el divertículo del intestino medio posterior (fig. 3). En PL₃₅ el intestino medio esta constituido como en el adulto, excepto por el divertículo posterior (Lovett y Felder, 1989).

A partir de PL₃₅ el intestino posterior está constituido como en el adulto (Lovett y Felder, 1989). La cámara posterior es un filtro formado por dos crestas laterales y una cresta media ventral densamente cubierta con setas. La unión del intestino medio con el posterior se localiza en el 6o segmento abdominal (Fig. 4).

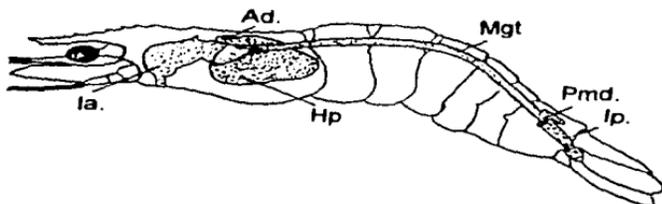
El hepatopáncreas, localizado en la región media, es un órgano vital en los crustáceos, responsable de diversas actividades metabólicas. Es el encargado de la síntesis y secreción de enzimas digestivas, de la absorción de nutrientes, y está involucrado en la excreción, el ciclo de muda, el almacenamiento de reservas inorgánicas, el metabolismo de lípidos y carbohidratos y en menor proporción en funciones de control neuroendócrino (Gibson y Baker, 1979; Al-Mohanna *et al.*, 1985). El epitelio del hepatopáncreas está constituido por diversas células. La nomenclatura actual para estas se basa en la clasificación de Jacobs (1928) y Hirsh y Jacobs (1928). Estos autores identificaron las células E (embrionarias), F (Fibrilares), B (parecida a una ampolla) y R (reabsortivas) y más recientemente las células M (células del intestino medio) descritas por Al-Mohanna *et al.* (1984).

La evaluación de las enzimas digestivas de un organismo nos proporciona información acerca de la capacidad digestiva, es decir la habilidad que tiene para degradar y absorber los diferentes nutrientes contenidos en la dieta. (Lee y Lawrence, 1984; Tsai *et al.*, 1986).

Las proteinasas catalizan la hidrólisis de uniones peptídicas en proteínas o péptidos del alimento. En los crustáceos, estas enzimas son secretadas por el hepatopáncreas en altas concentraciones (Gibson y Baker, 1979; Al-Mohanna *et al.*, 1984), su especificidad varía ampliamente.



A



B

Figura 2. Esquema del intestino en larvas y adultos de *Penaeus setiferus*. A. Z_3 ; B. Adulto. Ad. divertículo anterior del intestino medio; la. Intestino anterior; Ip. Intestino posterior; Hp. Hepatopáncreas; Lmc. ceca lateral del intestino medio; Mgt. Tronco del intestino medio; Pmd. Divertículo posterior del intestino medio. (Lovett y Felder, 1989).



Figura 3. Vista Lateral del final anterior del intestino en *Penaeus setiferus* Pl₄. Las flechas indican patrones del que sigue el quimo durante el flujo de marea. (Lovett y Felder, 1990a).

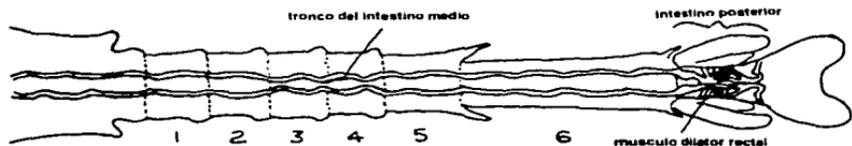


Figura 4. Vista dorsal del tronco del intestino medio en *Penaeus setiferus* Z₃. Segmentos abdominales 1-6. (Lovett y Felder, 1990a).

Vega-Villasante, Nolasco y Civera (1995) analizaron la actividad proteolítica en todo el tracto digestivo de juveniles de *Penaeus californiensis* como un primer intento de entender la fisiología digestiva de esta especie.

Estos autores concluyeron que la actividad proteolítica en el extracto del tracto digestivo del camarón café *Penaeus californiensis* tiene las siguientes propiedades: 1) tiene una máxima actividad en una concentración entre 0 y 0.5 M de NaCl, aunque se presenta una alta actividad en 2 M de NaCl, 2) actividad óptima a 50 °C; inactivación irreversible a 60 °C y 3) tienen actividad entre pH 6 y 10 con una máxima actividad en pH cercano al 8. Identificaron actividades parecidas a la tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa A y B y de leucina-aminopeptidasa.

La quimotripsina y la tripsina en mamíferos son enzimas digestivas conocidas como serín-proteinasas. La quimotripsina está compuesta por 3 cadenas polipeptídicas conectadas mediante puentes disulfuro intercatenarios, es sintetizada como un precursor inactivo de una cadena sencilla, llamado quimotripsinógeno. Es selectiva para los enlaces peptídicos contiguos a tirosina, triptofano, fenilalanina y de los grandes residuos hidrofóbicos tales como la metionina (Stryer, 1993).

Tsai *et al.* (1986) identificaron la actividad de quimotripsina empleando sustratos sintéticos eficientes y altamente específicos (Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA). Concluyeron que las quimotripsinas y tripsinas se localizan en el hepatopáncreas, estómagos e intestinos de los camarones que estudiaron (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus*, *Penaeus penicillatus*, *Macrobrachium monoceros* y *Macrobrachium rosenbergii*). En un segundo trabajo Tsai *et al.* (1991) caracterizaron la quimotripsina del intestino medio en *Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* y *Penaeus penicillatus*. Encontraron que las quimotripsinas de penidos pueden ser clasificadas en dos subgrupos basada por su movilidad electroforética, las dos formas difieren ligeramente con respecto a sus especificidades catalíticas y las secuencias N-terminal, ambas son de cadena simple con tres uniones disulfuro. Una presenta un punto isoeléctrico (pI) de 3.2 y peso molecular (P M) de 27000 o 28000 Daltones, mientras que la otra tiene un pI de 3.0 y P M de 25000 o 26000 Da. Concluyeron que sus resultados sugieren que la mayoría de los crustáceos decápodos contienen quimotripsinas como una principal endoproteinasas digestiva.

La tripsina es una endopeptidasa, que corta preferentemente proteínas y péptidos en la unión peptídica de los residuos de lisina y arginina. La enzima es sintetizada como un

precursor o zimógeno y se almacena en los gránulos de zimógeno. Es secretada dentro del hepatopáncreas (Gibson y Baker, 1979; Al-Mohanna, 1985)

Kim *et al.* (1992) caracterizaron a la tripsina de camarón. Algunas diferencias con las tripsinas de los vertebrados incluyen requerimientos de iones de calcio para la catálisis enzimática y estabilidad a cambios en el pH, punto isoelectrico bajo, nivel bajo de aminoácidos básicos y un rango amplio de pesos moleculares. Los mismos autores compararon las propiedades fisicoquímicas de la tripsina en *Procambarus clarkii*, aislaron 4 tripsinas aniónicas (A, B, C, y D), los pesos moleculares para estas tripsinas corresponden a 23 8, 27 9, 24 8 y 31 4 kda respectivamente

Vega-Villasante, Nolasco y Civera (1993) analizaron la actividad aminolítica en extractos del tracto digestivo de juveniles de *Penaeus californiensis*, con el objeto de entender la fisiología digestiva de esta especie. Concluyen que se presenta considerable actividad aminolítica entre pH 6.5-8 con una máxima alrededor de 7.5; la temperatura óptima se establece entre 30-40 °C, similar a las amilasas presentes en otros crustáceos; la máxima actividad de la amilasa se establece en una concentración de 0.01 M de NaCl, la actividad de amilasa fue parcialmente inhibida por los iones divalentes Hg^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} y Cr^{+} , los iones de Mg^{+2} y Ca^{+2} parecen aumentar la actividad aminolítica

Van Wormhoudt (1974) realizó un trabajo donde evaluó cuantitativamente los cambios en las características de las enzimas digestivas relacionadas con el ciclo de intermuda. Las mediciones de las actividades de enzimas digestivas en *Palaemon serratus* durante cada ciclo de intermuda muestran que, en diferentes periodos del año, las variaciones siguen 3 esquemas diferentes; se presenta un ritmo de actividad monofásico observado durante la primavera; el máximo se sitúa en la premuda. Un ritmo de actividad difásico predominante durante los meses de verano; la máxima se sitúa al final de la intermuda y la mitad de la premuda, este ritmo persiste en el otoño, pero la amplitud es menos pronunciada. Un ritmo de actividad monofásico característico de los meses de invierno; el máximo se sitúa al final de la intermuda y el comienzo de la premuda. Concluye que sus resultados sugieren que las condiciones ambientales juegan un papel importante en el control de la síntesis de enzimas en el hepatopáncreas, simultáneamente se reduce la intermuda y así se facilita el crecimiento del animal.

En otro trabajo Van Wormhoudt y Favrel (1988) caracterizaron el sistema de α -amilasa por electroforesis de *Palaemon elegans* (Crustacea, Decapoda); detectaron siete

formas cuyos pesos moleculares están entre 29,000 y 78,000 Da. Encontraron que durante el ciclo de intermuda, los cambios en la síntesis de proteína muestran estar relacionados con los cambios en las cantidades de las variantes de la α -amilasa, medidas por inmunoelectroforesis.

Lee y Lawrence (1984 y 1985) determinaron que el nivel de proteína en la dieta influye en las actividades enzimáticas digestivas en los camarones (*Penaeus vannamei* y *Penaeus setiferus*) de todos los tamaños analizados, mientras que la fuente de proteína tiene un gran efecto en la actividad enzimática solamente en camarones pequeños (< 10g). Concluyen que hay diferentes respuestas con respecto al nivel y fuente de proteínas en función del tamaño, esto apoya que es necesario formular dietas específicas para el camarón en las diferentes etapas, tomando en consideración los cambios en la fisiología digestiva

Galgani y Ceccaldi (1988) evaluaron el efecto de la incorporación de harinas de soya y de pescado sobre el crecimiento, sobrevivencia y características del hepatopáncreas (rendimiento hepatosomático (RHS), color y apariencia) y las enzimas digestivas (proteinasas, amilasas y tripsina) de *Penaeus vannamei*. Probaron 4 concentraciones de harina de soya (0, 5, 15, 40 %), 4 concentraciones de harina de pescado (0, 5, 15, 30 %), también probaron el efecto de 2 tipos de harina de soya y tres harinas de pescado de diferente origen geográfico. Sus resultados muestran que una concentración alta de harina de soya o de pescado en la dieta disminuyen el crecimiento sin un efecto aparente sobre las enzimas digestivas evaluadas (proteinasas, amilasas y tripsina) o en las características del hepatopáncreas, también que no hay un efecto del tipo de soya o de pescado de acuerdo al origen geográfico de donde provinieron. Concluyen que sus resultados sugieren que la incorporación tanto de harina de soya o de pescado en la dieta se debe restringir a concentraciones bajas y solo con el objeto de diversificar las fuentes de proteína.

Le Moullac, Van Wormhoudt y AQUACOP (1994) analizaron los límites de la adaptación de las enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina y amilasa) de larvas de *Penaeus vannamei*, principalmente en los subestadios de zoea, en diferentes niveles de proteína, carbohidratos, celulosa, diferentes fuentes de proteína y calidades de almidón en dietas microparticuladas. Sus resultados muestran que el alimento artificial (microparticulado) que contiene caseína disminuye el contenido de proteína soluble y las actividades enzimáticas. La actividad específica de la tripsina pero no de la quimotripsina, se correlaciona con el nivel de caseína ($P < 1\%$) entre 10 y 60 % en dietas artificiales. Por

otro lado las fibras de celulosa en el alimento parece tener poco efecto sobre las enzimas digestivas. El almidón entre 1 y 20 % en la dieta artificial no tiene influencia sobre la actividad específica de la amilasa. Examinan sus resultados observando que el contenido total de proteína soluble se correlaciona con el crecimiento larval, que corresponde a un aumento del volumen de la glándula digestiva de acuerdo a lo descrito para *Penaeus setiferus* por Lovett y Felder (1989), además muestran que las variaciones en el contenido de proteína soluble en larvas de *Penaeus vannamei* se correlaciona con la calidad del alimento. Las actividades específicas de las enzimas siguen el mismo patrón del contenido de proteína soluble con respecto al crecimiento larval y el alimento, es decir aumentan regularmente entre zoea (Z₁) y mysis (M₁). Así factores como la muda, la hora del día y temperatura pueden influir en las actividades enzimáticas y cuatro factores relacionados con el alimento, pueden ser la fuente de variación: tipo de alimento (vivo o inerte), tamaño, densidad y calidad.

Le Moullac, Van Wormhoudt y AQUACOP (1994) concluyen que parece que durante los primeros estadios de desarrollo larval existe una adaptación de la tripsina al nivel de caseína en el alimento y de la tripsina, quimotripsina y amilasa a la calidad del alimento, como en el adulto. El aumento de la tripsina pero no de la quimotripsina esta correlacionado al nivel de caseína en la dieta y esto es paralelo al crecimiento. Esta inducción específica y su respuesta puede ser provocada debido a la calidad de la proteína.

Rodríguez *et al.* (1994) evaluaron el crecimiento, la sobrevivencia y la actividad de enzimas digestivas de larvas y postlarvas de *Penaeus japonicus* bajo tres regímenes de alimentación. En el primer estadio de mysis, se usaron tres regímenes de alimentación: a) *Chaetoceros gracilis* más nauplios de *Artemia sp.*, b) nauplios de *Artemia sp.* c) *Chaetoceros gracilis*. Encontraron que no hay diferencias significativas en el crecimiento, sobrevivencia, contenido de proteínas o contenido de lípidos entre los animales que recibieron el único tipo de alimento. Así mismo observaron que el crecimiento de las larvas que recibieron la dieta mezclada fue significativamente más alta que en los otros tratamientos. De acuerdo a la dieta suministrada, la actividad de la tripsina estuvo más influenciada que la de amilasa y las diferencias en la relación de esas enzimas entre tratamientos, sugiere control independiente de su secreción.

Lovett y Felder (1989, 1990a, 1990b y 1990c) realizaron diversos trabajos en *Penaeus setiferus* en donde describen los cambios en el desarrollo ontogénico, morfología del intestino, cinemática y cambios en la actividad de enzimas digestivas de larvas y postlarvas y cambios en la distribución enzimática. Plantearon que existe un "período

crítico" que comprende de PL₁-PL₁₄ durante el cuál se presentan altas tasas de mortalidad. Lovett y Felder (1990b) suponen que este periodo crítico coincide con un cambio en la actividad de enzimas digestivas que corresponde a un cambio en los hábitos a fin de que el camarón pueda digerir y asimilar eficientemente una nueva dieta

Lovett y Felder (1990b) correlacionaron los cambios que ocurren en la morfología, actividad de enzimas digestivas y hábitos alimentarios asociados con la ontogenia de *Penaeus setiferus*. Plantean que la disminución en las actividades específicas de la enzimas digestivas de mysis-postlarva (de M₁-PL₄) coinciden con la degeneración del intestino, presentándose un incremento subsecuente en las actividades enzimáticas durante el desarrollo postlarval que coincide con la diferenciación del intestino en la forma adulta. Este aumento representa mayor actividad enzimática en tejidos hepatopancreáticos y un incremento alométrico en el tamaño relativo del hepatopáncreas. En *Penaeus setiferus* las actividades específicas de amilasas y proteinasas son bajas en aquellas etapas que preceden a la primera etapa de alimentación. Las actividades enzimáticas aumentan durante el desarrollo larval temprano. En el desarrollo postlarval la actividad de la amilasa aumenta y en la metamorfosis la actividad de proteinasas disminuye, permaneciendo baja y presentando un pico en la relación amilasas/proteinasas (A/P) que ocurre en mysis (M₂).

Con respecto a la ontogenia del aparato digestivo ellos observaron disminución en la mayoría de las actividades de enzimas digestivas inmediatamente después de la metamorfosis que coincide con la degeneración de la ceca anterior del intestino medio. El incremento en las actividades después del periodo crítico coincide con la ramificación de lóbulos del hepatopáncreas, sus resultados indican que el aumento sustancial en las actividades de enzimas digestivas (particularmente para la tripsina, carboxipeptidasa A y amilasa) ocurre durante la cuarta y la quinta semana del desarrollo postlarval coincidiendo con la diferenciación del hepatopáncreas. Además en esta etapa del desarrollo, el intestino anterior casi alcanza la morfología y función de la forma adulta, el divertículo posterior está diferenciado y el tiempo de retención del alimento aumenta dramáticamente en los primeros estadios postlarvales.

Así mismo correlacionaron el cambio ontogenético, la actividad enzimática, la dieta y los hábitos alimentarios. Observando que en el estadio de zoea (Z₁), cuando las larvas comienzan a alimentarse con algas, la actividad de esterasa es máxima. En larvas las actividades de tripsina y carboxipeptidasa A y B son máximas en zoea a mysis (Z₃-M₁), cambian sus hábitos alimentarios de filtradores a una alimentación raptorial en mysis (M₃) y la eficiencia de la filtración continúa declinando durante postlarva (PL₁), las actividades disminuyen durante mysis (M₃) y en postlarva (PL₁).

En postlarva (PL₂₀-PL₃₅) incluyen en su dieta mayor cantidad de materia animal y se refleja en un aumento sustancial en la actividad enzimática evaluada. Plantean que a pesar de mantener constante la dieta en este estudio ocurre un cambio ontogenético significativo en la actividad enzimática y en la relación amilasas/proteinasas (A/P), su interrogante es en la validez de emplear la relación amilasas/proteinasas (A/P) para predecir el grado en el cual un organismo es omnívoro o herbívoro. Y concluyen que a pesar de la correlación con los cambios ontogenéticos en la actividad enzimática con el cambio en los hábitos alimentarios, el cambio ontogenético en la actividad puede ser producto del desarrollo y puede reflejar regulación genética temporal de la síntesis de enzimas, más que un cambio en la dieta.

En la tabla 1 se resumen los eventos asociados que ocurren en el desarrollo de *Penaeus setiferus* (Lovett y Felder, 1989, 1990a, 1990b y 1990c).

Fang y Lee (1992) estudiaron el cambio de la actividad total de las proteinasas, de nauplios a adultos de *Penaeus monodon*, detallaron la variación de la tripsina y la quimotripsina y la ocurrencia de sus isoenzimas en diferentes estadios. También evaluaron la actividad de α -amilasa, maltasa, quitinasa y compararon los datos de las carbohidrasas con los de las proteinasas para examinar el cambio ontogenético de los requerimientos nutricionales de este camarón. Sus resultados indican que la actividad proteolítica total fue baja durante la etapa larval (nauplios y zoea) aumenta en mysis y se mantiene con poca variación de postlarva a adulto. Con respecto al cambio del patrón de isoenzimas de tripsina y quimotripsina encontraron dos isoenzimas activas presentes en mysis, aunque también encontraron dos isoenzimas en PL₁₀; esto les indicó que al parecer solo una isoenzima fue similar mientras que la otra fue diferente, el patrón en adultos es más complicado.

La actividad de la α -amilasa aumenta después de postlarva, mientras que la actividad quitinasa y maltasa muestra un pico en zoea y gradualmente disminuye en el adulto. La actividad carbohidrasa en *P. monodon* fue bastante activa en las etapas larvales y en el adulto. Esto corresponde al cambio en los hábitos alimenticios del camarón, cuya dieta incluye diatomeas, zooplacton, detritus-bentos y dieta mezclada. Hacen notar que la actividad de la quitinasa aumenta en zoea y en mysis, cuando el zooplacton es parte importante en la dieta de la larva ya que la quitinasa puede ser muy útil para digerir el esqueleto de copépodos y otros organismos planctónicos de naturaleza similar. Así concluyen que no hay duda que la ocurrencia y la actividad de enzimas digestivas están influenciadas por muchos factores externos e internos del animal.

Tabla 1. Eventos que ocurren en la morfología, actividad de enzimas digestivas y hábitos alimentarios asociados con la ontogenia de *Penaeus setiferus* Lovett y Felder (1989, 1990a, 1990b y 1990c)

SUBESTADIOS	MORFOLOGIA	ACTIVIDAD DE ENZIMAS DIGESTIVAS	HABITOS ALIMENTARIOS
N Vida planctonica (de nado libre) etapas larvales de N-M _{II}	No hay comunicación del tubo del intestino anterior con el tubo del intestino medio	Proteinasas es baja, estererasas es baja, la relación A/P es alta en N ₅	se alimentan de vitelo
P _I	Se comunica el tubo digestivo anterior con el tubo del intestino medio, comienza, la alimentación	La act. proteínasa es baja, la actividad de la esterasa es máxima se localiza en todas las regiones del intestino medio, y amilasas bajan su actividad	Se alimentan de algas (verde-azules) y diatomeas
P _I - P _{III}	Poca diferenciación de la cámara del cardias, en P _{III} se observa la diferenciación de los lobulos laterales que daran origen a la ceca del intestino medio lateral (hepatopáncreas)	Las proteinasas alcanzan un máximo en P _{III} , las estererasas se mantienen y las amilasas bajan su actividad, la carboxipeptidasa A es máxima en Z ₃ , la relación A/P es baja en Z ₃	Se alimentan de diatomeas, dinoflagelados en P _{II} empiezan a digerir elementos del zooplacton
M _I - III	Diferenciación de la válvula pilórica que divide a las cámaras (cardias y pilórica) en M _{II} aparece la glándula del filtro	Las proteinasas se mantienen la tripsina y la carboxipeptidasa A y B son máximas (M _I y Z ₁), las estererasas disminuyen y las amilasas alcanzan un máximo, la relación A/P en M _{II} .	En M _I ingiere proteína animal, elementos mayores del zooplancton (del tipo artemia)

Tabla 1. continuación.

<p>PL₁ - PL₁₄ Representa un periodo crítico con altas tasas de mortalidad.</p>	<p>En <i>Penaeus setiferus</i> el cambio morfológico ocurre sustancialmente cuando la ceca del intestino medio lateral de larvas se diferencia en el hepatopáncreas, aparecen las setas que daran origen al molino gástrico, el hepatopáncreas y el intestino anterior alcanza la morfología y función del adulto, el divertículo posterior esta diferenciado y el tiempo de retención del alimento en el intestino aumenta en los primeros estadios postlarvales</p>	<p>Las proteinasas disminuyen y aumentan en PL₁₇, aumentan las actividades enzimáticas particularmente tripsina y carboxipeptidasa A las estererasas aumentan, la amilasa ocurre durante la 4o. y la 5o. semana del desarrollo postlarval y coincide con la terminación de la diferenciación por el hepatopáncreas en PL₁₇₋₄ disminuye pero en PL₁₄ aumenta marcadamente a través del resto del desarrollo postlarval, la relación A/P comienza en PL₇ y continua hasta PL₂₄ Las actividades de la amilasa, proteinasa y fosfatasa alcalina son evidentes en la ceca lateral durante el desarrollo temprano, también es evidente en el hepatopáncreas maduro. Así esta región retiene las funciones de síntesis de enzimas digestivas, secreción y absorción durante todo el desarrollo</p>	<p>Son organismos omnívoros.</p>
---	---	--	----------------------------------

Otro trabajo que ha evaluado los cambios relacionados con el desarrollo ontogénico es de González, Fraga y Carrillo (1995) Determinaron los cambios en la actividad de la tripsina, quimotripsina, leucina-aminopeptidasa, carboxipeptidasa B, proteasas generales, α -amilasa y lipasa, durante la ontogenia de *Penaeus schmitti*; además calcularon la variación de la relación α -amilasa/Proteasas generales (A/PG) y tripsina/Proteasas generales (T/PG), con el objeto de intentar correlacionar la actividad enzimática con la dieta y utilizar las relaciones (A/PG Y T/PG) como un índice de los cambios en los hábitos alimentarios de los camarones en cultivo. Encontraron que la actividad de las enzimas determinadas en nauplios (tripsina, proteasas generales, α -amilasa y lipasa) fue mucho menor que en protozoa, de este estadio hasta P1.5 donde observaron una disminución en la actividad de todas las proteinasas, mientras que la α -amilasa aumentó y la lipasa no presentó diferencias significativas. De juveniles a adultos, no observaron diferencias en la actividad de la mayoría de las enzimas proteinasas, sólo la actividad de la leucina-aminopeptidasa disminuye mientras que la α -amilasa fue mayor. La relación Tripsina/Proteasas generales (T/PG) presentó su máximo valor en P1.5, mientras que la relación α -amilasa/Proteasas generales aumentó durante todo el desarrollo. Así concluyeron que los cambios ontogenéticos en la actividad de las enzimas digestivas son el reflejo de los cambios morfológicos del sistema digestivo, pero también de los cambios en los hábitos de vida y alimentarios que sufren las larvas y los primeros estadios postlarvales. En *Penaeus schmitti*, el aumento constante de la relación A/PG durante la ontogenia hace a esta especie más eficiente para la utilización de los carbohidratos dietéticos.

El análisis de todos estos estudios muestra que no hay un patrón determinado o constante en la respuesta de diversas actividades hidrolíticas del aparato digestivo de los crustáceos, sino que probablemente ésta es el producto de la interrelación de diversos factores internos o genéticos, así como factores externos como la estación, la hora del día, la temperatura y factores relacionados con el alimento como son: el tipo de alimento, tamaño, densidad y calidad.

MATERIALES Y METODOS

OBTENCION DE LAS POSTLARVAS

A) Condiciones Controladas

Las postlarvas de *Penaeus setiferus* provinieron de hembras del medio natural, capturadas en la sonda de Campeche frente a la Isla del Carmen a una profundidad de cuatro brazas (7 m), las cuales fueron maduras, inseminadas manualmente y desovadas en el laboratorio del Centro Regional de Investigaciones Pesqueras (CRIP) en la Cd. de Campeche.

Una vez alcanzada la etapa de postlarva 40 se alimentaron en el laboratorio durante 30 días, con dietas purificadas (Gaxiola 1994), las cuales contenían cinco concentraciones de proteína (20, 30, 40, 50 y 60 %) En el experimento 1, el ajuste de la energía se realizó mediante la variación de los carbohidratos, los lípidos se mantuvieron fijos en 8.5 % y en el experimento 2, el ajuste de la energía total de las dietas se hizo por medio de los lípidos, los carbohidratos se mantuvieron fijos

La composición de las dietas utilizadas en los bioensayos se presenta en las tablas 2 y 3 El método por el cual fueron elaboradas está basado en las técnicas reportadas por Gaxiola (1991) y García (en Alfonso *et al.*, 1993)

Una vez terminados los estudios de nutrición (crecimiento y sobrevivencia) y respuesta fisiológica los organismos fueron trasladados vivos, en bolsas de polietileno, con agua del medio y atmósfera saturada de oxígeno, por avión a la Cd. de México y congelados inmediatamente a -70 °C.

B) Medio Natural

Las postlarvas y juveniles silvestres se colectaron en la Laguna de Términos, Cd. del Carmen Campeche, localizada al suroeste del Golfo del México entre los meridianos 91° 15' y 92° 00' de longitud oeste y 18° 25' y 19° 00' de latitud norte (Ponce-Velez y Bolleto, 1991)(Fig. 5). Las postlarvas se capturaron en la parte noreste de Boca del Carmen y los juveniles en Palizada Vieja. Los adultos se colectaron en la Sonda de Campeche, frente a la Isla del Carmen.

Tabla 2 Composición de las dietas del experimento 1 para postlarvas de *Penaeus setiferus*. (PL₂₀).

TRATAMIENTOS										
INGREDIENTES	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Caseína	20.2	20.2	30.3	30.3	40.4	40.4	50.5	50.5	60.6	60.6
Arginina	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6
Dextrina	58.67	33.68	47.58	22.57	36.47	11.47	25.38	1	14.3	0
Ac.de Girasol ^a	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Ac. H. Bac. ^b	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Lecitina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Colesterol	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Vit. y Min. ^{**}	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Vit. C ^c	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
CMC ^d	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Relleno	2.63	27.62	2.62	27.63	2.63	27.63	2.62	27	2.6	15.9
Prot. (%) ^e	20	20	30	30	40	40	50	50	60	60
ED (Kcal/g) ^{*f}	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3
P/E (mg/Kcal) ^g	50	66.7	75	100	100	133.3	125	165.3	150	174.9

^a Aceite de girasol

^b Aceite de hígado de bacalao

^c Vitamina C

^d Carboximetil-celulosa (aglutinante)

^e Porcentaje de proteína

^f Energía digestible

^g Relación proteína/energía

* Calculados de acuerdo con Nose (1979): 4 Kcal/g para las proteínas y carbohidratos y 9 Kcal/g para los lípidos.

** Premezcla de vitaminas y minerales propuesta por Ralston Purina de México.

Tabla 3 Composición de las dietas del experimento 2 para las postlarvas de *Penaeus setiferus*. (Pla₂).

TRATAMIENTOS										
INGREDIENTES	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
Caseína	20.2	20.2	30.3	30.3	40.4	40.4	50.5	50.5	60.6	60.6
Arginina	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6
Dextrina	11.9	11.9	11.85	11.85	11.8	11.8	11.75	11.75	11.7	11.7
Ac. de Girasol ^a	13.87	8.2	11.4	5.85	8.9	3.38	6.47	0.92	4	0
Ac. H. Bac. ^b	13.87	8.2	11.4	5.85	8.9	3.38	6.47	0.92	4	0
Lecitina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Colesterol	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Vit. y Min. ^{**}	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Vit. C ^c	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
CMC ^d	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Relleno	28.7	39.77	22.55	33.65	16.5	27.54	10.31	21.15	4.2	10.6
Prot. (%) ^e	20	20	30	30	40	40	50	50	60	60
Lípidos totales (%)	29.24	17.9	24.3	13.2	19.3	8.26	14.4	3.34	9.5	1.5
ED (Kcal/g) ^f	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3
P/E (mg/Kcal) ^g	50	66.7	75	100	100	133.3	125	165.3	150	174.9

^a Aceite de girasol

^b Aceite de hígado de bacalao

^c Vitamina C

^d Carboximetil-celulosa (aglutinante)

^e Porcentaje de proteína

^f Energía digestible

^g Relación proteína/energía

^{*} Calculados de acuerdo con Nose (1979): 4 Kcal/g para las proteínas y carbohidratos y 9 Kcal/g para los lípidos.

^{**} Premezcla de vitaminas y minerales propuesta por Ralston Purina de México.

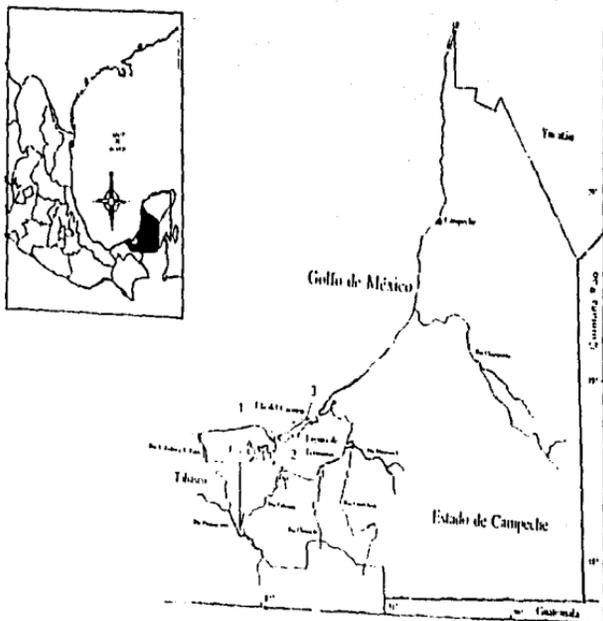


Figura 5. LOCALIZACIÓN DE LAS ZONAS DE COLECTA.
Estación 1: Boca del Carmen; Estación 2: Palizada Vieja;
Estación 3: Sonda de Campeche.

La captura de postlarvas se realizó a una profundidad de 75 cm con una red de patín con abertura de malla de 500 μm , los juveniles fueron capturados a una profundidad de 1 m con una red de prueba camaronesa con abertura de malla de 2.5 cm. Los adultos se capturaron a una profundidad de 7 m con una red de monofilamento con abertura de malla de 4.2 cm.

Preparación de los extractos enzimáticos

Las postlarvas se descongelaron y se colocaron en cajas de petri sobre hielo. Se les absorbió el exceso de agua con una toalla secante y se pesaron en una balanza digital (Ohaus E-400 de 0.01 g de precisión)

Las muestras se homogenizaron en agua desionizada por unos segundos en un baño de hielo, con un polytron (Brinkman Instruments). El homogenado se centrifugó por 30 minutos a 4 °C y 38650 x g. El sobrenadante libre de la capa de grasa, se alicuotó y se almacenó a -70 °C

Determinación de proteínas

Se utilizó el método de Bradford (1976) para la determinación de proteínas en el extracto de camarón, usando el kit de Bio-Rad y albúmina de bovino como estándar (BSA).

El procedimiento fue el siguiente

Se realizaron diferentes diluciones y 2 repeticiones de cada dilución, a cada tubo de prueba se le agregó 10 μl de muestra, 790 μl de agua desionizada, 200 μl de colorante Bio-rad, se mezcló y se esperó de 5 a 15 minutos, posteriormente se procede a leer en el espectrofotómetro (Beckman DU-64) a una longitud de onda de 595 nm

Determinación de la actividad enzimática

Para evaluar la actividad de las enzimas digestivas, se emplearon técnicas colorimétricas que utilizan sustratos cromogénicos (producen color). En la siguiente tabla se muestran las enzimas digestivas, sustratos y métodos empleados para la determinación de la actividad enzimática.

ENZIMA	SUSTRATO	REFERENCIA
PROTEINASAS	AZOCOLL	Walter (1988)
QUIMOTRIPSINA	Suc-(Ala) ₂ -Pro-Phe-4-NA	Geiger (1988)
TRIPSINA	Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-4-NA	Geiger y Fritz (1988)
α-AMILASA	4,6-tilideno(G ₇)-P-nitrofenil(G ₁)-D-maltoheptárido	Wallenfels <i>et al.</i> , 1978 y Wallenfels <i>et al.</i> , 1980 Rauscher, 1986, kit de Sigma (Sigma Chemical Co St Louis, Mo)

PROTEINASAS TOTALES

La actividad de proteinasas se evaluó por el método de Walter (1988) que utiliza azocoll como sustrato debido a que éste sufre proteólisis por la mayoría de las proteinasas. El ataque proteolítico sobre el sustrato insoluble libera péptidos coloreados solubles en el medio. El procedimiento que se realizó fue el siguiente:

La incubación se realizó en un volumen total de 1.575 ml, 12 mg de sustrato en 0.750 ml de amortiguador de fosfatos (0.375 M, pH 7.5) y agua desionizada, se incubaron por 6 minutos a 37 °C en un baño de temperatura controlada (Lab-Line, Aquabath) para equilibrarlos, posteriormente se agregó la muestra en diferentes concentraciones y se incubó por 30 minutos a 37 °C, durante el tiempo de incubación los tubos se agitaron ocasionalmente con un agitador vortex. Después de la incubación se agregaron 0.735 ml de ácido tricloroacético 0.6 M, se centrifugó a 750 x g durante 10 minutos, a temperatura ambiente, y el sobrenadante se leyó a 520 nm en un espectrofotómetro. Todas las muestras se midieron contra un blanco-control que no contiene muestra, sometido a las mismas condiciones que los experimentales.

QUIMOTRIPSINA

La actividad de quimotripsina se determinó por el método de Geiger (1988) empleando el sustrato Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-4-NA.

Los ensayos se llevaron a cabo en un espectrofotómetro con portaceldas de temperatura controlada automáticamente, en un volumen total de 0.7 ml, en amortiguador Tris-HCl (Tris 0.1 M, pH 7.8; Ca²⁺, 20 mmol/l; Triton X-100 0.05% (w/v)). La muestra se preincuba en el amortiguador a 25 °C durante 5 minutos, se agregan 100 µl de sustrato

(concentración final 3.5 mmol/l), se agita la solución y se toman lecturas cada minuto, durante 10 minutos a 405 nm. La 4-nitroanilida liberada por unidad de tiempo se monitoreó por el incremento en la absorbancia a 405 nm, siendo una medida de la actividad catalítica de la quimotripsina.

TRIPSINA

La actividad de la tripsina se analizó por el método de Geiger y Fritz (1988) empleando Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-4NA.

Las pruebas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro con portaceldas de temperatura controlada automáticamente en un volumen total de 1.0 ml en un amortiguador Tris (0.05 M, pH 8.2, Ca²⁺ 20 mmol/l). La muestra se preincuba en el amortiguador a 37 ° C durante 5 minutos, se agregan 100 µl de sustrato (concentración final 1 mmol/l) se agita la solución y se toman lecturas cada minuto durante 10 minutos a 405 nm. La tripsina corta los residuos de arginina, la 4-nitroanilida liberada por unidad de tiempo se monitoreó por el incremento de la absorbancia a 405 nm siendo una medida de la actividad catalítica de la tripsina.

α-AMILASA

Para la determinación de la actividad de la α-amilasa se empleó el kit comercial Sigma (Sigma Chemical Co. St. Louis Missouri) basado en metodologías que emplean p-nitrofenil-glicosidos como sustratos (Wallenfels *et al.*, 1978 y Wallenfels *et al.*, 1980). El kit emplea como sustrato 4,6-etilideno(glicosil₇)-p-nitrofenil (etilideno-glicosil₇PNP) (Rauscher, 1986).

Las reacciones involucradas en el ensayo de la α-amilasa son las siguientes:



La α-amilasa hidroliza el 4,6-etilideno-glicosil₇PNP (etilideno-glicosil₇PNP) en fragmentos glucosil₂-PNP, glucosil₃-PNP y glucosil₄-PNP. La α-glucosidasa (α-1-4-glucan glucohidrolasa) hidroliza el glucosil₂PNP y el glucosil₃PNP en p-nitrofenol y glucosa, 5 moles de sustrato (etilideno-glicosil₇PNP) producen 4 moles de p-nitrofenol. Así el ataque libera fragmentos coloreados en el medio. La tasa de incremento en la

absorbancia a 405 nm es directamente proporcional a la actividad de la α -amilasa en la muestra.

El procedimiento a realizar es el siguiente

Se preparó el sustrato de la α -amilasa y se equilibró en un baño de temperatura controlada a 37 °C, los ensayos se llevaron a cabo en un espectrofotómetro (Beckman DUJ-64) con portaceldas de temperatura controlada automáticamente, en un volumen total de 1.020 ml. En una celda se pipeteó 1 ml de sustrato para la α -amilasa y 0.020 ml (20 μ l) de muestra, se mezcló y se incubó por 2 min. Se leyó y se registró la absorbancia en 405 nm contra agua como referencia (Inicial A), se registró la absorbancia al minuto y a los dos minutos (Final A). Se calculó el incremento de la absorbancia por minuto dada por la siguiente fórmula

$$\Delta A = I_A - F_A/2$$

METODOS DE ANALISIS DE DATOS

Todas las actividades se expresaron como actividades específicas en unidades por mg de proteína total (μ /mg) y se reportó como una media de la población \pm el error estándar para cada tratamiento experimental. En todos los casos se trabajó con una probabilidad de 0.05. Se aplicó el ANDEVA multifactorial para evaluar la interacción entre el factor proteína y el factor energía sobre las actividades enzimáticas de las postlarvas de *Penaeus setiferus*. Se realizaron análisis de varianza de una vía para detectar diferencias significativas entre los tratamientos (ANDEVA) y la prueba de rangos múltiples de Duncan para proteína y la energía dietética sobre la actividad de las enzimas digestivas. Así como pruebas de t para detectar diferencias significativas entre las postlarvas del medio natural y las postlarvas de condiciones controladas.

RESULTADOS

En la tabla 4 se presenta el número, peso, volumen total de sobrenadante y peso promedio empleados para los análisis de la actividad enzimática de las postlarvas de *Penaeus setiferus* de condiciones controladas que se emplearon para el extracto enzimático

En la tabla 5 se presenta el número, peso, volumen total de sobrenadante y peso promedio empleados para los análisis de la actividad enzimática de las postlarvas juveniles (cabezas) y adultos (hepatopáncreas) que se emplearon para el extracto enzimático

Contenido de proteínas

En la tabla 6 se presenta el contenido de proteína total de los extractos enzimáticos de las postlarvas de *Penaeus setiferus* de condiciones controladas de los diferentes tratamientos expresado en mg/ml.

En la tabla 7 se presentan los datos del contenido de proteínas de los extractos de las postlarvas juveniles y adultos (*Penaeus setiferus*) del medio natural, expresado en mg/ml.

Estos datos fueron utilizados para obtener la actividad específica de las distintas actividades enzimáticas medidas.

PROTEINASAS TOTALES

A) CONDICIONES CONTROLADAS

EXPERIMENTO 1 - Efecto de la variación del contenido de proteína. Los resultados del efecto de la variación del contenido de proteína en la dieta se presentan en la figura 6 y tabla 8.

No se observó una correlación lineal al variar el contenido de proteína sobre la actividad enzimática del extracto de las postlarvas de *Penaeus setiferus* (PL₄₀), sin embargo para las dietas de baja energía (3 kcal/g) (Tabla 8), se obtuvo la mayor actividad enzimática con 40 % de proteína, (536.1 ± 50.22 U/mg de proteína) este valor difiere significativamente (P < 0.05) con los demás tratamientos tanto de alta como de baja energía (Fig. 6)

TABLA 4. PESO, VOLUMEN TOTAL DE SOBRENADANTE NÚMERO Y PESO PROMEDIO DE LAS POSTLARVAS DE *Penaeus setiferus* EMPLEADAS PARA LOS ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CONDICIONES CONTROLADAS QUE SE EMPLEARON PARA EL EXTRACTO ENZIMÁTICO

a) - el ajuste de la energía total de las dietas se realizó mediante carbohidratos, los lípidos fijos en 8.5 % Experimento 1

DIETA	A	B	C	D	E
No de postlarvas	13	66	48	42	37
Peso de las postlarvas	0.27	3.07 g	2.26 g	2.68 g	1.67 g
Peso Promedio de las postlarvas	0.021 g	0.047 g	0.047 g	0.064 g	0.045 g
Vol. Total de sobrenadante	3.8 ml	4.8 ml	10.4 ml	3.0 ml	2.0 ml

DIETA	F	G	H	I	J
No de postlarvas	37	42	25	9	22
Peso de las postlarvas	2.49 g	1.87 g	1.01 g	0.47 g	0.79 g
Peso Promedio de las Postlarvas	0.067 g	0.045 g	0.040 g	0.052 g	0.036 g
Vol. Total de Sobrenadante	13.8 ml	0.97 ml	1.75 ml	1.3 ml	2.25 ml

TABLA 4. continuación.

b).- el ajuste de la energía total de las dietas se realizó mediante lípidos, mientras que los carbohidratos permanecieron fijos. Experimento 2.

DIETA	K	L	M	N	O
No de postlarvas	57	35	41	36	41
Peso de las postlarvas	1.75 g	0.93 g	0.78 g	0.78 g	0.90 g
Peso Promedio de las postlarvas	0.031 g	0.027 ml	0.019 g	0.022 g	0.022 g
Vol. Total de sobrenadante	1.95 ml	4.8 ml	1.8 ml	1.5 ml	2.4 ml

DIETA	P	Q	R	S
No. de Postlarvas	39	22	26	32
Peso de las postlarvas	0.87 g	0.63 g	0.79 g	1.11 g
Peso Promedio de las Postlarvas	0.022 g	0.029 g	0.030 g	0.035 g
Vol. Total de Sobrenadante	2.8 ml	3.60 ml	4.0 ml	1.45 ml

TABLA 5. NUMERO, VOLUMEN TOTAL DE SOBRENADANTE Y PESO PROMEDIO EMPLEADOS PARA LOS ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS POSTLARVAS, JUVENILES Y ADULTOS DE *Penaeus setiferus* DEL MEDIO NATURAL QUE SE EMPLEARON PARA EL EXTRACTO ENZIMÁTICO

ETAPA	POSTLARVAS	JUVENILES	ADULTO (3)	ADULTO (4)	ADULTO (5)	ADULTO (6)
No. de organismos	270	34 (CABEZAS)	1	1	1	1
Peso de los organismos	14.22 g	49.8 g	1.59 g	1.62 g	1.13 g	0.84 g
Peso promedio de los organismos	0.053 g	1.4647 g	1.59 g	1.62 g	1.13 g	0.84 g
Vol. total de sobrenadante	28.44 ml	150 ml	7.95 ml	8.1 ml	5.65 ml	4.2 ml

TABLA 6. CONTENIDO DE PROTEÍNAS DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS DE LAS POSTLARVAS DE *Penaeus setiferus* ALIMENTADAS CON DIETAS PURIFICADAS

a).- El ajuste de la energía total de las dietas se realizó mediante carbohidratos, los lípidos se mantuvieron fijos en 8.5 % Experimento 1.

DIETAS				
A	B	C	D	E
0.72	20.39	4.82	15.92	21.45
0.67	19.67	4.57	16.21	21.65
0.77	20.66	4.84	16.21	20.56
0.69	20.86		16.02	20.06
	21.55			20.47
	20.36			17.80
	21.65			19.73
$x = 0.71 + 0.037$	$x = 20.73 + 0.64$	$x = 4.74 + 0.12$	$x = 16.09 + 0.13$	$x = 20.25 + 1.18$

DIETAS				
F	G	H	I	J
0.74	19.87	8.71	5.19	7.61
0.76	18.88	8.12	5.64	7.37
0.77	19.47	8.71	5.59	7.56
0.78				7.14
0.79				7.41
0.85				7.71
0.74				
0.70				
0.79				
0.83				
$x = 0.77 + 0.042$	$x = 19.41 + 0.40$	$x = 8.51 + 0.28$	$x = 5.47 + 0.2$	$x = 7.47 + 0.19$

* contenido de proteína total expresado en mg/ml.

Tabla 6. continuación.

b).- El ajuste de la energía total de las dietas se realizó mediante lípidos, mientras que los carbohidratos permanecieron fijos. Experimento 2

DIETAS			
K	L	M	N
15.92	5.0	8.3	7.86
15.52	4.9	8.4	8.01
16.90	4.4	8.45	7.71
16.45	4.35		
15.46	4.25		
16.20	4.55		
$x = 16.08 + 0.51$	$x = 4.58 + 0.28$	$x = 8.39 + 0.061$	$x = 7.86 + 0.12$

DIETAS				
O	P	Q	R	S
7.22	4.95	2.94	3.29	10.68
7.51	4.95	3.42	3.24	11.18
8.01	4.9	2.92	3.46	10.88
6.87		3.71	3.29	
6.58		2.94	3.24	
7.46		3.31	3.26	
8.35		2.79		
8.45		2.88		
$x = 7.66 + 0.66$	$x = 4.93 + 0.023$	$x = 3.11 + 0.30$	$x = 3.3 + 0.076$	$x = 10.91 + 0.20$

* contenido de proteína total expresado en mg/ml.

TABLA 7. CONTENIDO DE PROTEÍNAS DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS DE LAS POSTLARVAS, JUVENILES Y ADULTOS DE *Penaeus setiferus* DEL MEDIO NATURAL.

POSTLARVAS	JUVENILES	ADULTO (3)	ADULTO (4)	ADULTO (5)	ADULTO (6)
0.87	7.48	4.65	7.73	5.51	4.65
1.44	7.73	5.16	7.83	5.21	4.74
1.19	7.31	6.18	7.22	5.64	4.75
1.11		4.55	9.14	5.59	5.04
		3.57	10.49	5.05	2.78
		3.77	9.00	7.13	4.57
$\bar{x} = 1.15 \pm 0.20$	$\bar{x} = 7.51 \pm 0.17$	$\bar{x} = 4.65 \pm 0.87$	$\bar{x} = 8.57 \pm 1.10$	$\bar{x} = 5.69 \pm 0.68$	$\bar{x} = 4.42 \pm 0.75$

Contenido de proteína total expresado en mg/ml

En las dietas de alta energía (4 kcal/g), la mayor actividad se obtuvo con 30 % de proteínas (200.1 ± 28.3 U/mg de proteína), ésta presenta diferencias significativas con los demás tratamientos ($P < 0.05$) de alta energía

EXPERIMENTO 2 - Efecto de la variación del contenido de proteína El ajuste de la energía de las dietas se realizó mediante lípidos

No hay una relación lineal del alimento sobre la actividad de proteinasas para este experimento, sin embargo el análisis de rangos múltiples de Duncan ($P < 0.05$) nos muestra que existe un efecto de la variación del porcentaje de proteína sobre la actividad proteolítica, presentando una influencia directa de la energía sobre esta actividad, esto nos indica que hay una relación del nivel de proteína con el nivel de energía sobre la actividad de proteinasas

Los resultados de la actividad proteolítica total de postlarvas de *Penaeus setiferus* (PL₄₀) se presentan en la tabla 8. En las dietas de alta energía (4 kcal/g) la actividad de proteinasas mayor se obtuvo con 50 % de proteínas, (81.04 ± 14.37 U/mg de proteína) este valor presenta diferencias significativas con los otros tratamientos ($P < 0.05$) (Fig. 7)

Por otro lado en las dietas de baja energía (3kcal/g), se presentaron dos picos de actividad: uno con 20 % de proteína, (107.5 ± 11.02) y otro con 50 % de proteína, (103.1 ± 15.45) estos tratamientos mostraron diferencias significativas con respecto a los otros ($P < 0.05$) (Fig. 7)

B) MEDIO NATURAL

La actividad de proteinasas obtenida para las postlarvas (tabla 8), fue de 342.23 ± 79.18 U/mg de proteína, para los juveniles (cabezas) fue de 1652.88 ± 172.07 U/mg de proteína, la de los adultos (hepatopáncreas) fluctuó de 12032.25 ± 648.81 a 41778.77 ± 12564.24 U/mg de proteína (Fig. 8)

QUIMOTRIPSINA

A) CONDICIONES CONTROLADAS

EXPERIMENTO 1 -

Tanto en las dietas de alta y con baja energía (Tabla 9) no se observó una correlación lineal entre la actividad de quimotripsina y los niveles proteícos. Sin embargo

TABLA 8 ACTIVIDAD PROTEOLITICA TOTAL DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS DE LAS POSTLARVAS DE *Penaeus setiferus* DE CONDICIONES CONTROLADAS (experimento 1 y 2) Y DEL MEDIO NATURAL. Expresada en u/mg de proteína PROMEDIO \pm ERROR ESTANDAR

PORCENTAJE DE PROTEINA		EXPERIMENTO 1	EXPERIMENTO 2	MEDIO NATURAL		
EN LA DIETA	ALTA ENERGIA (4 kcal/g)	BAJA ENERGIA (3 kcal/g)	ALTA ENERGIA (4 kcal/g)	BAJA ENERGIA (3 kcal/g)	ETAPA	ACTIVIDAD u/mg de proteina
20	77.1 \pm 24.06 ^a	35.7 \pm 2.22 ^a	32.5 \pm 2.73 ^a	107.5 \pm 11.02 ^b	POSTLARVAS	342.2 \pm 79.2
30	200.1 \pm 28.3 ^c	69.1 \pm 11.94 ^a	26.6 \pm 2.99 ^a	22.05 \pm 4.29 ^a	JUVENILES	1652.9 \pm 172.1
40	37.7 \pm 7.45 ^a	51.6 \pm 50.22 ^c	26.4 \pm 2.91 ^a	46.8 \pm 3.22 ^a	ADULTO	16117.8 \pm 3060.4
50	45.2 \pm 1.67 ^a	44 \pm 4.3 ^a	81.04 \pm 14.3 ^{bc}	103.1 \pm 15.45 ^b	ADULTO	12032.2 \pm 648.8
60	52.1 \pm 5.66 ^a	113.5 \pm 3.8 ^{bc}	33.2 \pm 4.2 ^a		ADULTO	4177.8 \pm 12564.2
					ADULTO	29884.4 \pm 1262.9

Supradíndices distintos indican diferencias significativas (P<0.05)

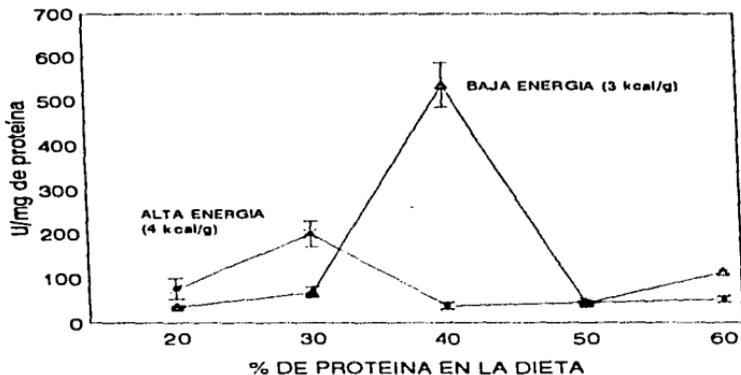


Fig. 6 Actividad de proteinasas totales de las postlarvas de *P. setiferus* alimentadas con dietas purificadas. El ajuste de la energía total de las dietas se realizó mediante carbohidratos, los lípidos fijos en 8.5%. Expresada en u/mg de prot. (Exp. 1) Las barras verticales representan la D.S.

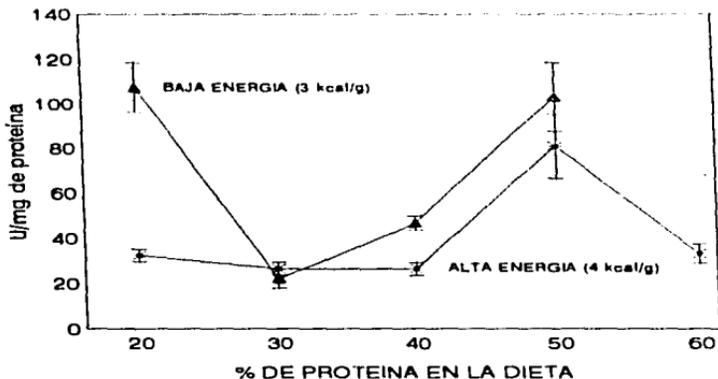


Fig. 7 Actividad de proteinasas totales de las postlarvas de *P. setiferus* alimentadas con dietas purificadas. El ajuste de la energía total de las dietas se realizó mediante lípidos. Expresada en u/mg de prot. (Exp. 2) Las barras verticales representan la D.S.

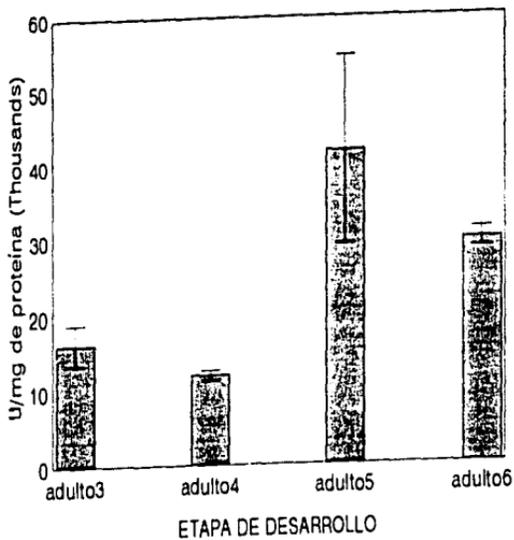


Fig. 8 actividad proteínica total de los extractos enzimáticos de adultos de *Penaeus seberus* del medio natural. Expresada en u.mg de proteína. Las barras verticales representan la desviación estándar.

el análisis multifactorial refleja que la variación de la proteína, junto con el nivel de energía, influyen sobre la actividad de la quimotripsina en las postlarvas de *Penaeus setiferus* ($P < 0.05$)

La actividad específica obtenida en las dietas de alta energía (4 kcal/g), (tabla 9), muestra que la mayor actividad se obtuvo con la dieta con 30 % de proteína, ($145.1 \times 10^{-3} \pm 8.3 \times 10^{-3}$ U/mg de proteína) Las actividades se observan en la Fig. 9

En las dietas de baja energía (3 kcal/g) (Fig 9) La mayor actividad correspondió a la dieta con 40 % de proteína ($97.9 \times 10^{-3} \pm 3.25 \times 10^{-3}$ U/mg de proteína) Esto muestra el efecto de la influencia de la energía y del contenido de proteína, ya que presenta diferencias significativas con los demás tratamientos de baja energía y también con los de alta energía

EXPERIMENTO 2 -

La variación de los lípidos y las proteínas dietéticas afectaron significativamente la actividad de quimotripsina de las postlarvas de *Penaeus setiferus* (Fig 10)

Los resultados de la actividad obtenida para esta enzima fueron mayores en dos niveles de proteína para las dietas de baja energía (3 kcal/g) comparados con los obtenidos en las dietas de alta energía (tabla 9)

Para las dietas de baja energía (3 kcal/g), la actividad más elevada se obtuvo con 20 % de proteínas, siguiéndola el tratamiento con 40 % de proteína

En las dietas con alta energía (4kcal/g) se observa una tendencia de aumento de la actividad quimotriptica conforme se incrementó el contenido protéico de las dietas hasta 50 % de proteínas y luego disminuyó significativamente en 60 % de proteínas.

El tratamiento más elevado significativamente fue el de 20 % de proteína y 3 kcal/g.

B) MEDIO NATURAL

Con respecto a la actividad de la quimotripsina para las postlarvas (tabla 9) fue de 0.012 ± 0.0008 U/mg de proteína, para los juveniles se obtuvo una actividad de 0.7 ± 0.005 U/mg de proteína y para los adultos los valores se presentaron entre 1.03 ± 0.12 a 4.81 ± 0.26 U/mg de proteína. (Fig. 11).

TABLA 9 ACTIVIDAD DE QUIMOTRIPSINA DE LOS EXTRACTOS ENZIMATICOS DE LAS POSTLARVAS DE *Penaeus setiferus* DE CONDICIONES CONTROLADAS (experimento 1 y 2) Y DEL MEDIO NATURAL PROMEDIO \pm ERROR ESTANDAR

PORCENTAJE DE PROTEINA	EXPERIMENTO 1*	EXPERIMENTO 2*			MEDIO NATURAL	
EN LA DIETA	ALTA ENERGIA (4 kcal/g)	BAJA ENERGIA (3 kcal/g)	ALTA ENERGIA (4 kcal/g)	BAJA ENERGIA (3 kcal/g)	ETAPA	ACTIVIDAD μ mg de proteina
20	52 \pm 0.2 ¹	57 \pm 0.26 ²	28 \pm 0.07 ^{2d}	14.54 \pm 1.7 ^{2d}	POSTLARVAS	0.012 \pm 0.0005
30	145.1 \pm 8.3 ¹	21.54 \pm 7.2 ^{1ab}	3.0 \pm 0.007 ^{2b}	1.57 \pm 0.04 ^{2b}	JUVENILES	0.7 \pm 0.005
40	2.9 \pm 0.35 ^{1c}	97.9 \pm 3.25 ^{1c}	4.1 \pm 0.2 ^{2cd}	9.67 \pm 0.6 ^{2c}	ADULTO	3.01 \pm 0.14
50	6.8 \pm 0.4 ^{1c}	1.35 \pm 0.39 ^{1c}	4.5 \pm 0.12 ^{2d}	0.501 \pm 0.04 ^{2c}	ADULTO	1.03 \pm 0.12
60	2.2 \pm 0.26 ^{1c}	35.33 \pm 8.23 ^{1c}	1.1 \pm 0.18 ^{2d}		ADULTO	1.89 \pm 0.12
					ADULTO	4.81 \pm 0.26

*actividad expresada en μ mg de proteina X 10³

Supraindices distintos indican diferencias significativas (P<0.05)

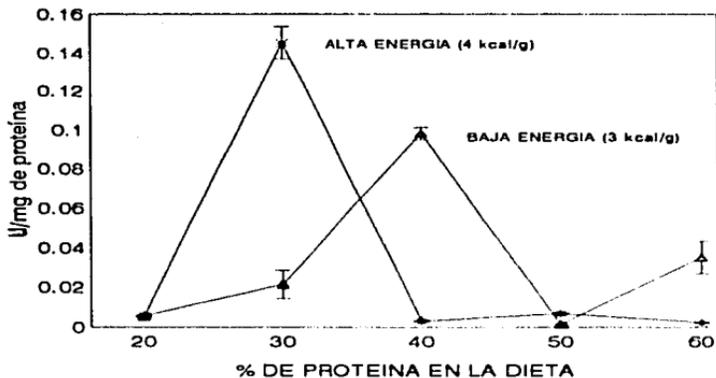


Fig. 9 Actividad de quimotripsina de las postarvas de *P. setiferus*, alimentadas con dietas purificadas. El ajuste de la energía total de las dietas se realizó mediante carbohidratos, los lípidos fijos en 0.5 %. Expresado en u/mg de prot. (Exp. 1). Las barras verticales representan la D.S.

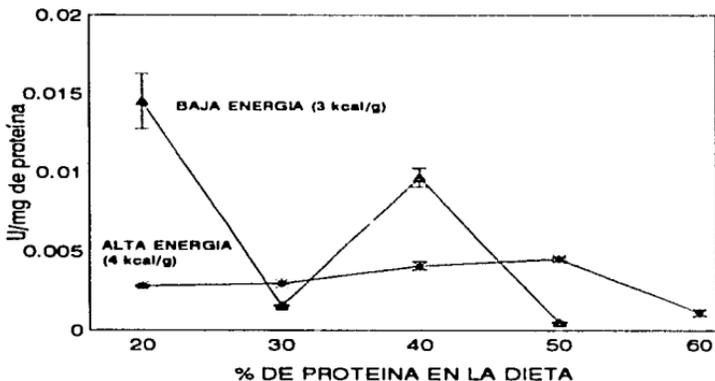


Fig.10 Actividad de quimotripsina de las postarvas de *P. setiferus*, alimentadas con dietas purificadas. El ajuste de la energía total de las dietas se realizó mediante lípidos. Expresada en u/mg de prot. (Exp. 2). Las barras verticales representan la D.S.

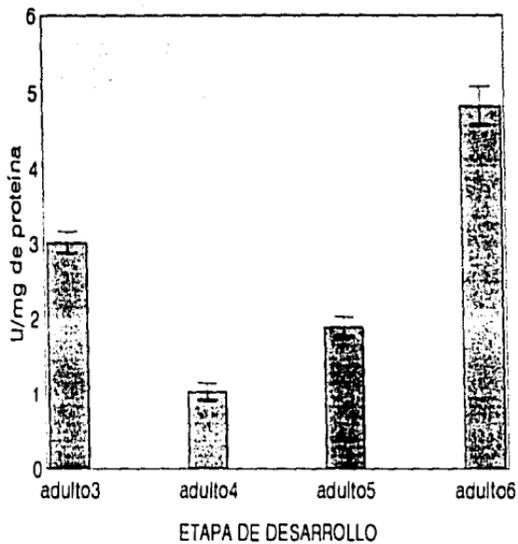


Fig. 11 Actividad de quimotripsina de los extractos enzimáticos de adultos de *Penaeus seiferus* del medio natural. Expresada en u/mg de proteína. Las barras verticales representan la desviación estandar.

TRIPSINA

A) CONDICIONES CONTROLADAS

EXPERIMENTO 1 -

En general no hay un patrón lineal de aumento o disminución al variar los niveles proteicos. Sin embargo se observó un pico de máxima actividad en 40 % de proteína y 3 kcal/g demostrando un claro efecto de la variación del contenido de proteína y del nivel de energía.

La variación de esta actividad para las dietas de alta energía (4 kcal/g) se presenta en la tabla 10, siendo la más alta la dieta con 30 % de proteína, (1.16 ± 0.054 U/mg de proteína) presentando diferencias significativas con los demás tratamientos ($P < 0.05$) (Fig 12)

Para las dietas de baja energía (3 kcal/g) los datos se observan en la tabla 10, Fig 12.

EXPERIMENTO 2 -

El nivel de proteína afectó significativamente la actividad de tripsina ($P < 0.05$) y también se presentó una interacción de la relación entre las proteínas y la energía de las dietas y en la actividad de esta enzima ($P < 0.05$) (Fig 13)

En los tratamientos de alta energía (4 kcal/g) se presentó la máxima actividad con 20 % de proteína, (0.26 ± 0.028 U/mg de proteína) y disminuyó conforme aumentó el nivel de proteína, presentando diferencias significativas en la actividad al cambiar el nivel de inclusión de las proteínas ($P < 0.05$). Los valores obtenidos en estas dietas resultaron menores que los correspondientes a los alimentos con baja energía.

En las dietas con baja energía (3 kcal/g) tabla 10, Fig 13, la actividad de tripsina de los tratamientos con 20 y 40 % de proteína resultaron ser los mayores.

B) MEDIO NATURAL

La actividad de la tripsina en el extracto enzimático de las postlarvas del medio natural no se midió, porque se le formó un precipitado blanco que, a pesar de centrifugarlo, interfería con las mediciones.

TABLA 10 ACTIVIDAD DE TRIPSINA DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS DE LAS POSTLARVAS DE *Penaeus setiferus* DE CONDICIONES CONTROLADAS (experimento 1 y 2) Y DEL MEDIO NATURAL Expresado en u/mg de proteína PROMEDIO \pm ERROR ESTANDAR

PORCENTAJE DE PROTEINA	EXPERIMENTO 1		EXPERIMENTO 2		MEDIO NATURAL	
EN LA DIETA	ALTA ENERGIA (4 kcal/g)	BAJA ENERGIA (3 kcal/g)	ALTA ENERGIA (4 kcal/g)	BAJA ENERGIA (3 kcal/g)	ETAPA	ACTIVIDAD u/mg de proteína
20	0.39 \pm 0.022 ^{bc}	0.31 \pm 0.069 ^c	0.26 \pm 0.028 ^c	0.36 \pm 0.011 ^c	POSTLARVAS	—
30	1.16 \pm 0.054 ^d	0.30 \pm 0.016 ^c	0.18 \pm 0.027 ^c	0.96 \pm 0.006 ^d	JUVENILES	2.8 \pm 0.4
40	0.961 \pm 0.017 ^{cd}	2.7 \pm 0.078 ^d	0.22 \pm 0.001 ^{bc}	0.33 \pm 0.006 ^d	ADULTO	145.06 \pm 14.8
50	0.4 \pm 0.017 ^{cd}	0.52 \pm 0.015 ^c	0.18 \pm 0.004 ^c	0.08 \pm 0.005 ^c	ADULTO	26.04 \pm 1.4
60	0.48 \pm 0.022 ^{bc}	0.98 \pm 0.026 ^d	0.12 \pm 0.021 ^c		ADULTO	74.2 \pm 10.7
					ADULTO	99.4 \pm 12.3

Supraindices distintos indican diferencias significativas (P<0.05).

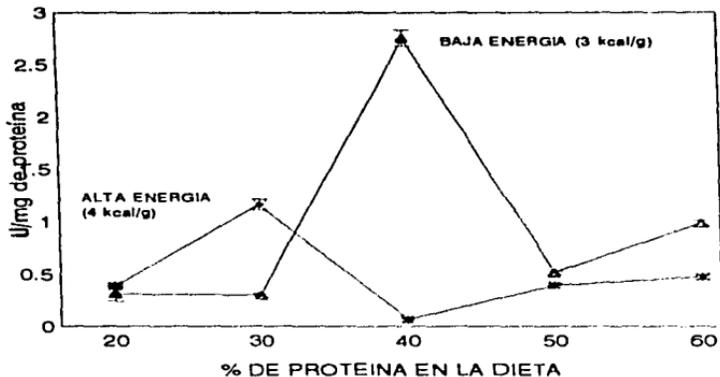


Fig. 12 Actividad de tripsina de las postarvas de *P. setiferus*, alimentadas con dietas purificadas. El ajuste de la energía total de las dietas se realizó mediante carbohidratos, los lípidos fijos en 8.5 %. Expresada en u/mg de prot. (Exp. 1). Las barras verticales representan la D.S.

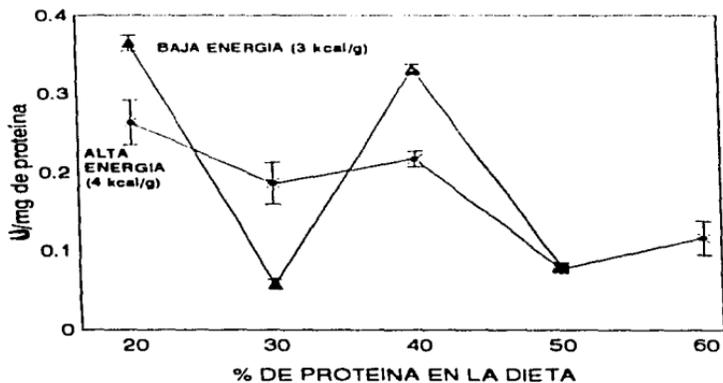


Fig. 13 Actividad de tripsina de las postarvas de *P. setiferus*, alimentadas con dietas purificadas, el ajuste de la energía total de las dietas se realizó mediante lípidos. Expresada en u/mg de prot. (Exp. 2). Las barras verticales representan la D. S.

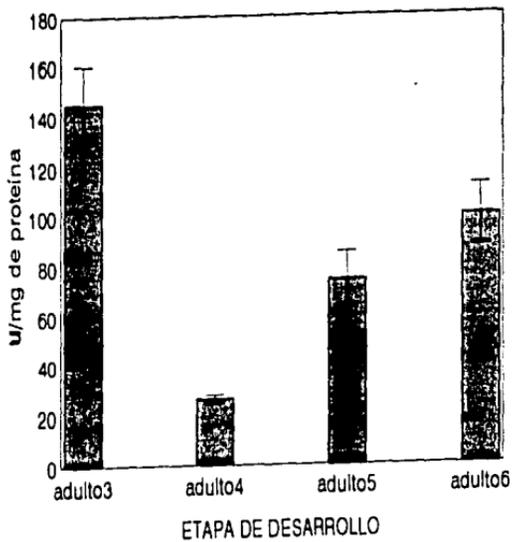


Fig. 14 Actividad de tripsina de los extractos enzimáticos de adultos de *Penaeus setiferus* del medio natural. Expresada en μg de proteína. Las barras verticales representan la desviación estándar.

Para los juveniles fue de 2.8 ± 0.4 U/mg de proteína y en los adultos los valores se presentaron entre 26.04 ± 1.4 a 145.06 ± 14.8 U/mg de proteína (Fig.14).

α -AMILASA

A) CONDICIONES CONTROLADAS

EXPERIMENTO 1 -

Los cambios en el nivel protéico de las dietas así como la variación del nivel de energía influyeron de manera significativa sobre la actividad de α -amilasa ($P < 0.05$) tabla 11 (Fig. 15), aunque no se observó una correlación lineal al variar los niveles de proteína y de energía. En los tratamientos de alta energía (4 kcal/g) (Fig. 15) la actividad más alta se observó con 60 % de proteína, ($16.57 \times 10^2 \pm 0.18 \times 10^2$) y con 30 % de proteína, ($15.85 \times 10^2 \pm 3.48 \times 10^2$ U/mg de proteína). Sin embargo estadísticamente no existen diferencias significativas con los otros niveles protéicos ($P > 0.05$) de alta energía.

Para los tratamientos de baja energía (3 kcal/g) la influencia de la energía y del nivel protéico se manifestó en 40 % de proteínas, ($98.34 \times 10^2 \pm 5.53 \times 10^2$ U/mg de proteína), mientras que las otras cuatro dietas no mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$) (Fig. 15).

EXPERIMENTO 2 -

La actividad de la α -amilasa se vio influenciada por la variación del nivel protéico de las postlarvas de *Penaeus setiferus* ($P < 0.05$) y además se presentó una interacción con la energía dietética (Fig. 16).

En las dietas de alta energía (4 kcal/g) (tabla 11) la actividad incrementó conforme aumentó la proteína en la dieta hasta el tratamiento con 40 % de proteína ($18.03 \times 10^2 \pm 0.72 \times 10^2$ U/mg de proteína), disminuyendo en 60 % de proteína ($6.53 \times 10^2 \pm 0.28 \times 10^2$ U/mg de proteína).

Para las dietas de baja energía (3 kcal/g) (tabla 11) también aumentó la actividad amilolítica observándose la máxima con 40 % de proteína, ($15.88 \times 10^2 \pm 0.0061$ U/mg de proteína).

TABLA 11 ACTIVIDAD DE α -AMILASA DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS DE LAS POSTLARVAS DE *Penaeus setiferus* DE CONDICIONES CONTROLADAS (experimento 1 y 2) Y DEL MEDIO NATURAL. PROMEDIO \pm ERROR ESTANDAR.

PORCENTAJE DE PROTEINA		EXPERIMENTO 1*		EXPERIMENTO 2*		MEDIO NATURAL	
EN LA DIETA	ALTA ENERGIA (4 kcal/g)	BAJA ENERGIA (3 kcal/g)	ALTA ENERGIA (4 kcal/g)	BAJA ENERGIA (3 kcal/g)	ETAPA	ACTIVIDAD μ mg de proteasa	
20	9.51 \pm 0.45 ^a	5.96 \pm 0.18 ^a	9.99 \pm 0.49 ^a	12.72 \pm 1.02 ^{ab}	POSTLARVAS	197.5 \pm 14.38	
30	15.85 \pm 3.48 ^a	6.49 \pm 0.17 ^a	12.07 \pm 0.28 ^{ab}	11.83 \pm 0.29 ^a	JUVENILES	43.9 \pm 23.4	
40	5.07 \pm 0.15 ^a	98.34 \pm 5.53 ^b	18.03 \pm 0.72 ^a	15.88 \pm 0.61 ^a	ADULTO	3978.7 \pm 91.05	
50	7.87 \pm 0.33 ^a	8.15 \pm 0.34 ^a	16.39 \pm 1.25 ^a	15.10 \pm 1.72 ^a	ADULTO	2043.6 \pm 83.01	
60	16.57 \pm 0.18 ^a	11.47 \pm 0.15 ^a	6.53 \pm 0.28 ^a		ADULTO	5116.4 \pm 461.7	
					ADULTO	2791.6 \pm 117.1	

*actividad expresada en μ mg de proteasa $\times 10^3$.

Suprandices distintos indican diferencias significativas (P<0.05)

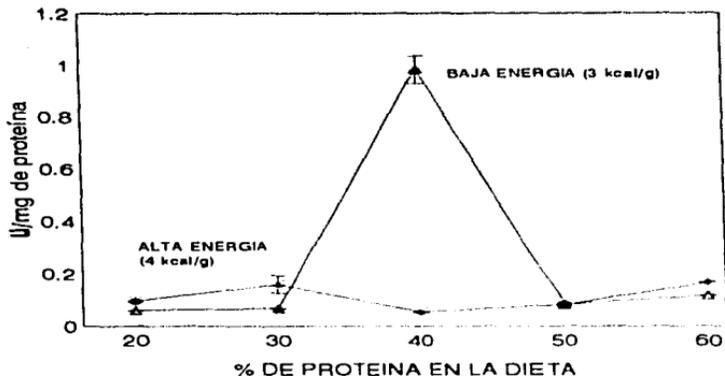


Fig. 15 Actividad de alfa-amilasa de las postlarvas de *P. setiferus* alimentadas con dietas purificadas. El ajuste de la energía total de las dietas se realizó mediante carbohidratos. Lípidos fijos en 0.5 %. Expresada en u/mg de prot. (Exp. 1). Las barras verticales representan la D. S.

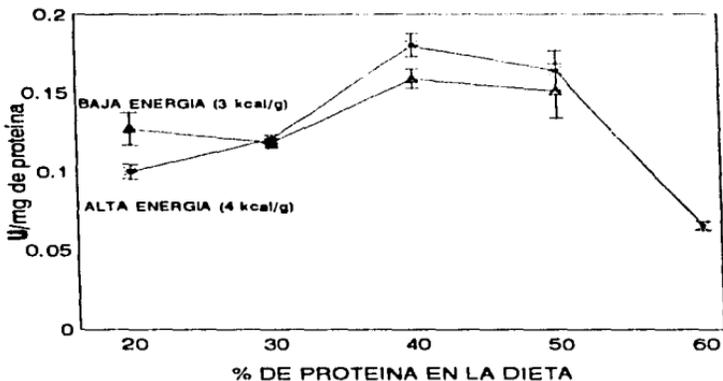


Fig. 16 Actividad de alfa-amilasa de las postlarvas de *P. setiferus*, alimentadas con dietas purificadas. El ajuste de la energía total de las dietas se realizó mediante lípidos. Expresada en u/mg de prot. (Exp. 2). Las barras verticales representan la D. S.

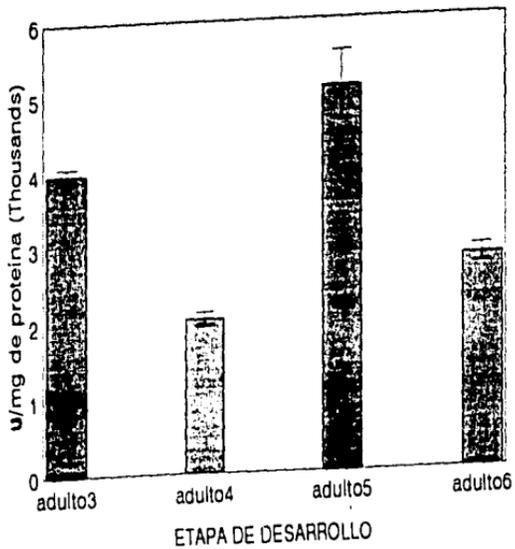


Fig. 17 Actividad de alfa-amilasa de los extractos enzimáticos de adultos de *Penaeus setiferus* del medio natural. Expresada en u/mg de proteína. Las barras verticales representan la desviación estandar.

B) MEDIO NATURAL

La actividad de la α -amilasa (tabla 11) fue de 197.5 ± 14.4 u/mg de proteína para las postlarvas, en juveniles la actividad fue de 743.9 ± 23.4 U/mg de proteína y para los adultos los valores oscilaron entre 2043.6 ± 83.01 a 5116.4 ± 461.7 U/mg de proteína. (Fig. 17).

La prueba de t (de student) se realizó para detectar diferencias significativas de las diversas actividades de enzimas digestivas evaluadas (proteinasas totales, quimotripsina, tripsina y α -amilasa) de las postlarvas de condiciones controladas y de las del medio natural. Particularmente las dietas que presentaron la mayor actividad de proteinasas, quimotripsina, tripsina y α -amilasa, es decir la dieta C (alta energía, 4 kcal/g) con 30 % de proteína, 47.58 % de carbohidratos y 8.5 % de lípidos y la dieta F (baja energía, 3 kcal/g) con 40 % de proteína, 11.47 % de carbohidratos y 8.5 % de lípidos. En la tabla 12 se presentan los resultados de la actividad enzimática de las postlarvas del medio natural y de condiciones naturales. Se encontró que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las postlarvas de *Penaeus setiferus* bajo condiciones controladas con las silvestres (Figs. 18, 19 y 20).

Tabla 12. Actividad enzimática de las postlarvas del medio natural y de condiciones controladas (que presentaron las más alta actividad)

Postlarvas de condiciones controladas	PROTEINASAS TOTALES u/mg de proteína.	TRIPSINA u/mg de proteína.	QUIMOTRIPSINA (u/mg de proteína) $\times 10^3$	α -AMILASA u/mg de proteína	RELACION (A/P) $\times 10^3$
Dieta C 30 % de proteína Alta energía (4 kcal/g)	200.1 ± 69.3	1.16 ± 0.18	145.1 ± 23.5	0.16 ± 0.08	0.79
Dieta F 40 % de proteína Baja energía (3 kcal/g)	536.1 ± 123	2.8 ± 0.11	97.9 ± 4.6	0.98 ± 0.15	1.83
Postlarvas del medio natural	342.2 ± 79.2	-----	12.0 ± 0.79	197.52 \pm 14.38	577.1

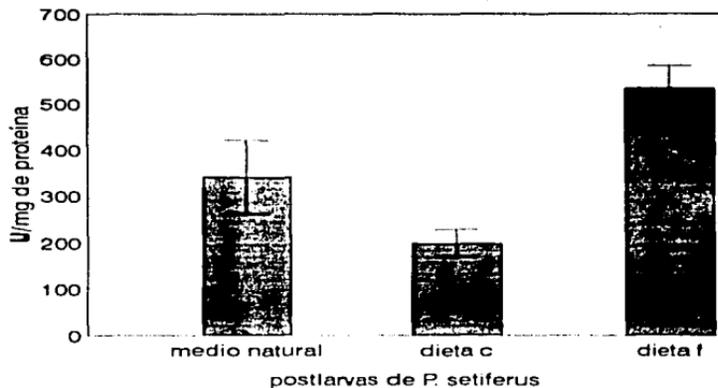


Fig. 18 Actividad proteínasa total de los extractos enzimáticos de postlarvas de *Penaeus setiferus* de condiciones controladas y del medio natural.

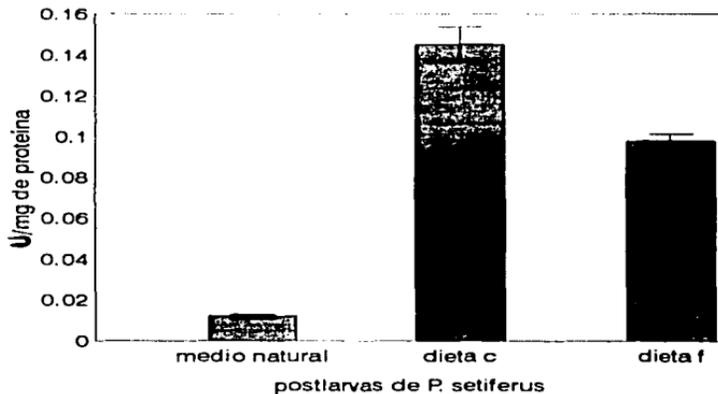


Fig. 19 Actividad de quimotripsina de los extractos enzimáticos de postlarvas de *Penaeus setiferus* de condiciones controladas y del medio natural.

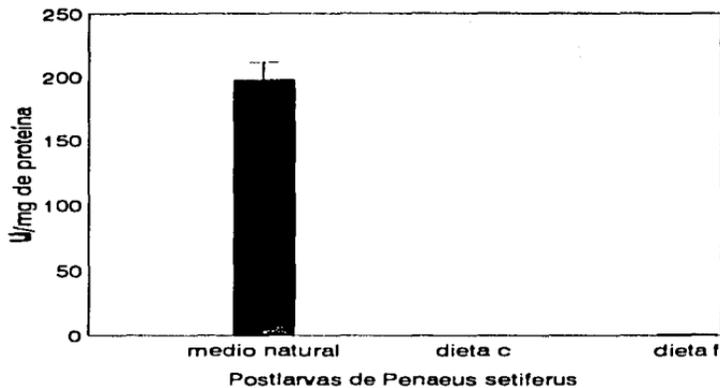


Fig. 20 Actividad de alfa-amilasa de los extractos enzimáticos de postlarvas de *Penaeus setiferus* de condiciones controladas y del medio natural

DISCUSION

Las enzimas detectadas para los camarones crecidos en condiciones controladas postlarvas de 40 días (P1.aa) y silvestres (postlarvas, juveniles y adultos) de *P. setiferus* en este trabajo han sido identificadas, determinadas y caracterizadas en otros crustáceos (Tsai *et al.* 1986, Van Wormhoudt 1988, Tsai *et al.* 1991, Garcia-Carreño 1992, Vega-Villasante *et al.* 1993, Glass y Stark 1994 y Vega-Villasante *et al.* 1995)

En los crustáceos y específicamente en algunas especies de peneidos la quimotripsina no se ha detectado o es muy baja, sin embargo, Tsai *et al.* (1986 y 1991) demostraron la presencia de quimotripsina en el hepatopáncreas, estómagos e intestinos de los camarones que estudiaron *Penaeus monodon*, *P. japonicus*, *P. penicillatus*, *Macrobrachium monoceros* y *M. rosenbergi*, concluyendo que depende de la utilización de sustratos muy específicos para detectar la actividad de esta enzima Forrellat *et al.* (1990) plantean que en peneidos la actividad de la tripsina es muy alta y la de la quimotripsina es muy baja, esto coincide con los resultados obtenidos para este trabajo.

Como mostró el análisis estadístico de los datos obtenidos en este trabajo, la combinación del contenido de proteínas y el ajuste del nivel de energía mediante carbohidratos o lípidos en la dieta produjo variaciones en las actividades enzimáticas digestivas medidas en las postlarvas de 40 días de *P. setiferus*, aunque no existe una correlación lineal entre las actividades enzimáticas con el contenido de proteína y el nivel de energía.

La evaluación del efecto de la relación entre el contenido de proteínas de la dieta y el nivel de energía, manteniendo fijos los lípidos (experimento 1) mostró que en las dietas de baja energía (3 kcal/g) el pico más alto de actividad de tripsina, quimotripsina, α -amilasa y proteinasas totales se obtuvo con 40 % de proteínas, mientras que en las dietas de alta energía (4 kcal/g) las mayores actividades se obtuvieron con 30 % de proteínas.

Los resultados del experimento 1 (Tablas 8, 9, 10 y 11; Figs 6, 9, 12 y 15) nos indican que existe un efecto de la dieta sobre las actividades enzimáticas digestivas al variar el contenido de proteína y el nivel de energía en las dietas isolipídicas. En general no se observó una relación lineal, es decir no correspondió un aumento constante en las actividades enzimáticas al aumentar el nivel de proteínas en la dieta. Sin embargo, es claro que las mayores actividades no se distribuyen de manera aleatoria, sino que se agrupan en un pico diferente para cada nivel de energía. Es interesante hacer notar que las actividades (proteinasas totales, tripsina y α -amilasa) obtenidas con 40 % de proteínas y bajo nivel de energía (3 kcal/g) son, en general mucho mayores que las obtenidas con 30 % de proteínas

y alto nivel de energía (4 kcal/g), con excepción de la actividad de quimotripsina, que resultó más alta con esta última dieta. Los resultados de la actividad de las enzimas digestivas para el experimento 1 demuestran que la dieta con 40 % de proteína y baja energía (3 kcal/g) coinciden con los requerimientos nutricionales (mayor crecimiento 0.6 % de mg día⁻¹, la más alta sobrevivencia 65 % y el más alto incremento relativo de la biomasa (IRB)) según los datos de Gaxiola (1994).

La evaluación del efecto de la relación entre el contenido de proteínas de la dieta y el nivel de energía, manteniendo fijos los carbohidratos (experimento 2, Tablas 8, 9, 10 y 11 Figs. 7, 10, 13 y 16) reveló una dispersión importante de los datos, en comparación con los del experimento 1 (Figs. 6, 9, 12 y 15). Aunque el análisis estadístico muestra algunas diferencias que son significativas, no existe un patrón claro, fácil de interpretar como en el caso de las dietas isolipídicas. Es importante hacer notar que, sin excepción, los valores de actividad más altos obtenidos con las dietas isolipídicas son significativamente menores que los obtenidos con las dietas del experimento 1, en algunos casos hasta en un orden de magnitud.

Aunque los resultados de la actividad enzimática no demuestran una coincidencia o correlación con los requerimientos nutricionales (Gaxiola, 1994) como en el caso anterior es importante destacar que se observó que la dieta con 20 y 60 % de proteína y alta energía (4 kcal/g) fueron los resultados en crecimiento y sobrevivencia los más bajos comparados con los otros tratamientos (la más baja sobrevivencia 26.3 y 30.9, peso promedio de 0.021 y 0.036 g respectivamente) (Gaxiola, 1994). Con respecto a las dietas de baja energía (3 kcal/g) se observó que la dieta con 60 % de proteína y baja energía (3 kcal/g) fue la más baja y presentó diferencias significativas con los otros tratamientos con respecto a los requerimientos nutricionales, tuvo la más baja supervivencia (29.1 %) y el peso promedio (0.052 g) no fue muy comparado con las otras dietas. Estos resultados reflejan un efecto de la concentración de proteínas y de los carbohidratos en la dieta. Así como lo plantea Van Wormhoudt (1980) para *Polacmon serratus* donde plantea que las dietas ricas en carbohidratos y pobres en proteína producen un crecimiento pobre y una alta mortalidad, lo mismo sucede con alimentos que contienen una alta concentración de proteína.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la combinación del contenido de proteína con el nivel de energía producen variaciones en la actividad enzimática aunque ésta no presentó un patrón lineal. Esto coincide con los reportes de Hoyle (1973) donde evaluó la actividad específica de la amilasa, proteinasas generales y lipasas para examinar la adaptación digestiva a diferentes niveles de almidón en la dieta de *Homarus americanus*, aunque no mostró una adaptación significativa, observó un aumento

general en cada una de esas actividades, sugiriendo que es probable que la adaptación ocurra. También Van Wormhoudt *et al.* (1980) para *Palaemon serratus*, reportó que la mejor tasa de crecimiento para los animales que pesan entre 80 y 380 mg, se obtiene con una dieta que contiene 3.5 % de carbohidratos y 60 % de proteína, las dietas que son ricas en carbohidratos y pobres en proteína dan por resultado un pobre crecimiento y alta mortalidad, lo mismo ocurre para alimentos que contienen una alta concentración de proteína. Concluye que las variaciones en el peso húmedo del hepatopáncreas y en las actividades de enzimas digestivas totales están unidas a las variaciones en la tasa del crecimiento del camarón.

Lee y Lawrence (1984) determinaron que el tamaño del camarón, la fuente y el nivel de proteína en la dieta afecta en alguna medida la actividad proteolítica en *Penaeus vannamei*. En otro trabajo Lee y Lawrence (1985) examinaron el efecto del cambio en la dieta y el nivel de proteína sobre la tasa de crecimiento, sobrevivencia, digestibilidad de la proteína y el alimento y la actividad de enzimas digestivas de diferentes tamaños de *P. setiferus*. Realizaron análisis de regresión para comprobar si había un aumento constante entre la dieta con las actividades específicas de proteinasas totales, tripsina, carboxipeptidasa B, quitinasa, amilasa, esterasa no específica y lipasa. El análisis demostró una relación significativa entre estos dos factores. Le Moullac *et al.* (1994) observaron que las actividades de la tripsina, quimotripsina y amilasa en larvas de *Penaeus vannamei* están significativamente afectadas por la calidad del alimento y son independientes del crecimiento. En otro trabajo Van Wormhoudt *et al.* (en prensa) determinaron que el nivel de caseína en la dieta provoca un aumento en la actividad específica de la tripsina mientras que la actividad específica de la amilasa disminuye cuando el nivel de caseína aumenta. Rodríguez *et al.* (1993) analizaron el efecto del alimento vivo y de una dieta artificial microencapsulada sobre la actividad enzimática en larvas de *P. japonicus* concluyendo que existen diferencias entre la actividad de la tripsina en larvas alimentadas con alimento vivo y la dieta artificial sugiriendo que la actividad está influenciada por una respuesta fisiológica a la dieta. En otro trabajo Rodríguez *et al.* (1994) probaron tres tipos de alimento observando que de acuerdo a la dieta suministrada ésta influyó sobre la actividad de la tripsina y la amilasa.

Los trabajos arriba mencionados comprueban que la dieta influye sobre la actividad enzimática en respuesta a diferentes concentraciones de proteína, a diferentes tipos y calidades de alimento lo cual coincide con los resultados reportados en este trabajo. Así se concluye que existe un efecto directo de la dieta al variar el contenido de proteína y el nivel de energía sobre la actividad de las enzimas digestivas evaluadas en este trabajo (proteinasas totales, quimotripsina, tripsina y α -amilasa) sin embargo es probable que

existan otros factores internos y externos del organismo que provocan respuestas diferentes en la actividad enzimática.

La coincidencia que existe entre las más altas actividades enzimáticas y la dieta que promovió la mejor tasa de crecimiento parece de la mayor importancia, ya que podría implicar una asociación entre los niveles de actividades enzimáticas digestivas y el estado fisiológico general de los animales. Entre las implicaciones de esta relación estaría la propuesta de que las bajas actividades que se observaron con otras dietas podrían ser debidas, al menos en parte, a una condición fisiológica deficiente de los animales experimentales. De cualquier manera, estas consideraciones plantean preguntas que sería interesante explorar en experimentos ulteriores.

Con respecto al ciclo de vida para las postlarvas se han descrito diversos sub-estadios, estos son reconocidos en ocasiones por detalles morfológicos difíciles de identificar, así en postlarvas en cultivo se ha convenido nombrar postlarva aquella que viene de la metamorfosis del último sub-estadio de mysis, postlarva 2 al segundo día de ser postlarva y así sucesivamente (Alfonso *et al.* 1993) por lo anterior en los organismos experimentales es posible tener un seguimiento del desarrollo del organismo y determinar con certeza la fase en la cual se encuentra, por otro lado en los organismos silvestres no es posible tener un control del desarrollo por lo que es posible que no se este comparando organismos de la misma edad de desarrollo postlarval.

La comparación de los niveles de actividad de enzimas digestivas de las postlarvas del medio natural con las postlarvas mantenidas con la dieta F (40 % de proteína, 11.47 % de carbohidratos, 8.5 % de lípidos y 3 Kcal/g) la que promovió la mejor tasa de crecimiento) reveló que las enzimas proteolíticas (proteinasas totales y quimotripsina) mostraron niveles similares en ambas poblaciones, o incluso mayores para el caso de las postlarvas experimentales (tabla 12, Figs 18, 19 y 20). En contraste con este hallazgo, la actividad de α -amilasa mostró una gran diferencia, de varios órdenes de magnitud, entre ambas poblaciones. Resulta difícil encontrar una explicación para esta diferencia tan grande, sobre todo en ausencia de datos cuantitativos acerca del nivel de carbohidratos en la dieta natural de estos organismos. Sin embargo no se puede ignorar la información existente en relación con las dietas naturales de estos organismos. Algunos estudios han demostrado que *P. setiferus* es una especie omnívora-herbívoros (McTigue y Zimmerman 1991 y Sánchez *et al.* 1995). Con estos estudios tal vez es posible explicar la alta actividad amilolítica de los organismos del medio natural es decir que en el medio en que habitan su dieta consista básicamente de material vegetal como lo plantean Mc Tigue y Zimmerman (1991) además existen evidencias de su limitada capacidad para degradar quitina (Marín, 1995) lo cual es una evidencia de su baja carnívora, pero no hay que olvidar que no es

posible dar una afirmación absoluta a este respecto porque las fuentes de alimentación varían considerablemente incluso dentro de la misma especie, dependiendo de las condiciones ambientales bajo las cuales se desarrollan y de las distintas fases del ciclo de vida (Fernández *et al* 1988)

Cabe destacar que no es posible la comparación de la actividad específica (proteinasas totales, quimotripsina, tripsina y α -amilasa) en las etapas de desarrollo de *P. setiferus*, porque se utilizaron diferentes partes del cuerpo para obtener el extracto enzimático, postlarvas (organismo completo), juveniles (cabezas) y adultos (hepatopáncreas). Sin embargo se observó que la actividad en general es significativamente baja en postlarvas aumentando en juveniles y adultos. Aunque no hay que olvidar que existen trabajos que reportan el cambio ontogenético de la actividad enzimática (Lovett y Felder, 1989, 1990a, 1990b, y 1990c, Fang y Lee, 1992 y González, Fraga y Carrillo, 1995). En ellos se plantea que los cambios en la actividad enzimática es la respuesta a los cambios en la morfología del sistema digestivo que sufren los organismos, así mismo son un reflejo de los cambios en los hábitos de vida y alimentarios que sufren las larvas y los primeros estadios postlarvales. Sin embargo Lovett y Felder (1990b) concluyeron que aunque existe una correlación de los cambios ontogenéticos en la actividad enzimática con el cambio en los hábitos alimentarios y que este cambio puede ser el producto del desarrollo, el cual puede reflejar una regulación genética temporal de la síntesis de enzimas, más que un cambio en la dieta. A este respecto probablemente sea necesario mayor investigación a nivel molecular y bioquímico que nos permita conocer con precisión los cambios y mecanismos involucrados en la regulación enzimática.

CONCLUSIONES

La evaluación del efecto de la relación entre el contenido de proteínas de la dieta y el nivel de energía, manteniendo fijos los lípidos (experimento 1) mostró que en la dietas de baja energía (3 kcal/g) el pico más alto de actividad de tripsina, quimotripsina, α -amilasa y proteinasas totales se obtuvo con 40 % de proteínas, mientras que en las dietas de alta energía (4 kcal/g) las mayores actividades se obtuvieron con 30 %.

La evaluación del efecto de la relación entre el contenido de proteínas de la dieta y el nivel de energía, manteniendo fijos los carbohidratos (experimento 2) reveló una dispersión importante de los datos, en comparación con el experimento 1, siendo mucho menores las actividades detectadas.

Los resultados de la respuesta nutricional coincide con los de la actividad enzimática esto podría confirmar que los requerimientos óptimos para postlarvas de 40 días de *P. setiferus* se localice a esta concentración de proteína y con este nivel de energía (3 kcal/g) es decir que la dieta sea la más digerible y que refleje una condición fisiológica estable.

La comparación de los niveles de actividad de enzimas digestivas de las postlarvas del medio natural con las postlarvas de la dieta F (40 % de proteína, 11.47 % de carbohidratos, 8.5 % de lípidos y 3 kcal/g) reveló que las enzimas proteolíticas (proteinasas totales y quimotripsina) mostraron niveles similares en ambas poblaciones, o incluso mayores para el caso de las postlarvas experimentales.

La actividad de la α -amilasa en postlarvas silvestres es mucho mayor que los organismos experimentales lo cual indicaría de alguna manera los hábitos alimentarios de estos organismos reportados como omnívoros-herbívoros.

La actividad enzimática proteinasas totales, quimotripsina, tripsina y α -amilasa fue significativamente menor en postlarvas aumentando en juveniles y adultos.

BIBLIOGRAFIA

- Al-Mohanna S.Y., Nott J.A. and Lane D.J.W. 1985a M-Midget cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* de Haan, 1844 (Decapoda, Natantia) **Crustaceana**, 48: 260-268.
- Al-Mohanna S.Y., Nott J.A. and Lane D.J.W. 1985b Mitotic E and secretory F cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* (Crustacea, Decapoda) **J. Mar. Biol. Assoc. U.K.** 65: 901-910
- Al-Mohanna S.Y., Nott J.A. and Lane D.J.W. 1986 B-cells and digestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea, Decapoda) **J. Mar. Biol. Assoc. U.K.** 66: 403-414
- Bautista M. 1986 The response of *Penaeus monodon* juveniles to varying protein/energy ratios in test diets **Aquaculture**, 53: 229-242
- Beamish F.W.H. and Trippel E.A. 1992 Heat increment: a static or dynamic dimension bioenergetic models? **Trans. of the American Fish. Society** 119: 649-661.
- Bages M. and Sloane L. 1981 Effects of dietary protein and starch levels on the growth and survival of *Penaeus monodon* (Fabricius) postlarvae **Aquaculture**, 25: 117-128.
- Bradford M.M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding **Analyt. Biochem.** 72, 248-254
- Chakraborty S.D., Ross L.G. and Ross B. 1992. Specific dynamic action and feeding metabolism in common carp, *Cyprinus carpio* L. **Comp. Biochem. Physiol.** vol. 103a, No. 4, 809-815.
- Chen, H-Y., Zein-Eldin y D.V. Aldrich. 1985 Combined effects of shrimp size and dietary protein source on growth of *Penaeus setiferus* and *P. vannamei* **Jour. World Maricult. Soc.** 16: 288-296
- Chieh I. C. and Sun P.B. 1993 In-vitro digestibility simulating the proteolysis of feed protein in the midgut gland of grass shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture**, 109, 59-70.
- Clifford H.C. and Brick R. W. 1983 Nutritional physiology of the freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii* (De Man)-I Substrate metabolism in fasting juvenile shrimp. **Comp. Biochem. Physiol.** vol. 74a No. 3, 561-568.

Colvin L.B. and Brand C.W. 1977. The protein requirement of penaeid shrimp at various life stages with compounded diets in a controlled environment systems. **Proc. World Maricult. Soc.** 8: 821-840.

Dall W. and Smith D.M. 1986. Oxygen consumption and ammonia-N excretion in fed and starved tiger prawns, *Penaeus esculentus* Haswell. **Aquaculture.**, 55, 23-33

Deshimaru O. and Kuroki T. 1974. Studies on a purified diet for prawn Basal composition of diet. **Bull. Jap. Soc. Fish.** 40: 413-419

DuPreez H. H., Houng-Yung C. and Chieh-Shih H. 1992. Apparent specific dynamic action of food in the grass shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. **Comp. Biochem. Physiol.** Vol 103a, No 1, 173-178

Essaiassen M., Myrnes B. and Olsen R.L. 1992. Purification and some properties of two B-N-Acetylhexosaminidases from the hepatopancreas of Northern shrimp, *Pandalus borealis*. **Comp. Biochem. Physiol.** Vol 101b, No 4, 513-517

Fang L.S. and Lee B. N. 1992. Ontogenic change of digestive enzymes in *Penaeus monodon*. **Comp. Biochem. Physiol.** Vol 103b, No 4, 1033-1037.

Fenucci J., Lawrence L.A., Zein-Eldin A. 1981. The effects of fatty acids and shrimp meal composition of prepared diets on growth of juvenile shrimp *Penaeus stylirostris*. **Jour. World Maricult. Soc.** 12(1): 315-324

Fernández, R. J.D. Celada y F. Muñoz. 1987. **Nutrición y alimentación de crustáceos**. En J. Espinoza de los Monteros y U. Labarta (eds) **Nutrición en Acuicultura II**. Ed. Plan de formación de Técnicos Superiores en Acuicultura España. 316 pp

Forrellat A., González R. y Carrillo O. 1988. Evaluación de la calidad proteica de alimentos para camarones. **Rev. de Invest. Mar.** vol IX, No 1, 71-79.

Forrellat A., González R., Collazo T., Gallardo N. y Carrillo O. 1990. Caracterización y estabilidad de la hepatopancreatina de *Penaeus schmitti* para ser usado como reactivo biológico. **Rev. de Invest. Mar.** vol. XI, No 1, 81-85

Galgani F. y Ceccaldi H.J. 1988. Effect of 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.

Gallardo N., González R., Carrillo O., Valdés O. y Forrellat A. 1988. Una aproximación a los requerimientos de aminoácidos esenciales de *Penaeus schmitti*. **Rev. de Invest. Mar.** vol. X, No. 3, 259-267.

García T. y Galindo. 1990. Requerimiento de proteína en las postlarvas de camarón blanco *Penaeus shmitti*. **Rev. Invest. Mar.** 11: 247-250.

García-Carreño F.L. 1992. The digestive proteases of langostilla (*Pleuroncodes planipes*, Decapoda): Their partial characterization, and the effect of feed on their composition. **Comp. Biochem. Physiol.** vol. 103b, No. 3, 575-578.

García en Alfonso E. L., Ramos L., Díaz-Iglesia E., García T. y Rosas C. 1993. **Manual del II Curso Internacional de producción de postlarvas de camarones peneidos del Atlántico de América, Campeche, Camp., México.** Coordinación de servicios editoriales de la Fac. de Ciencias UNAM, México, 133 pp.

Gaxiola, G. 1991. Requerimientos nutricionales de las postlarvas del camarón blanco *Penaeus shmitti*. Relaciones Proteína/Energía y Proteína Animal/ Proteína Vegetal **Tesis de Maestría Universidad de la Habana, Cuba.** 150 pp.

Gaxiola, G. 1994. Requerimientos nutricionales de las postlarvas de *Penaeus setiferus* y *P. duorarum* (Crustacea: Penaeidae) **Tesis de Doctorado Universidad Nacional Autónoma de México** 123 pp.

Geiger R. 1988. Chymotrypsin. **Methods of enzymatic analysis. Volume V Enzymes 3: Peptidases, proteinases and their inhibitors.** Third edition. Bergmeyer J. and GraBl M. Editors. 99-104 pp.

Geiger R. and Fritz H. 1988. Trypsin. In **Methods of enzymatic analysis. Volume V Enzymes 3: Peptidases, proteinases and their inhibitors.** Third edition. Bergmeyer J. and GraBl M. Editors. 119-124 pp.

Gibson R. and Baker P. 1979. The decapod hepatopancreas. **Oceanogr. Mar. Bio. Ann. Rev.** 17, 285-346.

Glass H.J. and Stark J.R. 1994. Protein digestion in the European lobster, *Homarus gammarus* (L.) **Comp. Biochem. Physiol.** vol. 108b, No. 2, 225-235.

González R., Fraga V. y Carrillo O. 1995. Cambios ontogenéticos en la actividad de las principales enzimas digestivas de *Penaeus schmitti*. **Rev. Invest. Mar.** 15(3), 262-268.

Hajra A., Goshaud A., Mandal S.K. 1988. Biochemical studies on the determination of optimal dietary protein to energy ratio for tiger prawn *Penaeus monodon* (Fab) juveniles. **Aquaculture** 71: 71-79.

Hewitt D.R. and Irving M.G. 1990. Oxygen consumption and ammonia excretion of the brown tiger *Penaeus esculentus* fed diets of varying protein content. **Comp. Biochem. Physiol.** vol. 96a, No. 3, 373-378.

Hirsh G.C. and Jacobs W. 1928 Der Arbeitsrhythmus der mittel darm drüse von *Astacus leptodactylus*. I Teil. methodik und technik Der Beweis der periodizitat zeitschrift für vergleichende physiologie, 8, 102-144

Hochachka P.W. and Somero G. N. 1991 Strategies of Biochemical Adaptation

Houng-Young C., Zein-Eldin Z.P. and Aldrich D. V. 1985 Combined effects of shrimp size and dietary protein source on the growth of *Penaeus setiferus* and *P. Vannamei*. **J. World Maricul. Soc.** 16: 288-296

Jacobs W. 1928 Untersuchungen über die cytologie der sekret bildung in der mitteldarmdrüse von *Astacus leptodactylus* Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie 8, 1-62

Jaime B. y Garcia T. 1990 Influencia del tamaño del alimento en el crecimiento y supervivencia de las postlarvas avanzadas del camarón blanco *Penaeus shmitti* **Rev. Invest. Mar.** vol. 11, No. 1, 71-76.

Khonnapa A. 1977. The effect of various protein levels on the growth and sival rates of *Penaeus monodon* Fabricius. SEAFDEC. Ilioto, Phillipines, 24-28

Kanasawa A. 1985 Essential fatty acid and lipid requirement of fish. In Tacon A.G. 1990 **The Nutrition and feeding of farmed fish and shrimps**. A training Manual Argent Press 100 pp

Kim H.R., Meyers S.P. and Godber S. 1992 Purification and characterization of anionic trypsin from the hepatopancreas of crayfish, *Procambarus Clarkii*. **Comp. Biochem. Physiol.** vol. 103b No. 2, 391-398

Lee P. y A.L. Lawrence. 1984. Digestive proteases of *Penaeus vannamei* Boone relationship between enzyme activity, size and diet **Aquaculture**, 42, 225-239

Lee P. y A.L. Lawrence. 1985 Effects of diet and size on growth, feed digestibility and digestive enzyme activities of the marine shrimp *Penaeus setiferus* Linnaeus. **Jour. World Maricult. Soc.** 16: 275-287

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.

Lovett D. L. y D.L. Felder. 1989. Ontogeny of gut morphology en the white shrimp *Penaeus setiferus* (Decapoda: Penaeidae) **Jour. of Morphol.** 201: 253-272.

- Lovett D. L. y D.L. Felder. 1990a. Ontogeny of kinematics in the gut of the white shrimp *Penaeus setiferus* (Decapoda: Penaeidae). **Jour. Crustacean Biol.** 10 (1): 53-68.
- Lovett D. L. y D.L. Felder. 1990b. Ontogenetic change in digestive activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Decapoda: Penaeidae). **Biol. Bull.** 178: 144-159.
- Lovett D. L. y D.L. Felder. 1990c. Ontogenetic changes in enzyme distribution and midgut function in developmental stages of *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). **Biol. Bull.** 178: 160-174.
- Mayzaud P. and Conover R. J. 1988. O/N atomic ratio as a tool to describe zooplacton metabolism. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 45: 289-302.
- Marín B. L.A. 1995. Evaluación de la actividad quitinolítica del camarón blanco del Golfo, *Penaeus setiferus*. Comparación entre poblaciones silvestres y poblaciones en condiciones controladas de cultivo. **Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México.** 39 pp.
- Martínez C.L. 1993. **Camaronicultura. Bases Técnicas y científicas para el cultivo de camarones penéidos.** A.G.T. Editor, S.A., México. 233 pp.
- Mc Tigue T.A. y R.J. Zimmerman. 1991. Carnivory Vs Herbivory in juvenile *Penaeus setiferus* (Linnaeus) and *Penaeus aztecus* (Ives). **Jour. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 151: 1-16.
- Nin-Nin C., Kung-Shih L. and Bei-Chia Y. 1992. Purification and characterization of and -glucosidase from the hepatopancreas of shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). **Comp. Biochem. Physiol.** vol. 102a. No. 2, 273-277.
- O'Brien C. J. 1994. Ontogenetic changes in the diet of juvenile brown tiger prawns *Penaeus esculentus*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** Vol. 112: 195-200.
- Peréz-Farfante I. 1969. Western Atlantic shrimps of the genus *Penaeus*. **Fishery Bulletin.** Vol. 67, No. 3, 461-591.
- Ponce V.G. y Hotello A. V. 1991. Aspectos geoquímicos y de contaminación por metales pesados en la Laguna de Términos, Campeche. **Hidrobiología.** 1(2): 1-10.
- Rauscher E., Bülow S., Hägele E.O., Neumann U., Schaich E. 1986. Ethylidene protected substrate for the assay of human α -Amylase. **Fresenius Z. Anal. Chem.** 324:304
- Rodríguez A., Le Vay L., Mourente G. and Jones D. A. 1994. Biochemical composition and enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. **Mar. Biol.** 118, 45-51.

Rosas C., Fernández I., Brito R. and Diaz-Iglesia E. 1993. The effect of eyestalk ablation on the energy balance of the Pink shrimp, *Penaeus notialis*. **Comp. Biochem. Physiol.** vol. 104a. No. 1, 183-187.

Sánchez Z.A., Lara H.B., Anderes L.B. y Rosas V.C. 1995. Ritmo diario de alimentación y crecimiento de primeros juveniles de *Penaeus setiferus* mantenidos en jaulas flotantes en zonas de vegetación sumergida, en las costas de Campeche.

Sáncz M. P. G. 1987. El cultivo de camarón en México. **Los recursos del mar y la Investigación**. Tomo I. I.N.P., 35-43.

Sedgwick R.W. 1979. Influence of dietary protein and energy on growth, food consumption and food conversion efficiency in *Penaeus merguensis* de Man. **Aquaculture**, 16:17-30.

Shann-Tzong J., Fang-Pei N., Chen H.C. and Jeng-Hwan W. 1992. Comparative study on the cathepsin D from banded shrimp (*Penaeus japonicus*) and grass shrimp (*Penaeus monodon*). **Journal of agricultural and food chemistry**, 40, No. 6, 961-966.

Sokal R.R. and Rohlf F.J. 1981. **Biometry**. 2a. ed. W. H. Freeman and Co., Sn. Francisco, 859 pp.

Stryer L. 1993. **Bioquímica**, ed. Reverté, tercera edición. Barcelona, España. 1084 pp.

Tacon A.G. 1990. **The Nutrition and feeding of farmed fish and shrimps**. A training Manual Argent Press. 100 pp.

Tsai I.H., Chuang K.L. y Chuang J.L. 1986. Chymotrypsins in digestive tracts of crustacean decapods (shrimps). **Comp. Biochem. Physiol.** Vol.85b, No. 1, 235-239

Tsai I.H., Chuang K.L. y Chuang J.L. 1991. The midgut chymotrypsins of shrimps (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus penicillatus*) **Biochimica et Biophysica Acta**, 1080 59-67.

Toullec J.Y., Chikhi M. y Van Wormhoudt A. 1992. In vitro protein synthesis and alpha-amylase activity in F cells from hepatopancreas of *Palaeomon serratus*. (Crustacea; Decapoda). **Experientia**, 273-277.

Van Wormhoudt A. 1974. Variations of the level of the digestive enzymes during the intermolt cycle of *Palaeomon serratus*. influence of the season and effect of the eyestalk ablation. **Comp. Biochem. Physiol.** Vol. 49a, 707-715.

Van Wormhoudt A. y Favrel P. 1988. Electrophoretic characterization of *Palaeomon elegans* (Crustacea, decapoda) alpha-amylase system: study of amylase polymorphism during the intermolt cycle. **Comp. Biochem. Physiol.** Vol. 89b, No. 2, pp. 201-207.

- Van Wormhoudt A., Le Chevalier P. and Sellos D. 1992. Purification, biochemical characterization and N-terminal sequence of serine-protease with chymotrypsic and collagenolytic activities in a tropical shrimps, *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). **Comp. Biochem. Physiol.** vol. 103b, No. 3, 675-680.
- Van Wormhoudt A., Le Moullac G., Klein B. y Sellos D. (en prensa). Adjustment of the expression of digestive enzymes to casein level in food in *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). **Brit. J. Mat.**
- Vega-Villasante F, Nolasco H and Civera R. 1993. The enzymes of the Pacific Brown shrimp *Penaeus californensis*. I-Properties of amylase activity in the digestive tract. **Comp. Biochem. Physiol.** vol. 106b, No. 3, 547-550.
- Vega-Villasante F, Nolasco H and Civera R. 1995. The digestive enzymes of the Pacific Brown shrimp *Penaeus californensis*. II-Properties of protease activity in the whole digestive tract. **Comp. Biochem. Physiol.** Vol. 112b, No. 1, 123-129.
- Venkataramiah, A. J.G. Lakshmi y G. Gunter. 1975. Effect of protein level and eyestalk matter on growth and food conversion efficiency of brown shrimp. **Aquaculture** 6: 115-125.
- Wallenfels K., Foldi P., Niemann H., Bender H., Linder D.: 1978. The enzyme synthesis by transglucosylation of a homologous series of glucosidically substituted maltotriolosaccharides, and their use as amylase substrates. **Carbohydr. Res.** 61:359.
- Wallenfels K., Meltzer B., Laule G., Janatsche G.: 1980. Chromogene und fluorogene substrate für Nachweis und Bestimmung von α -amylasen. **Fresenius Z. Anal. Chem.** 301:169.
- Walter H.E. 1988. **Methods with Haemoglobin, casein and azocoll as substrate. Methods of enzymatic analysis. Volume V Enzymes 3: Peptidases, proteinases and their inhibitors.** Third edition. Bergmeyer J. and Grabl M. Editors. 271-277 pp.
- Wunderwald . 1988. **Methods of enzymatic analysis. Volume V Enzymes 3: Peptidases, proteinases and their inhibitors.** Third edition. Bergmeyer J. and Grabl M. Editors. pp
- Zein-Eldin Z.P. and Corliss J. 1976. The effect of protein levels and sources on growth of *Penaeus aztecus*. In **Advances in aquaculture F.A.O. Technical conference of aquaculture, Kyoto, Japan, New Book, LTD.**