

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

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

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

E-mail: avw@sb-roscoff.fr

Traducción: Denis Ricque Marie y José María Viader

RESUMEN

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

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

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

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

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

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

INTRODUCCION

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

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

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

MATERIALY MÉTODO

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

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

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

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

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

*Kanazawa et al., 1977

^aChow, 1980

ANALISIS BIOQUIMICOS E INMUNOQUIMICOS

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

"TAMIZAJE" DEL BANCO DE CDNA Y ANALISIS DE PCR

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

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

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Caracterización de la a-amilasa

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

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

2. Caracterización de la tripsina

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Adaptaciones nutricionales

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

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

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

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

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

4. Caracterización del gen de la tripsina

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

REFERENCIAS

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

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

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

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

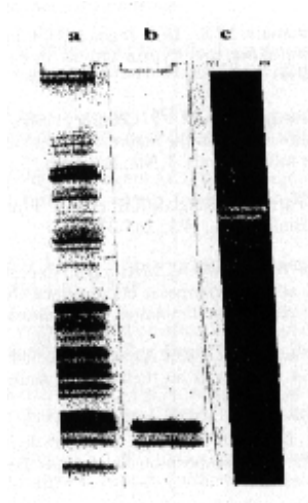


Figura 1. Caracterización de las proteínas del hepatopáncreas (a), de la tripsina (b), y de la alfa-amilasa (c) de *Penaeus vannamei*.

CCT GTG GTA GTG GTG GCT TGG GTC GCA GAG GCG CAG TGG GAT GAT CCC AAC TGT AGC AAT GGA
 P L V L L L A A A A A A U P P P M C P M G M A
 GAG TGG AAG TGG TGG GAC ATC GGC GCC GAA GAG GAG TGC TGC TGG GAT GCA GAA TGC TGC GGC
 E W M S D I A A A C E M P L U P M P A
 AAC GAA TAC GCG GAG TAC GAG GGA GAC GTG AAG CCG CCG TGG TGG GAG AGS TAC GAG CCC
 H R T V K V Y Q D V K E P H M Y E M I G P
 GGC TCC GAT GAC GAA AAT GAT TGC AAA GAG AGC GTC AEA CCG TAC GAC AAC GTG GGA ATC AAG
 R S G E M N E F N D M V T H C M N V G V M
 AAC CAG ATG TCA GAG GAG TGG ATG ATG GGA GGA GGC TCC GGG GCG TCC GCG AAC TGG TGG
 H A M S G D W P H C A A D A S D D G M C M P D A E
 GTG CCG TAC GCG GCT TTC GAC TGC AAC GAG GGC AAC TGG CAG CAG ATC GCG GGG AAC TGG TGG
 Y P Y S A P D F H D G H C H H F G H I E
 GTG GGC AAC GCG AAA GCG GCG GTG AAC GAG CTT AAC CAA GAG ACT GAG GAG GAG GAG GAG GAG
 V H M H C A L D L E D L S D D G T C D E K G
 AAG GTC ATC GGC TAC GAT GGC GGC GGC TTC GGC ATG GAC GGC AAG AAA GAG GAG GAG GAG GAG
 A L J S Y B V A U P H J D S A S A H M P F G
 AAG CAG AAC ATC AAC AGG GAT TTC TTT AAG GCG GCF GGC GGA CDT TTC AGC GGA GAA
 L D S L M T D P K A G
 GGC AAA TGG AGC GGA GAA TAT GTC GAG AAC GGC GAT GAG AGC GAG TGG GAG TGG GGC AAG TGG
 A L E M G U N P
 AAG AAC CAG CCG AAG TAC CTC AAC AAG TGG GGC GAA GGC TGG GAG AGS ATA GAC GGC GAT GAC
 E H E N S I N M F D G M C H I S H E D
 CAG GAC AAC CAG GGC GGC GAT GGG GGA GGA GAC ATG ATC CTT ACC TTC GCF ATC TGT AAG
 X D G H G M G A G H J L J P H V S K
 TGG AAG TGG GCG TGG TGG GGC TAC ACT GGC GTG ATG TGG TGG TGG TGG TGG GAG GAG TGG
 L M P I E P Y K U U N S D Y E M D U Y
 AAG AAC TGG GGC GGA CCG GAT GAC GAC GGC AAG TGG AAC ATG ATG GGC GGC GGC TTC AAT GGC
 H L G P H D G D P H H I G P H M A
 TGG AAG GAG GAC GAC GAC TGG AAG GAG ATG TGG AAG ATG GAG ATG GAG ATG GAG ATG GAG ATG
 H L C E H E N R Q I E M N H P M A
 TGG GAT AAC GGC AAT AAC TGG ATG GTC TGG GGC GGA GGC AAC AAG GGC TTC CAG GGC ATC AAC

Figura 2. Secuencia nucleotídica y secuencia proteica traducible de un cDNA de la alfa-amilasa de *Penaeus vannamei*.
 Subrayado: secuencia señal y sitio de poliadenilación.
 En el cuadro: fragmento obtenido por PCR con los dos oligonucleótidos concenso flechados.
 En círculos: posición de las 8 bases que presentan variaciones con respecto a la isoforma 2.

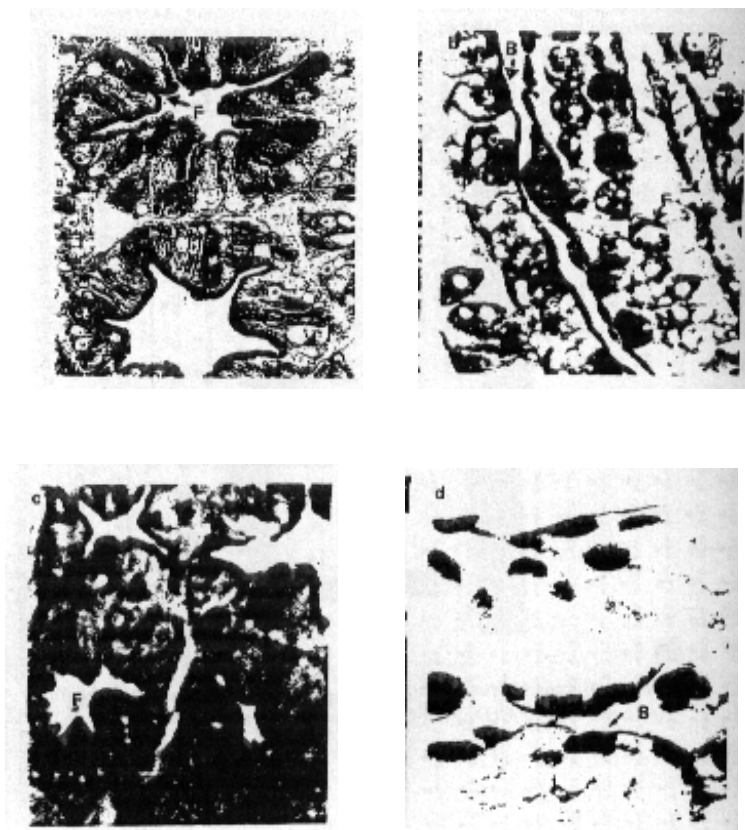


Figura 3. Localización inmunocitoquímica de la alfa-amilasa y de la tripsina en *Penaeus vannamei*.

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

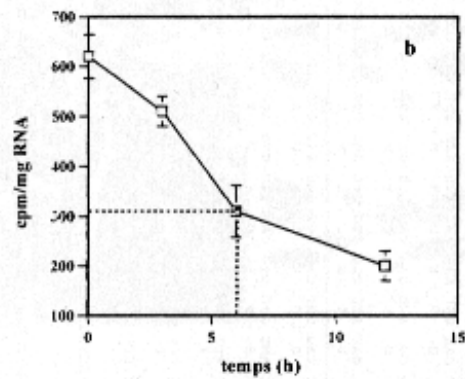
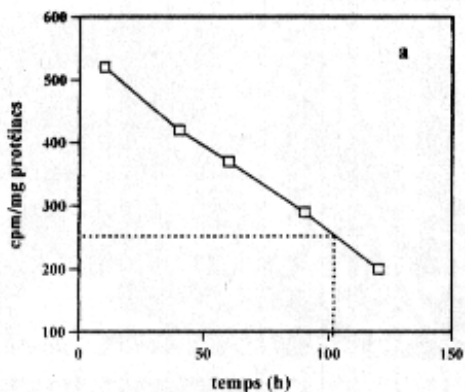


Figura 5. Estabilidad de las proteínas del hepatopáncreas y de los ARN mensajeros de la tripsina del camarón.

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

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

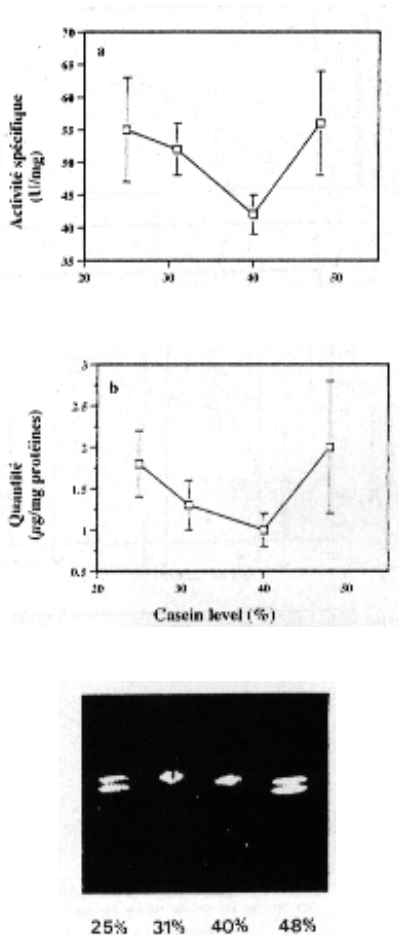


Figura 6. Efecto de diferentes concentraciones de caseína del régimen alimenticio sobre la alfa-amilasa de *Penaeus vannamei* en estadio D2 del ciclo intermuda.

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

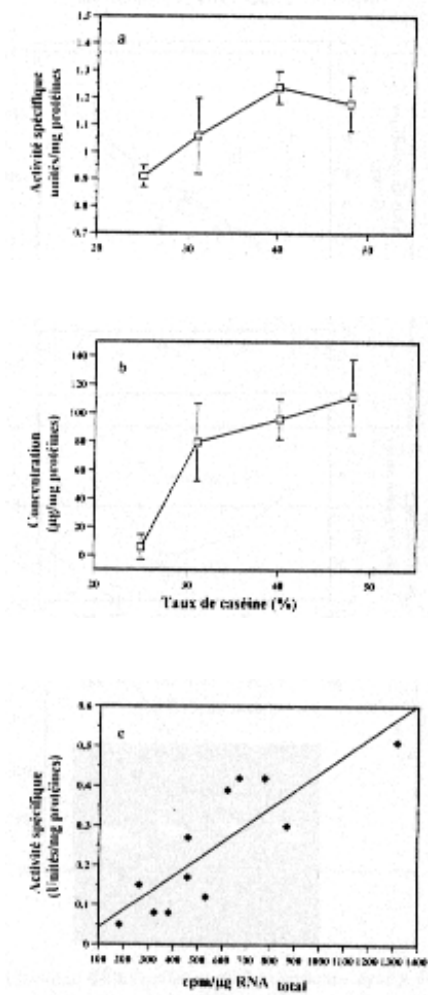


Figura 7. Efecto de diferentes concentraciones de caseína (%) en la dieta sobre la tripsina de *Penaeus vannamei* en el estadio D2 del ciclo de intermuda.

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

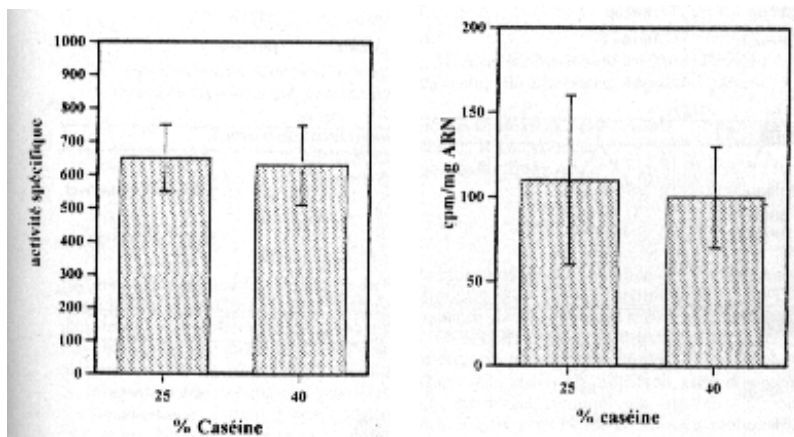


Figura 8. Efecto de diferentes concentraciones de caseína en el régimen alimenticio sobre la tripsina de *Penaeus Vannamei* en estadio D0 del ciclo de intermuda.

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

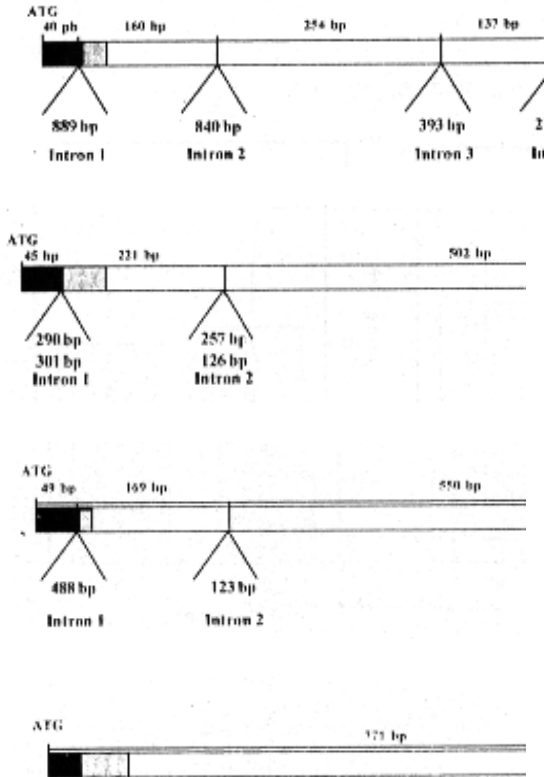


Figura 9. Estructura comparada de los genes de la tripsina en diferentes especies.

TECNOLOGIA ENZIMATICA EN ACUICULTURA

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

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

INTRODUCCION

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

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

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

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

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

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

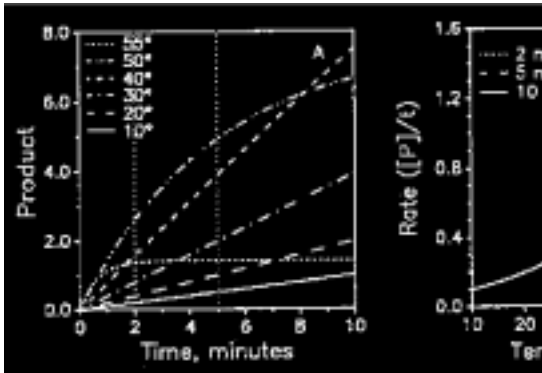


Fig. 1 Efecto del tiempo de reacción en la “temperatura óptima”.
Modificado por Stauffer (1989).

TÉCNICAS EN EL ESTUDIO DE PROTEINASAS

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

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

Tabla 1. Ensayo para actividad de proteinasas e inhibidores

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

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

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

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

pHSTAT

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

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

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

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

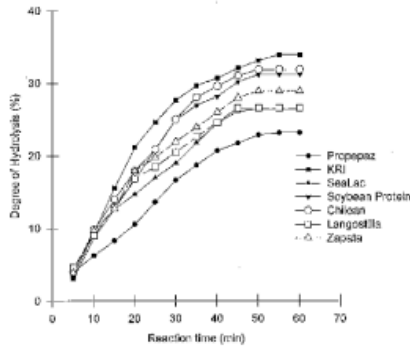


Figura 2. Grado de hidrólisis de ingredientes protéicos por enzimas de camarón blanco. Modificado de Ezquerro et al. 1996

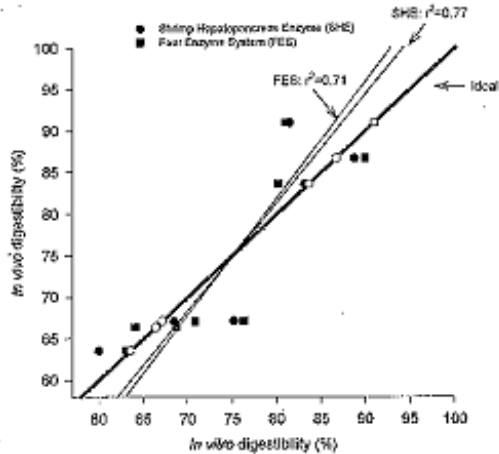


Figura 3. Correlación entre digestibilidad aparente in vivo y digestibilidad in vitro (grado de hidrólisis). Modificado de Ezquerro et al. 1996.

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

SUBSTRATO-SDS-PAGE

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

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

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

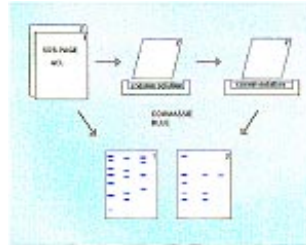
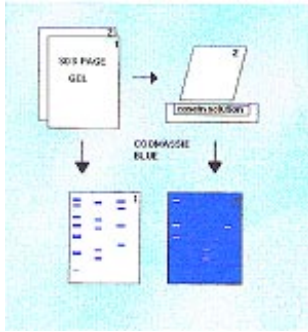


Figura 4. Diagrama de la técnica de electroforesis en poliacrilamida para actividad de proteinasas e inhibidores protéicos de proteinasas. Modificado de García-Carreño et al. 1993.

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

Tabla 2. Clases de proteínas

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

Modificado de García-Carreño 1993.

* enzima a la cual corresponde la secuencia.

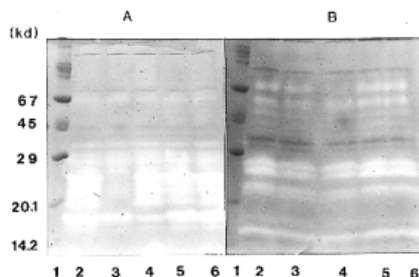


Figura 5. Zymogramas de langostilla y crayfish.

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

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



Figura 6. Zymograma de extractos de diferentes organismos.

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

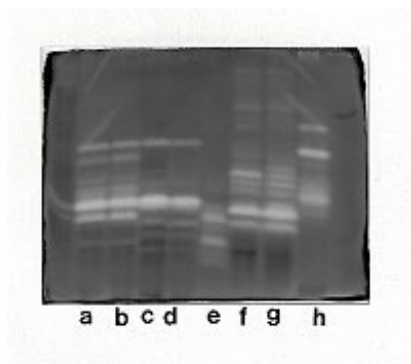


Figura 7. Comparación entre sexos de diferentes organismos.

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

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

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

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

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

PERSPECTIVAS

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

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

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

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

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

BIBLIOGRAFIA

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

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

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

Porcham Aranyakananda y Addison L. Lawrence

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

Traducción: Roberto Mendoza Alfaro y Jesús Montemayor Leal

INTRODUCCION

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

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

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

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

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

MATERIAL Y MÉTODOS

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

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

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

Tabla 1. Composición de la dieta control 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

donde: Fn = nutrientes en las heces

Fi = indicador en las heces

Dn = nutrientes en el alimento

Di = indicador en el alimento

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

RESULTADOS

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

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

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

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

¹ Los valores son medias + DS de 3 replicados

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

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

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

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

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

¹ Los valores son medias + DS de 3 replicados

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

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

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

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

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

1 Los valores son medias + DS de 3 replicados

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

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

DISCUSION

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

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

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

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

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

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

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

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

CONCLUSIONES

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

AGRADECIMIENTOS

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

LITERATURA CITADA

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

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