



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

**“Estudio de la actividad de las enzimas digestivas de
Litopenaeus vannamei en función del tamaño corporal
y la preferencia alimenticia.”**

Requisito para optar al grado de

MAGISTER EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD ACUICULTURA MARINA

Julián Gamboa Delgado

2001

TESIS ELABORADA CON EL SUPORTE DE:



FUNDACION CENAIM-ESPOL



COOPERACION TECNICA BELGA



**UNIVERSIDAD DE GANTE
BELGICA**

KATHOLIEKE UNIVERSITEIT
LEUVEN

**UNIVERSIDAD CATOLICA
DE LOBAINA – BELGICA**

VITA

Julián Gamboa Delgado, hijo de Julián Gamboa Bonilla y María Guadalupe Delgado Castro. Nacido el 7 de Abril de 1971 en Fresnillo, Zacatecas, México. Cursó el bachillerato en Ciencias Biomédicas en la Universidad Autónoma de Zacatecas de 1986 a 1988. Titulado como Licenciado en Biología en la Universidad Autónoma de Guadalajara en 1993. Ejerció labor docente en el Centro Formativo de Artes y Oficios en Guadalajara, Jalisco, México en 1995. Trabajó como Profesor-Investigador en el Laboratorio de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Guadalajara en Barra de Navidad, Jalisco de 1996 a 1999.

DECLARACION EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL.”

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).

Julián Gamboa Delgado

TRIBUNAL DE TESIS

Ing. Eduardo Cervantes
Presidente del Tribunal

Chantal Cahu, Ph.D.
Director de Tesis

César Molina, M.Sc.
Co-Director de Tesis

Laurence Massaut, Ph.D.
Miembro del Tribunal

Jorge Calderón V., Ph.D.
Miembro del Tribunal

Dra. Elba Camba
Miembro del Tribunal

DEDICATORIA

A mis padres, Julián y Lupita.
Gracias por su amor, esfuerzo y dedicación.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por el invaluable regalo de la vida.

A mis padres, Julián y Lupita por su amor y apoyo constante en el transcurrir de mi vida.

A mi hermano Daniel y a mis hermanas Karla y Marisol, por estar conmigo en todo momento. Gracias, los quiero mucho.

A la Cooperación Técnica Belga (BTC) por el otorgamiento de la beca para la participación en el programa.

Al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) y a la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) por el apoyo académico.

A la Universidad de Gante y Universidad Católica de Lovaina por el soporte técnico durante el programa.

A mi promotora de tesis, Chantal Cahu, Ph.D., por su profesional asistencia en la elaboración de ésta tesis.

A mi co-promotor de tesis M.en C. César Molina, por su esmerada orientación, instrucción y amistad.

A Laurence Massaut, Ph.D. por su profesional conducción del Programa de Maestría en Acuicultura Marina.

A todos mis profesores y todos aquellos que gracias a sus críticas y consejos me estimularon a mejorar como persona y profesionista.

A Yela Paredes, Químico-Farmacéutica, por su amistad y valiosa colaboración en los análisis de laboratorio.

A la Biól. Betty Rivera por su amistad y asistencia en la identificación de plancton.

A las camareras OPUMARSA y JOSEFINA por la donación del material biológico.

A mis compañeros de generación y a todas las personas que me brindaron su amistad y apoyo durante mi estancia en Ecuador

A todos los operarios y a cada una de las personas que conforman el CENAIM.

INDICE

1.	Introducción	1
2.	Objetivos	3
3.	Antecedentes	4
3.1.	Características biológicas	4
3.2.	Datos de producción	4
3.3.	Aspectos nutricionales	5
3.4.	Preferencia alimenticia	5
3.5.	Enzimas digestivas	8
3.5.1.	Amilasa	10
3.5.2.	Lipasa	11
3.5.3.	Proteasas	11
3.5.4.	Tripsina	12
3.5.5.	Quimotripsina	12
3.6.	Cambios ontogénicos y actividad enzimática	13
4.	Materiales y Métodos	14
4.1.	Muestreo	14
4.2.	Evaluación del contenido estomacal	15
4.3.	Análisis enzimáticos	16
4.3.1.	Preparación del suero enzimático	16
4.3.2.	Amilasa	16

4.3.3.	Lipasa	17
4.3.4.	Proteasas	17
4.3.5.	Tripsina	18
4.3.6.	Quimotripsina	18
4.3.7.	Proporción amilasa/proteasas	18
4.3.8.	Proteína soluble	19
4.4.	Análisis estadístico	19
5.	Resultados	20
5.1.	Condiciones de muestreo	20
5.2.	Contenido estomacal	21
5.2.1.	Material vegetal	21
5.2.2.	Presas	23
5.2.3.	Alimento artificial	23
5.2.4.	Detritos	24
5.2.5.	Minerales	24
5.3.	Actividad enzimática	24
5.3.1.	Amilasa	24
5.3.2.	Lipasa	26
5.3.3.	Proteasas	26
5.3.4.	Tripsina	26
5.3.5.	Quimotripsina	26
5.3.6.	Proteína disuelta	27

5.4 Correlación entre actividades enzimáticas	28
6. Discusión	29
6.1. Contenido estomacal	29
6.2. Actividad enzimática	34
7. Conclusiones y recomendaciones	39
8. Referencias bibliográficas	40

RESUMEN.

Se colectaron camarones *Litopenaeus vannamei* aproximadamente a cada incremento de 2 g de peso durante un período de cultivo tipo semi-intensivo. Los diferentes componentes del contenido estomacal fueron determinados para evaluar la preferencia alimenticia. Se efectuaron ensayos para determinar la actividad de las enzimas digestivas amilasa, lipasa, proteasas, tripsina y quimotripsina. Durante el ciclo de cultivo, el alimento natural correspondió a un 91% de la dieta total de los camarones. El promedio de los diferentes elementos del contenido estomacal para los 5 muestreos de camarones desde 2 a 10 g fue 46% detritos, 28% material vegetal, 12% presas, 9% alimento artificial y 5% minerales. Todas las actividades enzimáticas ensayadas presentaron diferencias significativas en alguno de los diferentes pesos, observándose una disminución en las actividades proteasa y tripsina a partir de los 6 g. Las actividades quimotripsina y lipasa, por el contrario, se incrementaron en relación a la ganancia de peso. La actividad amilasa se duplicó después de 2 g. La actividad amilasa y lipasa presentaron una correlación positiva significativa. El cambio en la preferencia alimenticia y en la actividad enzimática puede estar evidenciando una adaptación fisiológica a dietas con menor contenido de proteína después de que los camarones alcanzan los 6 g de peso corporal.

ABSTRACT.

Litopenaeus vannamei shrimps were collected at each body weight increase in 2 g during a semi-intensive culture cycle. The different components in the stomach content were determined in order to evaluate the feeding preferences. Assays were made to determine the activity of the digestive enzymes amylase, lipase, proteases, trypsin and chymotrypsin. During the culture period, natural food contributed for 91% of the shrimp total diet. The average for the different elements present in the stomach content of shrimps between 2 and 10 g were: 46% detritus, 28% plant material, 12% preys, 9% artificial feed and 5% minerals. All of the enzyme activities assayed showed significant differences in any of the different weights. A decrease in protease and trypsin activities was observed from 6 g onwards. Chymotrypsin and lipase activities, on the contrary, increased in relation to body weight gain. Amylase activity increased two fold after 2 g. Amylase and lipase activities showed a significant positive correlation. The changes in food preference and enzyme activity may be suggesting a physiological adaptation to diets with lower protein content after the shrimp reach 6 g in body weight.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la acuicultura de los crustáceos ha conducido a la necesidad de un mejor entendimiento de la relación entre la anatomía y la función del tracto digestivo de los crustáceos decápodos, en particular los camarones peneidos (Ceccaldi 1997). Una alimentación efectiva depende del conocimiento acerca de como los organismos usan los diferentes componentes de las dietas (Vega-Villasante *et al.* 1993). Este hecho ha llevado a que un número de investigaciones recientes acerca de los procesos digestivos se enfoquen en la evaluación de la habilidad de los organismos para hidrolizar, absorber y asimilar los principales nutrientes de la dieta (Guzman *et al.* 2001). Dentro de estas investigaciones, el estudio de las enzimas digestivas constituye un elemento clave en cuanto al entendimiento del sistema digestivo y de los requerimientos nutricionales en estadios específicos de desarrollo (Le Moullac *et al.* 1996). La relación entre la actividad de las diferentes enzimas digestivas y el crecimiento, puede asistir en la definición de la calidad de las dietas para camarones a diferentes edades (Lee y Lawrence, 1985) debido a que el rompimiento químico del alimento es lo que determina en última instancia los tipos de nutrientes que estarán disponibles para la asimilación (Lee *et al.* 1984).

El alimento es el mayor costo variable y puede representar hasta el 60% de los costos totales dentro del cultivo de los camarones peneidos (Akiyama *et al.* 1992). La proteína es el ingrediente más crítico presente en las dietas debido a que es el más costoso y como macronutriente, es el que soporta el crecimiento de los organismos. Una determinante clave de la digestibilidad y de la eficiencia de asimilación de las proteínas ingeridas es la presencia de las enzimas proteasas en el tracto digestivo (Picos-García *et al.* 2000). Dentro de éstas, la tripsina es la enzima más importante en los crustáceos porque interviene en un 50 a 60% de la hidrólisis protéica (Galgani *et al.* 1984). Cambios en la actividad enzimática digestiva pueden indicar respuestas fisiológicas a diferentes condiciones

nutricionales (Harms *et al.* 1991) y ha sido hipotetizado que la actividad enzimática es más alta para aquellos substratos que son más comunes en la dieta (Johnston y Yellowlees 1998; Moss *et al.* 2001). Además, los tipos y las propiedades de las enzimas digestivas de los camarones definen capacidades digestivas y por lo tanto, definen también los ingredientes a ser incluidos en las dietas para camarón (Divakaran y Ostrowski, 1990).

En las piscinas de cultivo con manejo semi-intensivo, ocurre una contribución substancial a la nutrición de los camarones por parte de la biota presente naturalmente (Hunter *et al.* 1987; Nunes *et al.* 1997; Focken *et al.* 1998). Por lo tanto, las fórmulas alimenticias y los esquemas de alimentación deben de optimizarse para satisfacer los requerimientos nutricionales. En este contexto, una mejor comprensión de las preferencias alimenticias y de la utilización del alimento por los camarones peneidos es esencial para optimizar el uso de nutrientes y para reducir la contaminación ambiental que ocurre a causa de la excreción de metabolitos y el alimento artificial no consumido. Una pérdida neta de nutrientes originada por una excesiva alimentación representa también una pérdida económica para el acuacultor (Talbot y Hoyle, 1994). Gran parte de los estudios sobre la actividad enzimática digestiva se han enfocado a larvas y postlarvas de varias especies de peneidos (Lovett y Felder, 1990; Lemos y Rodríguez, 1998; Brito *et al.* 2001) originándose así una menor cantidad de estudios orientados hacia las etapas de juvenil y adulto.

2. **OBJETIVOS**

OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad de las enzimas digestivas y la preferencia alimenticia de *Litopenaeus vannamei* en función del tamaño corporal.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la actividad de las enzimas digestivas amilasa, lipasa, proteasas totales, tripsina y quimotripsina en camarones de diferentes edades cultivados semi-intensivamente.

Evaluar cualitativa y cuantitativamente el contenido estomacal en camarones juveniles en diferentes edades durante un ciclo de producción.

3. ANTECEDENTES

3.1. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Perez-Farfante y Kensley 1997) se encuentra distribuido a lo largo de la costa del Océano Pacífico desde Sonora en México hasta Tumbes en Perú. Se ha determinado que tiene una preferencia por fondos de sedimento suave y habita desde la línea costera hasta los 72 m de profundidad (Dore y Frimodt 1987). Esta especie es muy eurihalina y soporta un rango de salinidades desde 0 hasta 50 ups y temperaturas entre 22 y 32 °C (Pillay 1997). Los machos adultos producen espermátóforos muy complejos con varias estructuras accesorias. Las hembras presentan télico abierto y la producción de huevecillos depende del tamaño individual. Las hembras de 30 a 45 g de peso producen entre 100 mil y 250 mil huevecillos por desove. *L. vannamei* se distingue de otros camarones peneidos por la presencia de espinas hepáticas y antenales muy pronunciadas en el cefalotórax y por el arreglo de 8 ó 9 dientes en el borde superior del rostrum y 1 ó 2 dientes en el borde inferior.

3.2. DATOS DE PRODUCCIÓN

El cultivo de camarón es el tipo de acuicultura de agua cálida de más rápida expansión en el mundo (Phillips *et al.* 1993). En 1996 la producción global de camarón de cultivo estuvo cercana a 700,000 TM y provino de granjas que cubrían una extensión de 1.37 millones de Ha (Rosenberry 1996). En el continente americano, el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* representó más del 90% de la producción en 1998 cuando alcanzó las 132,000 TM (Rosenberry 1998).

3.3. ASPECTOS NUTRICIONALES

El común denominador entre los diferentes hábitos alimenticios de los decápodos es una constante actividad alimenticia sobre el sustrato para mantener pequeñas cantidades de material orgánico en el proventrículo (Cuzon *et al.* 2000). El tracto digestivo anterior de los camarones peneidos es pequeño y representa solamente del 2 al 3% del peso corporal (Marte, 1980; Wassenberg y Hill, 1987), por lo tanto ingieren su alimento en pequeñas cantidades y consumen una nueva ración de alimento cuando una previa cantidad esta siendo digerida (Schwamborn y Criales 2000). De esta manera, en cualquier momento se puede encontrar alimento en sus estómagos (Focken *et al.* 1998; Nunes y Parsons 2000b). Los peneidos se adaptan muy bien a los cambios en la composición de la dieta mediante la inducción de un conjunto de enzimas digestivas (Le Moullac *et al.* 1996) sintetizadas y secretadas en el hepatopáncreas (Ceccaldi 1997).

En el caso específico de *L. vannamei*, se ha demostrado una tolerancia nutricional mayor que otras especies. Ésta tolerancia se debe, en parte, a su alta capacidad para utilizar un amplio rango de proporciones proteína/energía para su crecimiento (Rosas *et al.* 2001). Estas adaptaciones representan una ventaja técnica en cuanto a la elaboración de alimentos artificiales porque el camarón aceptará e hidrolizará un gran número de ingredientes incluidos en las dietas.

3.4. PREFERENCIA ALIMENTICIA

Los estudios sobre los hábitos alimenticios de los camarones peneidos indican que estos son omnívoros y que algunas especies presentan tendencias carnívoras o herbívoras (Mc Tighe y Zimmerman 1991). Se ha observado que en general, las especies del subgénero *Farfantepenaeus* (*F. duorarum*, *F. aztecus*, *F. brasiliensis*) presentan hábitos omnívoro-carnívoros, mientras que las especies del subgénero

Litopenaeus (*L. setiferus*, *L. vannamei*, *L. schmitti*) tienen hábitos omnívoro-herbívoros (Marte 1980; Hunter y Feller 1987).

Mc. Tigue y Zimmerman (1991) afirman que estas preferencias están asociadas con diferentes proporciones de materia de origen animal o vegetal en la dieta y podrían evidenciar requerimientos nutricionales distintos. Recientemente se ha observado que diferencias en los hábitos alimenticios y en los requerimientos nutricionales están asociadas también con la capacidad de las especies para utilizar en diferentes proporciones a las proteínas como sustrato metabólico (Rosas *et al.* 1995).

Los sistemas de cultivo extensivos y semi-intensivos ofrecen una variedad de fuentes alimenticias presentes naturalmente (Bombeo-Tuburan *et al.* 1993; Nunes *et al.* 1997) y se ha sugerido que la formulación de alimentos destinados a sistemas de cultivo semi-intensivo debe de considerar el valor nutricional del alimento natural para tratar de complementarlo y así satisfacer los requerimientos nutricionales del camarón (Focken *et al.* 1998). Los estudios sobre las preferencias alimenticias en diversas especies de peneidos indican que una amplia variedad de componentes alimenticios son consumidos. Nunes *et al.* (1996) evaluaron los patrones de alimentación de *Farfantepenaeus subtilis* durante un ciclo de cultivo y determinaron que los camarones ingieren una gran variedad de componentes que varían en proporción a diferentes edades pero no difieren en base al ritmo circadiano. Una variabilidad en los componentes alimenticios también fue observada por Nunes *et al.* (1997) al determinar las siguientes proporciones de elementos contribuyentes al contenido estomacal de *F. subtilis* durante un ciclo de engorda: presas 33%, detritos 26%, macrofitas 11%, alimento artificial 16% y minerales 6 a 9%. Los autores observaron una disminución en el consumo de material vegetal y un incremento en el consumo de presas a medida que los camarones aumentaban su peso, lo cual indicó un cambio hacia una tendencia más carnívora (Nunes *et al.* 1997). Otro estudio con *Penaeus monodon*

(Focken *et al.* 1998) también reveló diferencias en la preferencia alimenticia durante un ciclo de cultivo. En la semana 6 de cultivo, las proporciones de alimento encontradas consistieron en 29% de alimento artificial, 42% de material vegetal, 2% de partes de crustáceos y 27% de diverso material detrital; en la semana 11 los porcentajes (mismo orden) fueron 47%, 21% 23% y 9% y en la semana 16, 22%, 34%, 32% y 13% respectivamente, en estos dos últimos estudios, el alimento artificial contribuyó en un porcentaje entre 15 y 47% al contenido estomacal (Focken *et al.* 1998). Reymond y Lagardère (1990) encontraron alimento artificial en contribuciones promedio tan bajas como 4% del contenido estomacal total durante un ciclo de cultivo con *Marsupenaeus japonicus*.

En los sistemas de cultivo semi-intensivos la biota natural de las piscinas otorga una contribución importante a la nutrición de los camarones a pesar de que se suministren cantidades significativas de alimento artificial (Reymond y Lagardère 1990; Nunes 1996). Además, esta biota natural es fuente de nutrientes no presentes en las dietas artificiales que son nutricionalmente incompletas (Hunter *et al.* 1987) o que se distribuyen mediante un esquema de alimentación deficiente provocando un bajo impacto del alimento artificial sobre el sistema de cultivo (Nunes y Parsons 2000b).

El tipo de material vegetal presente en los estanques de cultivo y que frecuentemente es encontrado también en el contenido estomacal de los camarones, esta representado por diatomeas, algas filamentosas, masas de cianobacterias y fragmentos de macrofitas acuáticas y terrestres (Bombeo-Tuburan *et al.* 1993; Nunes *et al.* 1997; Focken *et al.* 1998).

Las presas potenciales pueden estar conformadas por copépodos, anfípodos, larvas de otros crustáceos, poliquetos, moluscos, nemátodos, foraminíferos e insectos (Hunter y Feller 1987; Reymond y Lagardère 1990; Nunes y Parsons 2000a). La selección de la presa depende de factores tales como el tamaño

relativo presa/depredador, la palatabilidad y la facilidad de captura (Reymond y Lagardère 1990; Deudero y Morales-Nin 2001). Nunes y Parsons (2000a) determinaron que los poliquetos son una presa importante para *F. subtilis* y sugieren el uso de alimentos con una atractabilidad mejorada a fin de permitir un balance entre el consumo de alimento artificial y la depredación de poliquetos.

La adición de alimento artificial en los estanques camaroneros está basada en su mayoría en tablas para calcular las raciones diarias a partir de un porcentaje de la biomasa y del peso promedio de los camarones presente en el estanque (Molina *et al.* 2000). Una parte del alimento artificial no es consumido de inmediato por los camarones, sino que es asimilado por bacterias y otros eslabones de la cadena trófica (Reymond y Lagardère 1990), de esta forma, el alimento artificial pasa a ser un elemento más de los detritos y estimula a la productividad natural.

Detritos es un término que generalmente se usa en ecología acuática para hacer referencia a la materia orgánica no viva. Los detritos aportan una contribución alimenticia muy importante para la dieta de los camarones (Cockcroft y McLachlan 1986; Bombo-Tuburan *et al.* 1993; Nunes *et al.* 1997) y están intrínsecamente asociados con microorganismos, los cuales constituyen del 5 al 10% de la masa detrital en peso (Moriarty 1997). El material mineral puede ser ingerido accidentalmente y está conformado por arcilla, limo y/o granos de arena.

3.5. ENZIMAS DIGESTIVAS

La producción de enzimas digestivas en el hepatopáncreas de los crustáceos se encuentra controlada, en parte, por hormonas del pedúnculo ocular (Cecaldi 1997). A excepción de un zimógeno putativo de la quimotripsina (Sellos y Van Wormhoudt, 1992), no se han encontrado otros zimógenos de enzimas digestivas en el hepatopáncreas (Carrillo y González 1998).

En conjunto, las enzimas digestivas que poseen los camarones son capaces de hidrolizar una variedad de sustratos y varios factores están implicados en su regulación, entre ellos se encuentran la dieta (Le Moullac *et al.* 1996; Guzman *et al.* 2001; Brito *et al.* 2001), los cambios ontogenéticos (Lovett y Felder 1990; Lemos y Rodríguez 1998), el tamaño corporal (Lee y Lawrence 1985), los ritmos circadianos (González *et al.* 1995; Molina *et al.* 2000), el ciclo de muda (Fernández *et al.* 1997) e incluso ha sido reportado que el agua de cultivo ejerce un efecto estimulante sobre la actividad enzimática digestiva (Moss *et al.* 2001).

Le Moullac *et al.* (1994) utilizaron caseína, gelatina, harina de calamar y proteína soluble concentrada de pescado para determinar sus respectivos efectos sobre la actividad y síntesis de la tripsina, quimotripsina y amilasa. Sus resultados indican que para las tres enzimas, se registraron actividades significativamente más altas para las dietas que contenían harina de calamar y caseína. Algunas de sus conclusiones señalan que las actividades de la amilasa y proteasas están moduladas por la composición de la dieta y aumentan con los respectivos incrementos de glúcidos y proteína de la dieta (Le Moullac *et al.* 1994). Lee y Lawrence (1985) evaluaron la digestibilidad y la actividad enzimática en *L. setiferus* de varios tamaños alimentados con diferentes dietas. La actividad específica de la tripsina y de la amilasa fue mayor en camarones de 4 g que en camarones de 9 y 14 g alimentados con dietas cuyo porcentaje de proteína fue 22%; la actividad específica de la lipasa mostró una amplia variabilidad entre los tratamientos. Sus conclusiones indican que el incremento en la actividad enzimática digestiva puede tener una relación negativa con el crecimiento corporal y la digestibilidad de la dieta (Lee y Lawrence 1985). Las técnicas que permiten determinar el comportamiento enzimático han sido aplicadas también a otros invertebrados de valor comercial. Picos-García *et al.* (2000) determinaron la actividad enzimática en el abulón *Haliothis fulgens* en relación al alimento consumido y en diversos órganos digestivos y concluyeron que la actividad de las enzimas proteasas cambia desde juvenil hasta adulto. La actividad de la tripsina,

quimotripsina y fosfatasa ácida fueron detectadas en el hepatopáncreas y vísceras de abulones juveniles, mientras que en los adultos se registró actividad tripsina y quimotripsina en el fluido intestinal pero no en el hepatopáncreas.

Las concentraciones intracelulares de enzimas digestivas (en el hepatopáncreas) reflejan directamente las concentraciones presentes en el lumen del tracto digestivo (Rodríguez *et al.* 1976). De esta forma, el estudio de las enzimas digestivas es un paso esencial hacia el entendimiento del mecanismo de la digestión y permite un mejor ajuste de las necesidades nutricionales (Le Moullac *et al.* 1996)

3.5.1. **Amilasa**

La α -amilasa es una glicoproteína carbohidrasa que cataliza la hidrólisis de los enlaces 1-4 de los carbohidratos. Tres isoformas de la amilasa se han determinado en *L. vannamei* (Van Wormhoudt *et al.* 1996) y en cuanto a posibles zimógenos, no ha sido caracterizado ninguno para esta enzima en crustáceos (Carrillo y González 1998). Dependiendo del grado de actividad amilolítica en los camarones peneidos, es posible incluir diferentes proporciones de carbohidratos compuestos (generalmente almidones) en las dietas. Tomando en consideración que el almidón es el componente más barato en las dietas para organismos acuáticos, es de importancia para el cultivo del camarón porque reemplaza parcialmente a la proteína (Cousin *et al.* 1996) como fuente energética. Fernández *et al.* (1997) observaron un pico de la actividad amilasa en el estómago de *Farfantepenaeus notialis* en el estadio de muda D₀-D₁. En otro estudio, Vega-Villasante *et al.* (1993) determinaron que la actividad de la amilasa en el tracto digestivo de *Litopenaeus californiensis* aparenta ser halotolerante y se activa de mejor forma en presencia de bajas concentraciones de iones como magnesio, calcio y sodio.

3.5.2. Lipasa

La lipasa cataliza la hidrólisis de ésteres de glicerol emulsificados y ácidos grasos de cadena larga. La digestión enzimática de los lípidos en crustáceos es diferente a la de los vertebrados porque la emulsificación de los lípidos ocurre mediante derivados de la taurina, ácido cólico y desoxicólico (Cruz 1996). Lee y Lawrence (1985) reportaron la actividad específica de la lipasa como la más variable de entre 6 enzimas en adultos de *L. setiferus*, mientras que Lovett y Felder (1990) detectaron actividad esterasa pero no actividad lipasa en postlarvas de *L. setiferus*. Deering *et al.* (1996) determinaron que las lipasas de *P. monodon* producen 1,2-diacilglicerol y ácidos grasos libres como únicos productos de la hidrólisis *in vitro* usando trioleína como sustrato. Los autores concluyeron que esta especificidad es similar a la de la lipasa pancreática de los mamíferos y a la observada en *Homarus americanus*.

3.5.3. Proteasas

Las proteasas son enzimas proteolíticas clasificadas en dos grupos: las endopeptidasas, enzimas que cortan los enlaces peptídicos en el interior de las cadenas proteicas, y las exopeptidasas o enzimas que cortan los enlaces peptídicos aminoterminales, carboxiterminales y dipéptidos. El contenido de proteasas serínicas en el hepatopáncreas de los peneidos es muy alto (Tsai *et al.* 1986). La actividad de las proteasas está modificada por la cantidad y calidad de la proteína presente en la dieta. Se ha determinado que la actividad de las proteasas se eleva en *L. setiferus* de 10 gramos cuando se les alimenta con una dieta baja en proteína (22%) posiblemente en respuesta a una escasa fuente de proteína a la que se intenta hidrolizar al máximo (Lee y Lawrence 1985).

3.5.4. Tripsina

La tripsina es una endopeptidasa serínica que tiene especificidad para escindir péptidos y proteínas en el enlace carboxamida de los residuos de lisina y arginina (Geiger y Fritz 1988). La eficiencia catalítica de las tripsinas de los crustáceos peneidos es mayor a la de las tripsinas de los vertebrados (Van Wormhoudt *et al.* 1996) y en *L. vannamei*, es la enzima más activa de todas las proteasas caracterizadas (Lemos *et al.* 2000). Omondi y Stark (2001) realizaron estudios de inhibición enzimática en homogeneizados de hepatopáncreas de *Fenneropenaeus indicus* y concluyeron que la actividad de la tripsina contribuye con casi 50% al total de la proteólisis. Diaz (1997) observó que en *L. schmitti* la actividad de la tripsina sigue el mismo patrón que la actividad de las proteasas totales durante el ciclo circadiano, registrándose un pico de actividad entre las 10h00 y las 12h00. Galgani *et al.* (1985) determinaron 6 isoformas de la tripsina en *Marsupenaeus japonicus*.

3.5.5. Quimotripsina

La quimotripsina es una endopeptidasa serínica. Tsai *et al.* (1986) detectaron actividad de la quimotripsina y tripsina en el hepatopáncreas, estómagos e intestinos de *P. monodon*, *P. penicillatus*, *M. japonicus*, *Metapenaeus monoceros* y *Macrobrachium rosenbergii*. Los autores concluyeron que la quimotripsina fue tan importante como la tripsina en los procesos digestivos de estos decápodos. Ensayos de actividad hidrolítica sugieren que las quimotripsinas de *P. monodon* tienen especificidad por los enlaces del extremo carboxilo de la tirosina, fenilalanina y leucina (Tsai *et al.* 1991). Van Wormhoudt *et al.* (1992) purificaron 2 isoformas de la quimotripsina a partir del hepatopáncreas de *L. vannamei*. En estudios más tempranos a los citados previamente, la actividad de la quimotripsina no había sido detectada. Por ejemplo, no la detectaron Gates y Travis (1973) en *L.*

setiferus ni Lee *et al.* (1984) en *L. vannamei*, debido probablemente a la carencia de sustratos más sensibles y altamente específicos.

3.6. CAMBIOS ONTOGENÉTICOS Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Los estadios larvarios y postlarvarios de los camarones peneidos sufren una serie de cambios metamórficos que inciden directamente sobre la actividad enzimática (Lovett y Felder 1990; Lemos y Rodríguez 1998). Sin embargo, también en las etapas de juvenil y adulto se detectan cambios en las diferentes actividades enzimáticas que parecen estar relacionados al crecimiento y a la digestibilidad del alimento (Lee y Lawrence 1985).

Una correlación entre el cambio ontogenético en la actividad enzimática y la variación en el patrón alimenticio en camarones peneidos ha sido ampliamente aceptada (Lee *et al.* 1980; Fang y Lee 1992; Ribeiro y Jones 2000). La importancia de conocer la variabilidad de la actividad enzimática relacionada con el proceso ontogenético radica en el hecho de que ésta relación se puede usar como un índice del estado trófico para estimar la fase de desarrollo en las cuales las formulaciones de las dietas deben ser modificadas (Cuzon *et al.* 1980; Galgani *et al.* 1984).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MUESTREO

Los organismos utilizados fueron colectados durante un ciclo de cultivo en un mismo estanque de la granja camaronera OPUMARSA, ubicada frente a la costa de Palmar, Guayas. La camaronera opera sus estanques semi-intensivamente (9-12 ind/m²). El alimento fue distribuído mediante bandejas de alimentación (28-30/ha) y el recambio de agua se efectuó solamente en bajamar durante cada período de marea de sicigia (quiebra). En vista de que la camaronera suspendió la alimentación artificial durante el período de estudio, se eligió una segunda camaronera para complementar los organismos destinados para la evaluación del contenido estomacal. El segundo sitio de muestreo fue uno de los estanques de la granja camaronera La Josefina (El Rosario S.A.) ubicada cerca de uno de los ramales del río Guayas cercano a la ciudad de Guayaquil. En ésta granja, los camarones fueron sembrados a una densidad de 10-15 ind/m², el alimento fue distribuído por dispersión y el recambio de agua se efectúa solo para recuperar el nivel perdido por evaporación y filtración. En ambas granjas el alimento artificial fue suministrado una vez al día por las mañanas.

El período de muestreo se estableció desde Diciembre del 2000 hasta Mayo del 2001 y los organismos fueron colectados entre las 12h00 y 14h00 debido a que en este horario se ha determinado una mayor tasa de ingestión y actividad enzimática (Molina *et al.* 2000). Se seleccionaron camarones a intervalos de aproximadamente 15 días durante un ciclo de cultivo con el fin de obtener animales separados por un rango de peso aproximado a los 2 g. El peso se determinó en una balanza portable (Ohaus, EU). Los organismos que estuvieron dentro del peso requerido fueron seleccionados en un mismo estadio de muda para evitar la variabilidad que ocurre en la tasa de ingestión de alimento y en la actividad enzimática durante los diferentes estadios (Fernández *et al.* 1997; Molina

et al. 2000). Los estadios de muda se determinaron de acuerdo a Kuo y Lin (1996) mediante la observación de la cutícula y las setas de los urópodos en un esteromicroscopio (Olympus, EU). Cincuenta individuos en estadio de muda temprana (Do) por cada grupo de peso fueron colectados e inmediatamente sacrificados por inmersión en agua helada para ser transportados al laboratorio. La disección de los camarones se realizó removiendo la cutícula del cefalotórax para después efectuar un corte dorsal por donde se extrajeron el hepatopáncreas y el estómago. Ambos órganos se almacenaron en microtubos individuales a -20 °C hasta su posterior análisis.

4.2. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO ESTOMACAL

Los estómagos fueron disectados mediante la técnica de Focken *et al.* (1998) y su contenido fue extraído mediante un corte dorsal en el proventrículo (cámara anterior). No se consideró el alimento presente en la cámara pilórica (cámara posterior) porque éste es triturado previamente por los osículos del proventrículo y se encuentra irreconocible (Chong y Sasekumar 1981). El contenido estomacal fue trasladado a microtubos Eppendorf para determinar el peso húmedo y posteriormente el peso seco después de someter las muestras a 60 °C por 3 horas. Alícuotas de 0.05 mL de las muestras resuspendidas en 0.4 mL de solución salina al 5% fueron colocadas en 4 áreas de conteo de una cámara de Neubauer. Las muestras se observaron al microscopio (Olympus, EU) a 10X y 20X. Previo a las disecciones, y para facilitar la identificación de los diferentes elementos presentes en el estómago, se tomaron muestras de alimento artificial (macerado en agua) y muestras de bentos provenientes de los estanques de cultivo para observarlas al microscopio. Los diversos componentes encontrados en los estómagos fueron identificados y clasificados dentro de las siguientes categorías: presas (animales completos o fragmentos), alimento artificial, material vegetal (microalgas, macrofitas, y algas filamentosas), detritos (agregado orgánico/bacteriano y material semidigerido) y minerales. La ingestión de cada

componente (en base seca) fue calculada como la proporción de cada componente multiplicada por el peso total de materia en el estómago. Para compensar la desviación del peso corporal a partir de su media en cada uno de los muestreos, el peso seco de cada componente se multiplicó por el peso corporal promedio y se dividió por el peso corporal individual.

4.3 ANÁLISIS ENZIMÁTICOS

4.3.1 Preparación del suero enzimático

Los hepatopáncreas fueron pesados y macerados en 0.5 mL de solución tampón helada en tubos de microensayo Eppendorf mediante un microhomogeneizador de tejido (Wheaton, EU). El homogeneizado fue aforado hasta 1.5 mL con solución tampón e inmediatamente centrifugado (Kokusan, Japón) a 13,000 rpm por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante libre de la capa lipídica fue separado y dividido en alícuotas individuales para cada una de las actividades enzimáticas evaluadas. Las submuestras fueron transferidas a tubos de microensayo y congeladas a -20 °C hasta su posterior análisis. Después de descongelar, se efectuaron diluciones con solución tampón para obtener las concentraciones requeridas para cada uno de los ensayos. Estos se realizaron por duplicado y el valor promedio se utilizó para la determinación de actividad.

4.3.2 Amilasa

La actividad amilasa fue determinada por el método de Rick y Stegbauer (1984). Los homogeneizados fueron diluïdos con una solución tampón de fosfato 5 mM ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y KH_2PO_4 , Sigma, EUA) en presencia de cloruro de sodio (0.9%) a pH 6.9. Posteriormente fueron incubados con una solución de almidón (1 %) durante 10 minutos a 25 °C. La reacción fue detenida mediante la adición de ácido dinitrosalicílico (Kanto Chemical, Japón) y ebullición durante 5 minutos. Una curva

de calibración fue preparada utilizando maltosa (Kanto Chemical, Japón). Las muestras y la curva de calibración fueron leídas a 550 nm en un espectrofotómetro (Jenway, RU). La unidad de actividad de amilasa se definió como el número de micromoles de maltosa liberados por minuto por miligramo de proteína.

4.3.3. **Lipasa**

La actividad lipasa se ensayó mediante el método de Versaw *et al.* (1989) utilizando β -Naftil caprilato (N-8875, Sigma, EUA) como sustrato en una solución tampón de Tris 50 mM, pH 7.2. La reacción se efectuó a 25 °C y fue detenida después de 35 minutos mediante la adición de ácido tricloroacético. Se aplicó una solución de acetato de etilo:etanol (50:50) y se realizó la lectura a 540 nm. Para realizar los cálculos de la actividad lipasa se consideró que una unidad de actividad es igual a la cantidad de enzima que origina un incremento en absorbancia de 0.001/min ($\Delta A_{540 \text{ nm}} 0.001/\text{min}$). Estas unidades se reportaron en base a la proteína disuelta.

4.3.4. **Proteasas**

La actividad de las proteasas se ensayó según el método de García-Carreño (1992) utilizando azocaseína al 2% (A2765, Sigma, EUA) como sustrato disuelto en una solución tampón de tris hidroximetil aminometano (Tris, T-1378, Sigma, EUA) 50 mM, pH 7. La reacción fue detenida mediante la adición de ácido tricloroacético (Chamaleon, Japón) al 20%. Finalmente se leyó en un espectrofotómetro a 440 nm. Para realizar los cálculos de actividad, se consideró que una unidad de actividad es igual a la cantidad de enzima que origina un incremento en absorbancia de 0.001/min ($\Delta A_{440 \text{ nm}} 0.001/\text{min}$). Estas unidades se reportaron en base a la proteína disuelta presente en los homogeneizados.

4.3.5. **Tripsina**

La actividad de la tripsina fue determinada cinéticamente de acuerdo al método de Tseng *et al.* (1982) utilizando hidrocloreuro de N-alfa-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA, B-4875, Sigma, EUA) como sustrato en una solución tampón de tris 50 mM en presencia de cloruro de calcio (20 mM) y a pH 8.2. La reacción se registró en un espectrofotómetro (Jenway, RU) cada 0.9 segundos durante 3 minutos a 407 nm. La temperatura de reacción e incubación fue de 25 °C.

4.3.6 **Quimotripsina**

La actividad enzimática de la quimotripsina se determinó de acuerdo al método descrito en Geiger (1988). El ensayo se efectuó cinéticamente con N-succinil-alanil-alanil-pro-fen-p-nitroanilida 0.02 mM (SAPPNA, S7388, Sigma, EUA) como sustrato en una solución tampón de tris 100 mM a pH 7.8. La reacción se registró cada 0.9 segundos durante 3 minutos a 405 nm. La temperatura de reacción e incubación fue de 25 °C. Una unidad de actividad tripsina y quimotripsina correspondieron a 1 micromol de 4-nitroanilina liberada en un minuto por miligramo de proteína. Los cálculos se basaron en un coeficiente de extinción $\epsilon_{405} = 10.2 \text{ L mmol/cm}$ (Geiger, 1988; Geiger y Fritz 1988).

4.3.7. **Proporción amilasa/proteasas**

La proporción amilasa/proteasas es un valor frecuentemente utilizado para caracterizar las capacidades digestivas (Lovett y Felder 1990). Las proporciones amilasa/tripsina, amilasa/quimotripsina, lipasa/amilasa y tripsina/lipasa también fueron calculadas como indicadores de actividad predominante.

4.3.8. Proteína soluble

La determinación de proteína soluble se efectuó en homogeneizados diluídos mediante el método de Bradford (1976) usando albúmina sérica bovina (A7030, Sigma, EUA) en una concentración de 1 mg/mL como estándar y aplicando el protocolo establecido en Bio-Rad (Bio Rad Laboratories, EUA). Las lecturas se efectuaron a una longitud de onda de 595 nm.

4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de actividad de las diferentes enzimas digestivas obtenidos para cada grupo de peso fueron verificados para determinar distribuciones normales. La homogeneidad de varianzas se verificó mediante una prueba de Bartlett. Posteriormente los grupos fueron comparados entre sí mediante un análisis de varianza de una vía. En caso de obtener diferencias significativas, los datos fueron sometidos a comparaciones múltiples mediante una prueba de diferencia mínima significativa (método de Fisher). Los datos que no presentaron homocedasticidad fueron analizados mediante una prueba de Kruskal-Wallis y posteriormente sometidos a comparaciones múltiples mediante el procedimiento de Dunn. Análisis de correlación de Pearson fueron aplicados para determinar asociaciones positivas o negativas significativas entre las diferentes actividades enzimáticas. Los análisis estadísticos se efectuaron a un nivel de significancia de 0.05 utilizando los paquetes estadísticos Data Desk (6.1, Ithaca EU, 1997) y Statistica (StatSoft, EU, 1994).

5. RESULTADOS

5.1. CONDICIONES DE MUESTREO

El período de muestreo en la granja camaronera OPUMARSA fue desde el 21 de Diciembre del 2000 hasta el 5 de Marzo del 2001. Se eligió un estanque de 8 ha. La temperatura del agua se mantuvo entre 25 y 27 °C y la salinidad entre 33 y 35 ups. Se realizaron seis muestreos para la determinación de la actividad enzimática. Los promedios de peso para cada uno de los muestreos se presentan en la Tabla 1. Con el objetivo de facilitar la interpretación de los datos los promedios fueron redondeados al número entero más cercano. Los camarones de 2 y 4 g también fueron usados para las determinaciones de contenido estomacal. El período de muestreo en la camaronera La Josefina incluyó los meses de Abril y Mayo del 2001. En esta última camaronera se colectaron individuos de 6, 8 y 10 g para complementar los ensayos de contenido estomacal. Las muestras se tomaron de un estanque de 9 ha. La temperatura se mantuvo entre 25 y 28 °C y la salinidad entre 16 y 19 ups. Ambas camaroneras usaron un alimento artificial con 22% de proteína adicionado con antibióticos (litoflaxina en la primera camaronera y citrinal en la segunda).

Tabla 1. Promedio de pesos corporales y proporciones de las actividades enzimáticas digestivas de *Litopenaeus vannamei* cultivado semi-intensivamente.

Peso promedio (g)	1.9 ± 0.5 ^a	3.6 ± 0.6 ^a	6.4 ± 0.6 ^b	8.3 ± 0.5 ^c	9.9 ± 0.7 ^d	11.9 ± 0.7 ^e
Proporción amilasa/proteasa	2.6 ^a	4.2 ^a	4.1 ^a	6.7 ^b	8.1 ^b	9.6 ^c
Proporción tripsina/lipasa	15.0 ^b	5.5 ^a	5.7 ^a	3.6 ^a	2.7 ^a	3.7 ^a
Proporción lipasa/amilasa	45 ^a	36 ^a	48 ^a	67 ^b	58 ^b	50 ^{ab}
Proporción Amilasa/tripsina (10 ⁻³)	4.2 ^a	7.1 ^{ab}	9.2 ^b	8.7 ^b	9.6 ^b	8.0 ^{ab}
Proporción Amilasa/quimotripsina (10 ⁻³)	1.4 ^c	1.1 ^c	0.5 ^b	0.3 ^a	0.2 ^a	0.1 ^a

Literales diferentes indican diferencias significativas a una P <0.05

5.2. CONTENIDO ESTOMACAL

Durante el período de estudio se disectaron un total de 228 estómagos de los cuales solamente dos no contuvieron alimento. El contenido estomacal expresado en peso húmedo para los camarones de 2 g correspondió a un 0.1% (2.7 mg) de su peso corporal y se incrementó hasta un 0.4% (38 mg) en camarones de 10 g (Fig. 1). El peso del contenido estomacal fue muy variable dentro de cada una de las edades muestreadas. El alimento natural constituyó el 91% de la dieta de *L. vannamei* en condiciones de cultivo semi-intensivo. El promedio de los 5 muestreos para los diferentes elementos presentes en los camarones de 2 a 10 g fue 46% detritos, 28% material vegetal, 12% presas, 9% alimento artificial y 5% minerales.

5.2.1. Material vegetal

El material vegetal encontrado en los camarones de 2 y 4 g difirió cuantitativa y cualitativamente respecto al observado en los camarones de 6, 8 y 10 g (Fig. 2-e) El porcentaje de material vegetal en los camarones de 2 y 4 g fue de 23 y

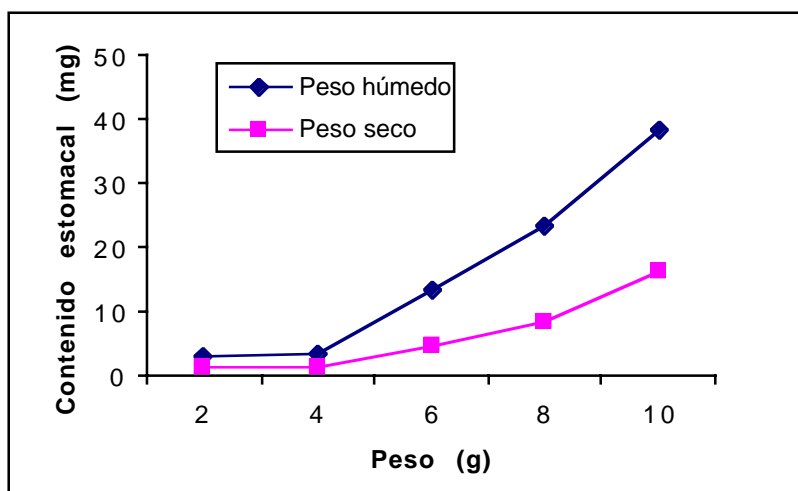


Fig.1 Peso húmedo y peso seco del contenido estomacal presente en *L. vannamei* en diferentes pesos corporales.

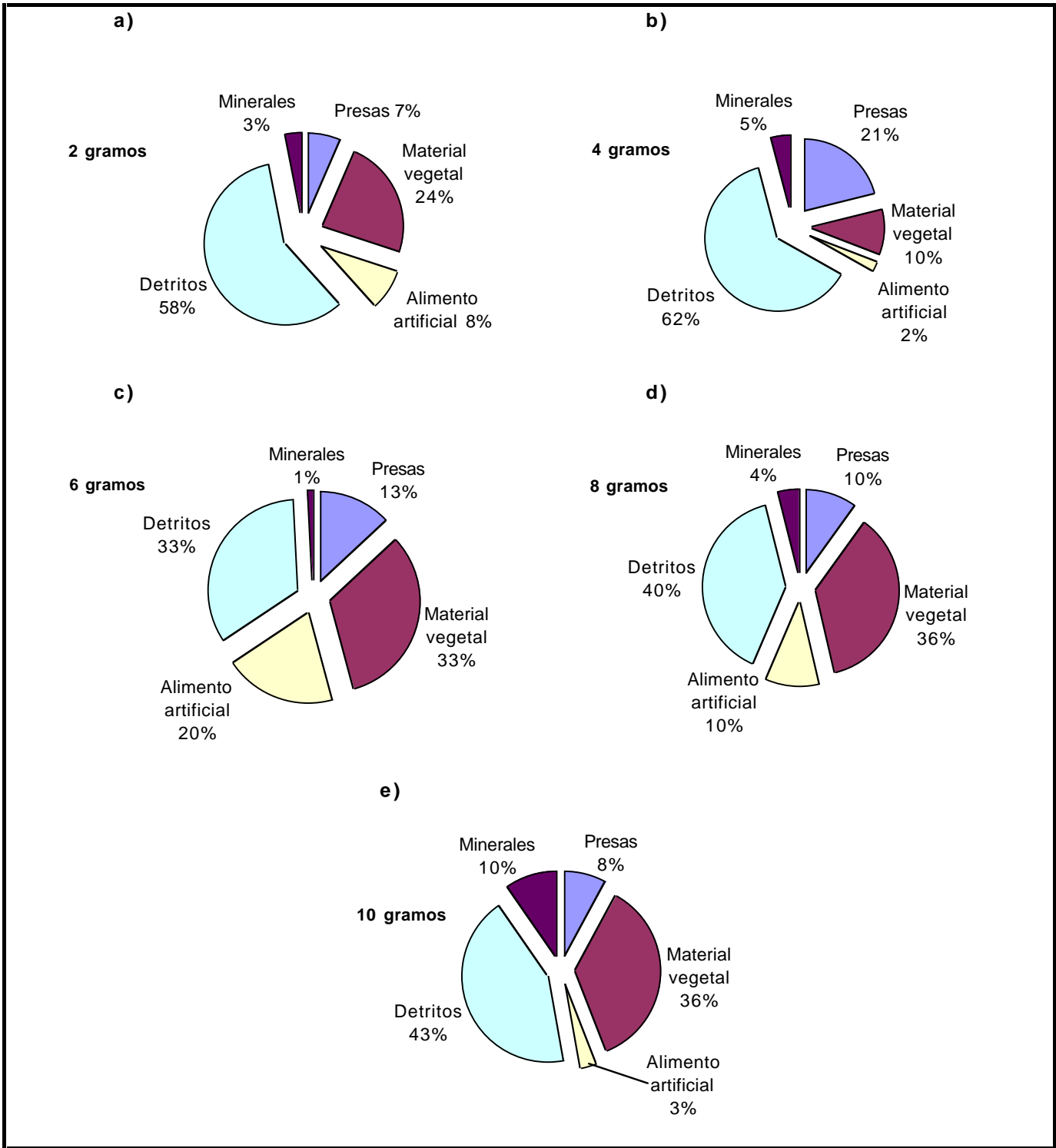


Fig 2. Contribución porcentual de cada elemento alimenticio presente en los contenidos estomacales de *Litopenaeus vannamei* en diferentes pesos corporales.

10% respectivamente. El 2% de los estómagos de los camarones de 2 g presentó diatomeas y el 10% fragmentos de plantas macrofitas. El 15% de los estómagos de los camarones 2 y 4 g revelaron algas filamentosas. En cambio, en los camarones de 6 g y mayores, el material vegetal aportó una contribución más alta (> 30%) al contenido estomacal total. En los estómagos de estos camarones se observó un mínimo de algas filamentosas (2%) y un aporte mayor de fragmentos de plantas macrofitas (presente en un 18, 65 y 74% de los estómagos de camarones de 6, 8 y 10 g respectivamente) y diatomeas (presentes en un 40, 15 y 29% de los estómagos de camarones de 6, 8 y 10 g respectivamente). Las diatomeas estuvieron representadas principalmente por los géneros *Cocconeis*, *Cymbella*, *Navicula*, *Amphora* y *Gyrosigma*.

5.2.2. **Presas**

La proporción de presas fue mayor en los camarones de 4 g (20 %) (Fig. 2a-e). Los camarones de 6, 8 y 10 g presentaron un porcentaje de presas de 13, 10 y 8% del contenido estomacal total. Las presas estuvieron representadas por copépodos harpacticoides, nemátodos, foraminíferos, fragmentos de exoesqueletos y apéndices de insectos y crustáceos.

5.2.3. **Alimento artificial**

El alimento artificial contribuyó en forma variable en las diferentes etapas del cultivo. Se determinó un mínimo de 2% de la contribución total en camarones de 4 g (Fig. 2a-e) y un máximo de 20% en camarones de 6 g. La proporción de alimento artificial disminuyó en las edades posteriores.

5.2.4. **Detritos**

Los detritos fueron un elemento muy importante del material ingerido en todos los tamaños y estuvo presente en un 99.1% de los estómagos disectados durante el período de estudio (Fig. 2a-e). Se observó un aporte del 60 y 64% del contenido estomacal total en camarones de 2 y 4 g respectivamente. La cantidad de material detrital disminuyó en edades posteriores observándose una contribución no menor a 33% del contenido estomacal total en los camarones más grandes.

5.2.5. **Minerales**

Un promedio de 5% de minerales se observó en el contenido estomacal a lo largo del cultivo, alcanzando un máximo de 10% en los camarones de 10 g (fig. 2e). El material mineral consistió en cieno y granos finos y medianos de arena.

5.3. **ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

Todos los sustratos utilizados resultaron sensibles a las respectivas enzimas presentes en los homogeneizados. La actividad de la amilasa, lipasa y proteasas totales se determinaron mediante la técnica de punto final, mientras que la actividad tripsina y quimotripsina fueron evaluadas cinéticamente. La concentración de proteína en el hepatopáncreas fue 311 ± 50 mg prot/g hepatopáncreas como promedio para los seis grupos de peso. La totalidad de las actividades enzimáticas ensayadas presentaron diferencias significativas en alguno de los diferentes pesos (Fig. 3a-e).

5.3.1. **Amilasa**

La actividad amilasa fue significativamente menor ($P < 0.05$) en camarones de 2 g, incrementándose aproximadamente al doble a partir de los 4 y hasta los 12 g (Fig.

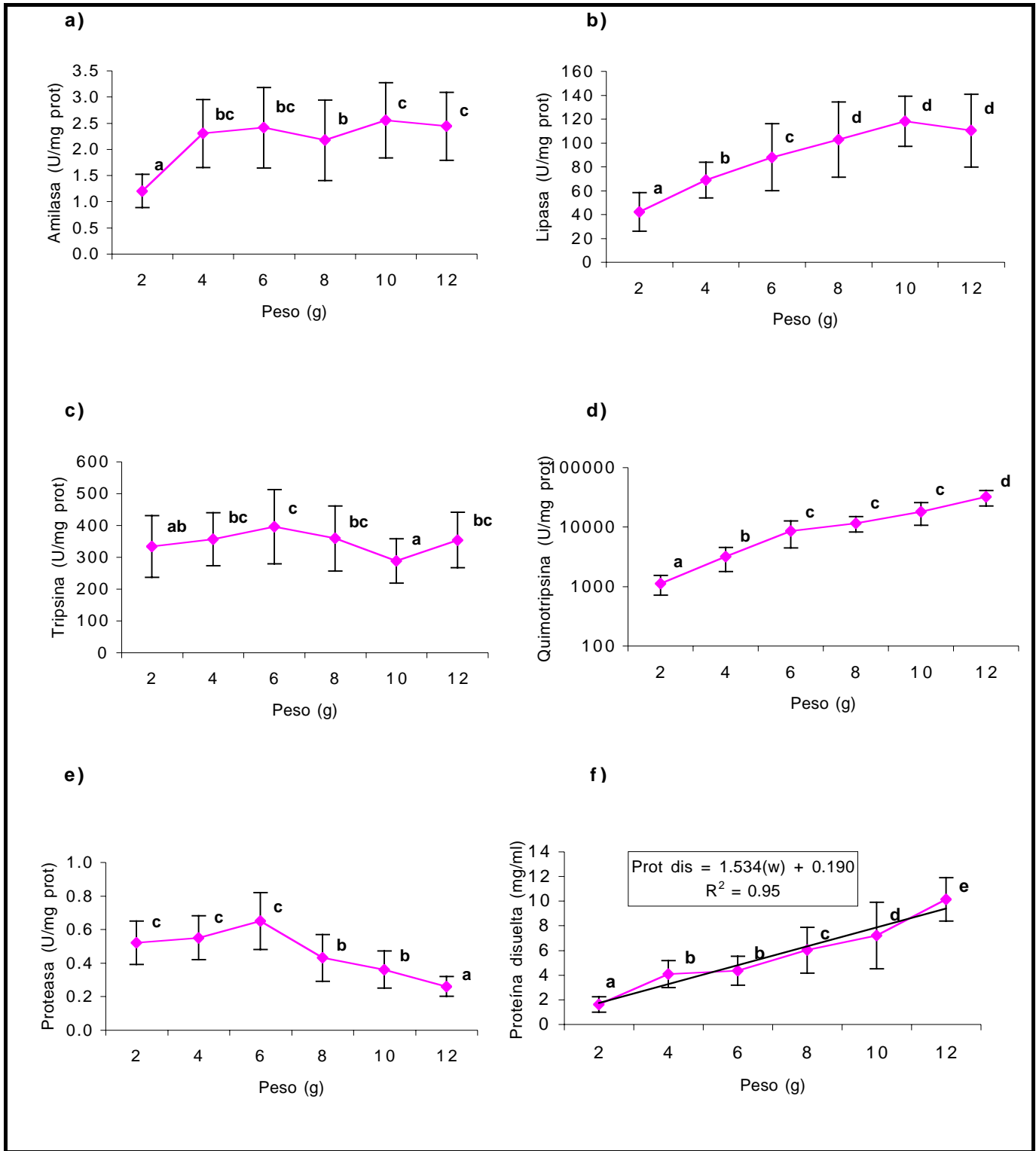


Fig 3. Actividad enzimática específica de (a) amilasa, (b) lipasa, (c) tripsina, (d) quimotripsina, (e) proteasas y (f) proteína disuelta de *L. vannamei* en diferentes pesos corporales. Las barras y los literales diferentes indican desviaciones estándar y diferencias significativas ($p < 0.05$) respectivamente. La actividad quimotripsina aparece en escala logarítmica.

3a). Un descenso significativamente menor a los camarones de 10 y 12 g fue registrado cuando se alcanzaron los 8 g

5.3.2. **Lipasa**

La actividad lipasa se incrementó significativamente ($P < 0.05$) entre los pesos 2, 4 y 6 g a medida que los camarones aumentaron su peso hasta alcanzar su máxima actividad en camarones de 8, 10 y 12 g, entre los cuales no se registraron diferencias significativas (Fig. 3b).

5.3.3. **Proteasas**

Los camarones entre 2 y 6 g presentaron una actividad proteasa estadísticamente ($p < 0.05$) superior a la observada en camarones más grandes (Fig. 3e). La actividad de las proteasas mostró una tendencia a disminuir en el transcurso del período de estudio, donde los animales de 12 g presentaron la actividad más baja.

5.3.4. **Tripsina**

La actividad de la tripsina fue variable durante el período de estudio. No se determinaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la actividad entre los 2, 4, 8 y 12 g, pero sí con respecto a los animales de 6 g ya que estos mostraron la actividad más alta para posteriormente disminuir desde los 8 g y alcanzar su valor más bajo en 10 g (Fig. 3c).

5.3.5. **Quimotripsina**

Durante el período de estudio, la actividad de la quimotripsina presentó un incremento positivo correlacionado al crecimiento de los camarones (Fig. 3d, Tabla 2). Diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las actividades de los animales en 2,

4 y 6 g fueron establecidas, mientras que entre 6, 8 y 10 g no se encontraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$). Sin embargo, un nuevo incremento significativo ($P < 0.05$) fue determinado a los 12 g.

5.4. PROTEÍNA DISUELTA.

La concentración de proteína disuelta en el hepatopáncreas se incrementó significativamente conforme los camarones incrementaban de peso. La figura 3f muestra los valores de regresión del peso corporal del camarón y los valores de proteína disuelta. La variabilidad en proteína asociada al modelo fue de 95% (r^2). Considerando las condiciones experimentales bajo las cuales se realizó este estudio de 10 semanas con animales de 2 a 12 g, el método de Fisher reportó diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre cada una de las concentraciones de proteína a excepción de los camarones de 4 y 6 g los cuales no presentaron diferencias entre sí.

Tabla 2. Matriz de correlación del peso promedio, proteína disuelta y actividades enzimáticas

Variable	Peso	Amilasa	Tripsina	Quimotripsina	Proteasas	Lipasa	Proteína hp
Peso	1	0.716	-0.165	0.941*	-0.77	0.949*	0.962*
		P= 0.109	P= 0.755	P= 0.005	P= 0.073	P= 0.003	P= 0.002
Amilasa		1	0.095	0.577	-0.278	0.829*	0.714
			P= 0.857	P= 0.231	P= 0.593	P= 0.041	P= 0.11
Tripsina			1	-0.161	0.589	-0.194	-0.153
				P= 0.76	P= 0.218	P= 0.712	P= 0.772
Quimotripsina				1	- 0.834*	0.797	0.968*
					P= 0.038	P= 0.057	P= 0.001
Proteasas					1	-0.64	- 0.819*
						P= 0.17	P= 0.046
Lipasa						1	0.876*
							P= 0.022
Proteína hp							1

*Correlaciones con asterisco son significativas a una $P < 0.05$

5.4. CORRELACIÓN ENTRE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Únicamente las actividades lipasa y quimotripsina mostraron una correlación positiva con el peso. La actividad de la amilasa y lipasa presentaron una correlación positiva significativa ($r= 0.82$) entre ellas, mientras que la actividad de las proteasas y la actividad quimotripsina mostraron una correlación negativa significativa ($r= -0.83$). El resto de las enzimas no presentaron correlaciones significativas al ser comparadas entre ellas (Tabla 2). La proporción amilasa/proteasas se incrementó significativamente con el incremento de peso corporal (Tabla 1), mientras que las proporciones tripsina/lipasa y amilasa/quimotripsina mostraron una disminución con el incremento corporal. Las proporciones amilasa/tripsina y lipasa/amilasa permanecieron relativamente estables.

6. DISCUSIÓN

6.1. CONTENIDO ESTOMACAL

Algunos estudios indican que las especies de peneidos pueden llenar su proventrículo en 10 minutos para después vaciarlo completamente en 2 a 4 horas (Marte 1980; Wassenberg y Hill 1987). La identificación de los elementos presentes en el contenido estomacal es posible gracias a la constante actividad alimenticia que los camarones ejercen en el sustrato para mantener pequeñas cantidades de material orgánico en el proventrículo (Cuzon *et al.* 2000). Sin embargo, los componentes que han permanecido un tiempo mayor a 2 horas han sido sometidos a una trituración mecánica y a una digestión química por lo tanto es muy difícil, si no imposible, reconocerlos mediante el microscopio (Chong y Sasekumar 1981). Esta es una de las razones por las cuales en el presente y otros estudios se encuentran altas proporciones de detritos en el estómago. No obstante, existen otros métodos que permiten identificar los componentes del contenido estomacal que se han asimilado en el tiempo y están visualmente irreconocibles. Por ejemplo, Hunter y Feller (1987) evaluaron inmunológicamente los elementos en la dieta de *F. aztecus* y *L. setiferus*. Mientras que en otros estudios, Riera *et al.* (2000) y Schwamborn y Criales (2000) determinaron las preferencias alimenticias de *F. aztecus* y *F. duorarum*, respectivamente, mediante la cuantificación de las proporciones isotópicas de los camarones y de varios componentes de sus dietas en el medio natural. En el presente estudio, la identificación de los componentes del contenido estomacal de acuerdo a la técnica descrita en Focken *et al.* (1998), fue facilitada mediante la observación microscópica previa de muestras de bentos de la piscina de cultivo y muestras de alimento artificial, así como de sus ingredientes individuales. Los diferentes elementos encontrados en los contenidos estomacales y sus respectivas proporciones corresponden a los hábitos alimenticios omnívoro-herbívoros descritos por Hunter y Feller (1987) para el sub-género *Litopenaeus*. Ciertos

componentes presentes en el contenido estomacal son indigeribles o lentamente digeribles (granos de arena, fragmentos de plantas, exoesqueletos) por lo tanto pueden permanecer dentro del proventrículo por más tiempo que otros componentes (Schwamborn y Criales 2000). Este hecho puede originar una sobrestimación en la cuantificación de estos componentes. Sin embargo Marte (1980) observó que algunos individuos de *P. monodon* presentaban grandes cantidades de fragmentos de conchas de moluscos en el intestino pero no en los estómagos por lo tanto concluye que este tipo de material si puede pasar a través del tracto digestivo pero probablemente lo hace a una tasa menor que el material suave.

La dieta de los camarones cultivados en sistemas extensivos y semi-intensivos está total o mayoritariamente compuesta de alimento natural debido a que los fondos de estos estanques son orgánicamente ricos y ofrecen una variedad de fuentes alimenticias presentes naturalmente (Nunes *et al.* 1997; Focken *et al.* 1998). Durante el período del presente estudio, se determinó un aporte promedio de alimento natural del 91.3%, mientras que la contribución promedio del alimento artificial fue de 8.7%.

El material vegetal encontrado en los camarones de 2 y 4 g mostró una diferencia cuantitativa y cualitativa respecto al observado en los camarones de 6, 8 y 10 g debido a que fueron colectados en diferentes camaroneras. En los camarones de 6 g y mayores, el material vegetal aportó una contribución mayor al 30% del contenido estomacal total (Fig 2c-e). Fue notable el aporte de fragmentos de plantas macrofitas ya que estuvieron presentes en un 65 y 74% del total de los estómagos de camarones en 8 y 10 g, respectivamente. No se observaron plantas macrofitas acuáticas creciendo en el estanque, pero en cambio, se observó una gran cantidad de plantas herbáceas y arbustivas alrededor de este. Por lo tanto los fragmentos observados en los contenidos estomacales de los camarones de 6, 8 y 10 g pudieron haberse derivado de tales plantas y probablemente fueron

transportados por el viento u otras acciones mecánicas hacia el estanque. Riera *et al.* (2000) observaron que *Farfantepenaeus aztecus* en el medio natural, consume detritos de plantas terrestres que son transportadas por los ríos hacia los estuarios. Focken *et al.* (1998) también encontraron fragmentos de plantas vasculares en estómagos de *P. monodon* a pesar de que no había plantas acuáticas en los estanques, por lo tanto concluyeron que estos fragmentos pudieron haber sido transportados desde sitios lejanos por el viento o se originaron durante las operaciones de limpieza y preparación de los estanques.

En el medio natural, los camarones depredan sobre presas cuyo valor nutritivo ha sido evaluado. Por ejemplo, Dall *et al.* (1991) determinaron que las presas (moluscos, crustáceos y poliquetos) que conforman parte de la dieta de *P. esculentus* contienen un rango de 67 a 83% de proteína (en base seca libre de cenizas), 10 a 21% de lípidos y 6 a 22% de carbohidratos. En los fondos de los estanques, la fauna bentónica puede ser muy diversa y está constituida por varias especies de presas potenciales para los camarones (Rubright *et al.* 1981). En el presente trabajo, el contenido estomacal correspondiente a presas estuvo representado por copépodos, fragmentos de exoesqueletos, insectos, foraminíferos y nemátodos. No es posible afirmar si los fragmentos de exoesqueletos encontrados en el estómago pertenecían a presas vivas o muertas, o incluso a exuvias de los propios camarones. De cualquier forma, los hábitos omnívoros-herbívoros de esta especie le permiten tomar ventaja de varios tipos de fuentes alimenticias. Trabajos previos indican que la disponibilidad de organismos presa está en función a (1) la densidad de siembra de los organismos consumidores, (2) la dinámica poblacional intrínseca de cada especie y (3) el comportamiento circadiano de las especies presa ya que ha sido observado que poliquetos, crustáceos y otros animales salen del sustrato para alimentarse en el período nocturno (Nunes 1996; Nunes y Parsons 2000a).

Reymond y Lagardère (1990) observaron en individuos de *M. japonicus* que el alimento artificial no excedió el 4% del volumen estomacal en camarones de 0.5 a 7 g y que en este último período una cantidad de alimento artificial tan alta como 65% no fue consumida. El alimento artificial no consumido es descompuesto por bacterias y los nutrientes liberados estimulan la productividad natural al igual que los fertilizantes. En un estudio con *L. vannamei* cultivado (20 ind/m²), Anderson *et al.* (1987) determinaron que la biota presente en los estanques de cultivo contribuye con 53 a 77% del carbon destinado para el crecimiento, mientras que el alimento peletizado otorga de 23 a 47%. En el presente estudio, la marcada disminución en la proporción del alimento artificial en el contenido estomacal a partir de los 6 g de peso (Fig. 2c-e) puede estar relacionada con la observación realizada por Uribe y Posada (1998) en la que se indica que el consumo de alimento artificial aumenta semana a semana y tiende a estabilizarse hasta que los camarones alcanzan los 7 u 8 g. Molina y Piña (1999) también encontraron un pico máximo de consumo entre los 8 y 11 g, posteriormente observaron una disminución; sin embargo, la tasa de crecimiento se mantuvo ascendente. En el presente estudio, a mayor peso corporal se observó una mayor preferencia por alimento natural posiblemente porque los organismos buscan nutrientes más apropiados para la subsecuente etapa reproductiva. El cambio en la preferencia alimenticia provoca que la tasa de crecimiento se vea soportada por los nutrientes presentes en los diferentes elementos de la productividad natural. A pesar de que el alimento artificial presenta una baja contribución con respecto al aporte de la productividad natural en los sistemas de cultivo semi-intensivos, este puede tener una importancia mayor a su modesta presencia en el estómago debido a su alta digestibilidad cuando se le compara con componentes del contenido estomacal como los tejidos vegetales y los materiales orgánicos con alto contenido de fibra (Focken *et al.* 1998). Por ejemplo, después de analizar el contenido de 869 estómagos, Nunes (1995) determinó que el alimento artificial contribuyó solamente a un 15.7% del contenido estomacal de *Farfantepenaeus subtilis* cultivado semi-intensivamente y suministrado con alimento artificial (5-15% del peso corporal).

Sin embargo, se determinó mediante un ensayo de espectrofotometría de masa (carbono 13) que este alimento artificial aportó 24.9% del peso corporal ganado (Nunes 1995).

Los camarones peneidos pueden alimentarse micro- y macrófagamente. Hunt *et al.* (1992) demostraron que la gran eficiencia de la alimentación micrófaga (ingestión de material particulado) se debe a los movimientos coordinados de las piezas bucales anteriores y a las series de setas presentes en estas. En el presente ensayo, se observó que las altas cantidades de detritos presentes en el contenido estomacal (Fig. 2a-e), son similares a las reportadas en otros peneidos como *Macropetasma africanus* (Cockcroft y McLachlan 1986), *F. subtilis* (Nunes *et al.* 1997) y *P. monodon*, especie en cuyos estómagos Bombeo-Tuburan *et al.* (1993) observaron a los detritos como el alimento más común. Por el contrario, Chong y Sasekumar (1981) determinaron que *Fenneropenaeus merguensis* en su medio natural, excluye a los detritos de la dieta cuando existe una abundancia de presas y concluyen que probablemente ésta especie elige los detritos como un suplemento cuando otros alimentos preferidos están ausentes. Los detritos representan una contribución alimenticia muy importante para la dieta de los camarones y los microorganismos presentes constituyen del 5 al 10% de la masa detrital en peso (Moriarty 1997). Se ha sugerido que estos microorganismos son más nutritivos que los detritos por sí solos (Fenchel 1970). Hunter *et al.* (1987) evaluaron la composición bioquímica de la biota de estanques y determinaron que la composición de los detritos es 14.8% proteína, 1.6% de lípidos y 1.1% de carbohidratos en base porcentual seca. Además, el cálculo de la proporción proteína:energía para los detritos fue el más alto de entre todos los otros elementos de la biota (Hunter *et al.* 1987). Qasim y Easterston (1974) realizaron pruebas de digestibilidad con *Metapenaeus monoceros* y sus resultados indican que la digestibilidad de los detritos es alta (93%); aunque su contenido energético es bajo (458 cal/g) en base al peso húmedo. Las bacterias pueden servir como una fuente de alimento cuando la proteína bacteriana se libera por lisis (Hood y

Meyers 1974), también pueden ser una fuente de vitaminas y probablemente producen enzimas digestivas (Ceccaldi 1997). Hood y Meyers (1974) observaron que el 85% de las diferentes bacterias presentes en el tracto digestivo de *L. setiferus* elaboran enzimas quitinasas, las cuales contribuyen a la digestión de los exoesqueletos propios mudados y los de otros crustáceos presas.

Nunes *et al.* (1996) consideran que la presencia de material mineral en el contenido estomacal de los camarones puede ser consecuencia de un consumo accidental de otro tipo de sustrato bentónico. Además, en el presente estudio se observó que estómagos que contenían un porcentaje alto de granos de arena presentaban una cantidad nula o muy baja de diatomeas. Por lo tanto, es posible asumir que las cubiertas silíceas fueron trituradas mediante la acción conjunta de los movimientos del estómago y los granos de arena.

6.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Una de las principales variables que afecta a la actividad de las enzimas es la temperatura debido a que la velocidad de las reacciones que estas catalizan se incrementa cerca del doble por cada incremento de 10 °C (Lehninger 1986). La actividad bacteriana, la actividad de las enzimas digestivas y la actividad de las enzimas asociadas a los cambios post-mortem (catepsinas, calpains y colagenasas) se reducen notablemente cuando se expone a los animales y sus productos a bajas temperaturas (Huss 1999). Lovett y Felder (1990) y Omondi y Stark (1996; 2001) demostraron que la congelación y almacenamiento (-70 °C, 6 meses; -22.4 °C, 2 meses y -22.4 °C, 18 meses, respectivamente) de los hepatopáncreas y sus homogeneizados, no afecta significativamente a la actividad enzimática digestiva presente en estos cuando se le compara con homogeneizados de hepatopáncreas recién disectados. En el presente trabajo los hepatopáncreas y sus homogeneizados fueron almacenados por menos de 2

meses a -20 °C por lo tanto se asume un efecto no significativo del almacenamiento sobre la actividad enzimática.

La actividad enzimática específica se expresa en base a la proteína, por lo tanto, esta actividad sigue el mismo patrón que la concentración de la proteína soluble con respecto al crecimiento (Le Moullac *et al.* 1994). En el presente estudio se determinó un aumento significativo de la proteína soluble en el hepatopáncreas correlacionado a la ganancia de peso corporal (Fig. 3f). Este hecho está relacionado al aumento de volumen que experimenta el hepatopáncreas durante el crecimiento (Lovett y Felder 1989). La concentración promedio de proteína en el hepatopáncreas fue 311 mg prot/g hepatopáncreas, mayor que la reportada por Mac Donald *et al.* (1989) para adultos de *P. monodon* (180 mg/g) y mucho más alta que la determinada por Omondi y Stark (2001) en *Fen. indicus* (62 mg/g).

Ha sido hipotetizado que la actividad enzimática digestiva es alta para aquellos sustratos que son más comunes en la dieta (Cox 1981; Johnston y Yellowlees 1998). Sin embargo, estudios sobre la relación existente entre la actividad enzimática y los supuestos sustratos alimenticios son controversiales porque otra serie de estudios en larvas y postlarvas de *M. japonicus* (Rodríguez *et al.* 1994; Lemos y Rodríguez 1998) sugiere que puede ocurrir una secreción alta de enzimas para maximizar el uso de un componente escaso en la dieta. A pesar de esta controversia, se toma en consideración el estudio de la actividad enzimática como un indicador del estado trófico (Galgani *et al.* 1985) debido a que los tipos y las propiedades de las enzimas digestivas de los camarones definen capacidades digestivas (Divakaran y Ostrowski 1990). Por ejemplo, Rodríguez *et al.* (1994) describieron influencias individuales e interactivas en la alimentación herbívora y zooplánctívora sobre la composición bioquímica de larvas de *M. japonicus* y la respuesta adaptativa de la actividad enzimática digestiva ante la dieta. Lee *et al.* (1980) observaron que una alta proporción de actividad proteasa refleja un comportamiento alimenticio carnívoro, mientras que una alta proporción de

actividad carbohidrasa es característica de herbívoros. Una combinación de ambas es encontrada en omnívoros.

Lee *et al.* (1984) consideran que *L. vannamei* experimenta un cambio en su régimen dietario cuando alcanza los 10 a 20 g de peso debido a que observaron diferencias en las respuestas de las enzimas proteasas ante la calidad de la proteína en tres tamaños diferentes de camarones, por lo tanto concluyen que estas diferencias podrían indicar una mayor habilidad de la utilización de la proteína en camarones pequeños (4 g) que en grandes (10 y 21 g). En otro estudio con *L. vannamei* que cubrió tamaños corporales desde 1 hasta 14 g, Hunter *et al.* (1987) determinaron un incremento en la proporción C:N del material ingerido y observaron que el contenido de nitrógeno del material estomacal disminuyó a más de la mitad cuando los camarones incrementaron su peso de 5 a 7 g, posteriormente continuó un descenso hasta los 12 g. Los autores concluyen que este fenómeno puede implicar que los camarones seleccionan dietas con menos proteína en los estadios de vida más tardíos. Estas observaciones previas podrían estar relacionadas a la disminución de la actividad de las proteasas (Fig. 3e) y al incremento en la proporción de las actividades amilasa/proteasas (Tabla 1) registrados en el presente estudio. Una adaptación digestiva ante nuevas preferencias alimenticias podría estar ocurriendo porque aparentemente en los estadios de vida más tardíos, las enzimas digestivas de *L. vannamei* se ajustan a sustratos con menor contenido proteínico (disminución de la actividad de las proteasas) y con mayor contenido de carbohidratos y lípidos (mantenimiento o aumento de la actividad amilasa y lipasa). La disminución en el consumo de alimento artificial determinada a partir de los 8 g de peso en el presente y otros trabajos (Uribe y Posada 1998; Molina y Piña 1999) puede estar en relación directa a la disminución de la actividad de las enzimas proteasas y la tripsina, mientras que por otro lado, el mantenimiento de la actividad amilasa podría representar una respuesta fisiológica ante el mayor consumo de material vegetal y de otros elementos de la productividad natural.

Le Moullac (1995) determinó que en juveniles de *L. vannamei* la proporción de amilasas/proteasas totales se incrementó en 4 ordenes de magnitud desde los 2 hasta los 12 gramos mientras que la proporción amilasa/tripsina y amilasa/quimotripsina se incrementaron ligeramente. Respuestas similares fueron observadas en el presente trabajo, ya que la proporción amilasa/proteasas fue de 2.6 en camarones de 2 g y se incrementó establemente hasta 9.6 en camarones de 12 g (Tabla 1). De igual manera, la proporción amilasa/tripsina se incrementó ligera pero significativamente. Sin embargo, la proporción amilasa/quimotripsina fue diferente a la reportada por el autor ya que en el presente estudio, esta proporción disminuyó marcadamente con el incremento del tamaño corporal.

A pesar de que en organismos vertebrados existe una correlación entre las actividades de la tripsina y la quimotripsina (Lhoste *et al.* 1994), varios ensayos con crustáceos han resultado negativos en cuanto a la identificación de esta correlación. Le Moullac *et al.* (1996) no encontraron ésta correlación en juveniles de *L. vannamei*, mientras que Guzman *et al.* (2001) determinaron una correlación significativa ($r = 0.71$) en postlarvas de *L. setiferus*. Una carencia de correlación entre la actividad tripsina y quimotripsina ($r = -0.16$) fue observada en el presente estudio (Tabla 2), mientras que la actividad de la amilasa y lipasa presentaron una correlación positiva significativa ($r = 0.829$), indicando un aumento en la secreción de ambas que se correlaciona también a la ganancia de peso corporal.

Lee y Lawrence (1985) determinaron que en *L. setiferus* la actividad específica de la tripsina y de la amilasa fue mayor en camarones de 4 g que en camarones de 9 y 14 g alimentados con dietas con 22% de proteína. Los autores concluyen afirmando que el incremento en la actividad enzimática digestiva puede tener una relación negativa con el crecimiento corporal y la digestibilidad de la dieta, aunque esta relación no es significativa. En el presente estudio no se observó esta tendencia ya que la actividad amilasa (Fig. 3a) fue menor en los 4 g de peso y se incrementó significativamente en individuos de 10 y 12 g, por otro lado, la actividad

de la tripsina no presentó diferencia significativa entre los pesos 2, 4, 8 y 12 g. Los resultados obtenidos en el presente y otros estudios (Le Moullac, 1995), no permiten afirmar de forma general que la actividad enzimática digestiva tiene una relación negativa con el crecimiento corporal, ya que para algunas enzimas parece ser este el caso (proteasas, tripsina) pero otras presentan un incremento en su actividad respecto al tamaño corporal (lipasa, quimotripsina).

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

La marcada disminución en la proporción del alimento artificial en el contenido estomacal a partir de los 6 g de peso sugiere que en esta etapa ocurre un cambio en la preferencia alimenticia y que la tasa de crecimiento está soportada por los nutrientes presentes en los diferentes elementos de la productividad natural.

A mayor peso corporal se observó una mayor preferencia por alimento natural posiblemente porque los organismos buscan nutrientes más apropiados para la subsecuente etapa reproductiva.

La disminución en la actividad específica de la tripsina y las proteasas totales podría indicar una mayor habilidad para la utilización de la proteína en camarones pequeños (2-6 g) que en grandes (8-12 g). Este fenómeno puede implicar que los camarones seleccionen dietas con menor contenido protéico en estadíos de vida más avanzados.

Una adaptación digestiva ante nuevas preferencias alimenticias podría estar ocurriendo porque aparentemente en los estadíos de vida más tardíos, las enzimas digestivas de *L. vannamei* se ajustan a sustratos con menor contenido proteínico (disminución de la actividad de las proteasas) y con mayor contenido de carbohidratos y lípidos (mantenimiento o aumento de la actividad amilasa y lipasa).

Es necesaria una mayor investigación que incluya la determinación de la actividad de estas y otras enzimas digestivas en camarones de pesos mayores a los evaluados en el presente trabajo, mientras que la estimación de las tendencias de la actividad enzimática digestiva en individuos cercanos a la maduración sexual (en particular la actividad de las lipasas) podría contribuir a la elaboración de dietas más apropiadas para reproductores.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

AKIYAMA, D. M., DOMINY, W. G. y LAWRENCE, A. 1992. Penaeid shrimp nutrition. En: Fast, A. W., Lester, J. (Eds.) Marine Shrimp Culture: Principles and Practices. Elsevier. Amsterdam. pp. 535-567.

ANDERSON, R. K., PARKER, P. L. y LAWRENCE, A. L. 1987. A $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ tracer study of the utilization of presented feed by a commercially important shrimp *Penaeus vannamei* in a pond growout system. En: Crustacean nutrition advances in world aquaculture, 1997 Vol 6 (ed. by D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. y Akiyama, D.M.). World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. USA. 587 pp.

BOMBEO-TUBURAN, I., GUANZON, N. G. Y SCHROEDER, G. L. 1993. Production of *Penaeus monodon* (Fabricius) using four natural food types in an extensive system. Aquaculture 112, 57-65.

BRADFORD, M.A. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. Anal. Biochemistry. 72, 248-254.

BRITO, R., ROSAS, C., CHIMAL, M. E. y GAXIOLA, G. 2001. Effect of different diets on growth and digestive enzyme activity in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) early post-larvae. Aquaculture Research 32, 257-266.

CARRILLO, O. y GONZÁLEZ, R. 1998. Control de la digestión en camarones. En: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. La Paz, B. C. S., México.

CECCALDI, H. J. 1997. Anatomy and physiology of the digestive system. En: Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture, 1997 Vol. 6 (ed. by D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. y Akiyama, D.M.). World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. USA. pp 261-291.

CHONG, V. C. y SASEKUMAR, A. 1981. Food and feeding habits of the white prawn *Penaeus merguensis*. Marine Ecology Progress Series Vol. 5, 185-191.

COCKCROFT A. y McLACHLAN, F. 1986. Food and feeding habits of the surf zone penaeid prawn *Macropetasma africanus* (Balss). Marine Ecology 7(4), 347-357.

COUSIN, M., CUZON, G., GULLAUME, J. y AQUACOP. 1996. Digestibility of starch in *Penaeus vannamei*: in vivo and in vitro study on eight samples of various origin. Aquaculture 140, 361-372.

- COX J.L. 1981. Laminarinase induction in marine zooplankton and its variability in zooplankton samples. *Journal of Plankton Research* 3, 345-356
- CRUZ, L. E. 1996. Digestión en camarón y su relación con la formulación y fabricación de alimentos balanceados. En: *Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del III Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. UANL. Monterrey, NL, México. 673 pp.
- CUZON, G., CAHU, C., ALDRIN, J. F., MESSENGER, J. L., STEPHAN, G y MEVEL, M. 1980. Starvation effect on metabolism of *Penaeus japonicus*. En: *Proceedings of the World Mariculture Society* 11, 410-423.
- CUZON, G., ROSAS, C., GAXIOLA, G., TABOADA, G. y VAN WORMHOUDT, A. 2000. Utilization of Carbohydrates by Shrimp. En: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Nov, 2000. Mérida, Yucatán, México.
- DALL, W., SMITH, D. M. y MOORE, L. E. 1991. Biochemical composition of some prey species of *Penaeus esculentus* Haswell Penaeidae: Decapoda. *Aquaculture* 96, 151–166.
- DEERING, M. J., HEWITT D. R. y BROCK I. 1996. Triacylglycerol digestion by the leader prawn *Penaeus monodon*. *Journal of the World Aquaculture Society*. Vol. 27 No. 3, 359-361.
- DEUDERO, S. y MORALES-NIN, B. 2001. Prey selectivity in planktivorous juvenile fishes associated with floating objects in the western Mediterranean. *Aquaculture Research* 32, 481-490.
- DIAZ, G. E. 1997. Horario de alimentación del camarón *Penaeus schmitti* en condiciones de engorde semi-intensivo. Tesis de Maestría. Universidad de La Habana, Cuba. 77 p.
- DIVAKARAN, S. y OSTROWSKI, A. C. 1990. Enzymes present in pancreatic extracts of the dolphinfish *Coryphaena hippurus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 21, 35-40
- DORE, I. y FRIMODT, C. 1987. An illustrated guide to shrimp of the world. Osprey books. Huntington, NY, USA. 229 pp.
- FANG, L. S. Y LEE, B. N. 1992. Ontogenetic change of digestive enzymes in *Penaeus monodon*. *Journal of Comparative Biochemistry and Physiology* 103(4), 1033-1037.

- FENCHEL, T. 1970. Studies on the decomposition of organic detritus from the turtle grass *Thalassia testudinum*. *Limnology and Oceanography* 15, 14-20
- FERNÁNDEZ, I., OLIVA, M., CARRILLO, O. Y VAN WORMHOUDT, A. 1997. Digestive enzyme activities of *Penaeus notialis* during reproduction and moulting cycle. *Journal of Comparative Biochemistry and Physiology*. Vol. 118A No. 4, 1267-1271.
- FOCKEN, U., GROTH, A., COLOSO, R. M. y BECKER, K. 1998. Contribution of natural food and supplemental feed to the gut content of *Penaeus monodon* Fabricius in a semi-intensive pond system in the Philippines. *Aquaculture* 164, 105–116.
- GALGANI, F. G., BENYAMIN, Y. y CECCALDI, H. J. 1984. Identification of digestive proteinases of *Penaeus japonicus*. *Journal of Comparative Biochemistry and Physiology* 78, 355-361.
- GALGANI, F. G., BENYAMIN, Y. y CECCALDI, H. J. 1985. Etude de la trypsine de crustacés penéidés. *Oceanography*, 8, 139-148.
- GARCIA-CARREÑO, F.L. 1992. Protease inhibition in theory and practice. *Biotechnology education*. Vol. 3, No. 4, 145-150.
- GATES, B. y TRAVIS, J. 1973. Purification and characterization of carboxypeptidases A and B from the White Shrimp (*Penaeus seiferus*). *Biochemistry* 12, 1867-1874.
- GEIGER, R. 1988. Chymotrypsin. In: *Methods of enzymatic Analysis*. Vol V Enzymes, 3rd edn (ed. Por J Bergmeyer y M. Grab). Chemie Verlag, Weinhein. pp 99-104.
- GEIGER, R. y FRITZ, H. 1988. Trypsin. In: *Methods of enzymatic Analysis*. Vol V Enzymes, 3rd edn (ed. Por J Bergmeyer y M. Grab). Chemie Verlag, Weinhein. pp 119-129.
- GONZÁLEZ, R., GÓMEZ, M. y CARRILLO, O. 1995. Variaciones cronobiológicas de la actividad de las principales enzimas proteolíticas de *Penaeus schmitti* y *Penaeus notialis*. *Revista de investigaciones marinas* 16(1-3), 177-183.
- GUZMAN, C., GAXIOLA, G., ROSA, C. y TORRE-BLANCO, A. 2001. The effect of dietary protein and total energy content on digestive enzyme activities, growth and survival of *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus 1767) postlarvae. *Aquaculture Nutrition* 7, 113 –122.

- HARMS, J., ANGER, K., KLAUS, S. y SEEGER, B. 1991. Nutritional effects on ingestion rate, growth and biochemical composition of *Hyas araneus* larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 145, 233-265.
- HOOD, M. A. y MEYERS, S. P. 1974. Microbial aspects of penaeid shrimp digestion. Gulf and Caribbean Fisheries Institute. Proceedings of the 27th Annual Session. Miami Beach, FL. USA. pp. 81-91.
- HUNT, M. J., WINSOR, H. y ALEXANDER C. G. 1992. Feeding by penaeid prawns: the role of the anterior mouthparts. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 160, 33-46.
- HUNTER, B., PRUDER, G. y WYBAN, J. 1987. Biochemical composition of pond biota, shrimp ingesta, and relative growth of *Penaeus vannamei* in earthen ponds. *Journal of the World Aquaculture Society*, Vol. 18, No. 3, 167-174.
- HUNTER, J. y FELLER R. F. 1987. Immunological dietary analysis of two penaeid shrimp species from South Carolina tidal creek. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 107, 61-70.
- HUSS, H. H. 1999. El Pescado Fresco: Su Calidad y Cambios de su Calidad. FAO. Ministerio de Pesca. Dinamarca. Documento Técnico de Pesca 348.
- JOHNSTON D. J. y YELLOWLEES D. 1998. Relationship between preferences and digestive enzyme complement of the slipper lobster *Thenus orientalis* (Decapoda: Scyllaridae) *Journal of Crustacean Biology* 18, 656-665.
- KUO, C. y LIN, W. 1996. Changes in morphological characteristics and ecdysteroids during the molting cycle of tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricus. *Zoological studies* 35(2), 118-127.
- LE MOULLAC, G., VAN WORMHOUDT, y AQUACOP, 1994. Adaptation of digestive enzyme to dietary protein, carbohydrate and fiber levels, and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae. En: *Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture, 1997 Vol 6* (ed. by D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. y Akiyama, D.M.). World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. USA. 587 pp.
- LE MOULLAC, G. 1995. Adaptation des enzymes digestives à l'alimentation chez la crevette *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). En: *Crustacean nutrition advances in world aquaculture, 1997 Vol 6* (ed. by D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. y Akiyama, D.M.). World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. USA. 587 pp.
- LE MOULLAC, G., KLEIN, B., SELLOS, D. y VAN WORMHOUDT, A. 1996. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and alpha-amylase to casein level and protein

source in *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 208, 107-125.

LEE, P. G., BLAKE, N. J. y FODRICK, G. E. 1980. A quantitative analysis of digestive enzymes for the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Proceedings of the World Mariculture Society 11, 392-402.

LEE, P. G., SMITH, L. L. y LAWRENCE, A. L. 1984. Digestive proteases of *Penaeus vannamei* Boone: relationship between enzyme activity, size and diet. Aquaculture 42, 225-239.

LEE, P. G., LAWRENCE, A. L. 1985. Effects of diet and size on growth, feed digestibility and digestive enzyme activities of the marine shrimp *Penaeus setiferus* (Linnaeus). Journal of the World Mariculture Society 16, 257-287.

LEHNINGER, A. L. 1986. Bioquímica. Ediciones Omega. Barcelona, España. 1117 pp.

LE MOS, D. y RODRÍGUEZ, A. 1998, Nutritional effects on body composition, energy content and trypsin activity of *Penaeus japonicus* during early postlarval development. Aquaculture 160, 103-116.

LE MOS, J., EZQUERRA, D. M. y GARCIA-CARREÑO, F. L. 2000. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. Aquaculture 186, 89-105.

LHOSTE, E. F., FISZLEWICS, M., GUEUGNEAU, A. M. y CORRING, T. 1994. Adaptation of exocrine pancreas to dietary proteins: Effect of the nature of protein and rat strain on enzyme induction and messenger mRNA levels. Journal of Nutrition and Biochemistry 5, 84-94.

LOVETT, D. L. y FELDER, D. L. 1989. Ontogeny of gut morphology of the white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Journal of Morphology 201, 253-272.

LOVETT, D. L., y FELDER, D. L. 1990. Ontogenic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) Biology Bulletin 178, 144-159.

MARTE, C. L. 1980. The food and feeding habit of *Penaeus monodon* Fabricius collected from Makato river, Aklan, Philippines (Decapoda, Natantia). Crustaceana 38 (3), 225-236.

Mac DONALD, N. L., STARK, J. R. y KEITH, M. 1989. Digestion and nutrition in the prawn *Penaeus monodon*. Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 20, 53A-60A.

Mc TIGUE, T. A. y ZIMMERMAN R. J. 1991. Carnivory vs. herbivory in juvenile *Penaeus setiferus* (Linnaeus) and *Penaeus aztecus* (Ives). En: García, T., Gaxiola, G., García, T., Pedroza, R., Soto, S., López, N y Rosas, C. 1998. Influencia de las proteínas dietéticas sobre el crecimiento, la sobrevivencia y el rendimiento de las postlarvas de camarón blanco (*Penaeus setiferus*) y del camarón rosado (*P. duorarum*) del golfo de México. Revista Aquatic No. 2 de la Universidad Autónoma de Zaragoza. España.

MOLINA, C. y PIÑA, P. E. 1999. Estudio comparativo de sistemas de alimentación utilizados en el engorde de *Litopenaeus vannamei*: comederos y voleo. Memorias del V Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. Guayaquil, Ecuador.

MOLINA, C., CADENA, E. y ORELLANA, F., 2000. Alimentación de camarones en relación a la actividad enzimática como una respuesta natural al ritmo circadiano y ciclo de muda. En: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo. R, (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Yucatán, Mexico.

MORIARTY, D. J. W. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. Aquaculture 151, 333-349.

MOSS, S. M., DIVAKARAN, S. y KIM, B. G. 2001. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquaculture Research 32, 125-131.

NUNES, A. J. P. 1995. Feeding dynamics of the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* Pérez-Farfante, 1967 (Crustacea, Penaeidae) under semi-intensive culture in NE Brazil. En: Gesteira, T. C. V. y Nunes, A. J. P. 1996. Proceedings of the I workshop of the state of Ceará on marine shrimp farming. Grupo de estudos de camarao marinho-GEEMAR, Fortaleza, Ceará, Brazil. 198 pp.

NUNES, A. J. P. 1996. Dinâmica alimentar de camaroes peneídeos sob condicoes semi-intensivas de cultivo. En: Gesteira, T. C. V. y Nunes, A. J. P. 1996. Proceedings of the I workshop of the state of Ceará on marine shrimp farming. Grupo de estudos de camarao marinho-GEEMAR, Fortaleza, Ceará, Brazil. 198 pp.

NUNES, A. J. P., GODDARD, S. y GESTEIRA, T. C. V., 1996. Feeding activity patterns of the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. Aquaculture 144, 371–386.

NUNES, A. J. P., GESTEIRA, T. C. V. y GODDARD, S. 1997. Food ingestion and assimilation by the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. *Aquaculture* 149, 121–136.

NUNES , A. J. P. y PARSONS, G. J. 2000a. Effects of the Southern brown shrimp, *Penaeus subtilis*, predation and artificial feeding on the population dynamics of benthic polychaetes in tropical pond enclosures. *Aquaculture* 183, 125–147.

NUNES , A. J. P. y PARSONS, G. J. 2000b. Size-related feeding and gastric evacuation measurements for the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis*. *Aquaculture* 187, 133-151.

OMONDI, J. G. y STARK, J. R. 1996. In vitro carbohydrate digestibility tests in the Indian white shrimp, *Penaeus indicus*. *Aquaculture* 139, 315-328.

OMONDI, J. G. y STARK, J. R. 2001. Studies on the digestive proteases from midgut glands of a shrimp, *Penaeus indicus*, and a lobster, *Nephrops norvegicus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* Vol. 90, 137-153.

PEREZ-FARFANTE, I. y KENSLEY, B. 1997. Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World: Keys and Diagnoses for the Families and Genera. *Memories du Museum National D'Histoire Naturelle, Paris, France*. 233 pp.

PHILLIPS, M. J., LIN, C. K. y BEVERIDGE, M. C. M. 1993. Shrimp culture and the environment: Lessons from the world's most rapidly expanding warmwater aquaculture sector. En: De Silva, S. S. (Ed) 1998. *Tropical Mariculture*. Academic Press. San Diego, CA, USA. pp 17-70.

PICOS-GARCIA, C., GARCIA-CARRENO, F. L. y SERVIERE-ZARAGOZA, E. 2000. Digestive proteases in juvenile Mexican green abalone, *Haliotis fulgens*. *Aquaculture* 181, 157-170.

PILLAY, T. V. R. 1997. *Acuicultura. Principios y Prácticas*. Editorial LIMUSA. México, D.F. 697 pp.

QASIM, S. V. y EASTERSON, D. C. V. 1974. Energy conversion in the shrimp *Metapenaeus monoceros* (Fabricius), fed on detritus. En: *Crustacean nutrition advances in world aquaculture, 1997 Vol 6* (ed. by D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. y Akiyama, D.M.). World aquaculture society, Baton Rouge, LA. USA. 587 pp.

REYMOND, H. y LAGARDÈRE, J. P. 1990. Feeding rhythms and food of *Penaeus japonicus* Bate (Crustacea, Penaeidae) in salt marsh ponds: role of halophilic entomofauna. *Aquaculture* 84, 125-143.

- RIBEIRO, F.A.L.T. y JONES D.A. 2000 Growth and ontogenetic change in activities of digestive enzymes in *Fenneropenaeus indicus* postlarvae. *Aquaculture Nutrition* 6, 53-64.
- RICK, W. y STEGBAUER, H. P. 1984. Alfa-amylase. In: Bergmeyer, H. U. (ed.) *Methods of enzymatic analysis*. Vol. 2, 2nd ed. Academic Press Inc., New York. pp 885-889.
- RIERA, P., MONTAGNA, P. A., KALKE, R. D. y RICHARD, P. 2000. Utilization of estuarine organic matter during growth and migration by juvenile brown shrimp *Penaeus aztecus* in a South Texas estuary. *Marine Ecology Progress Series*. Vol. 199, 205-216.
- RODRIGUEZ, D., VAN WORMHOUDT, A. y GAL, L.Y. 1976. Separation, properties, localization and nycthermal variations of a DNAase, a phosphodiesterase, a RNAase and an alkaline phosphatase from the hepatopancreas of *Palaemon serratus* (Crustacea Natantia). *Journal of comparative biochemistry and physiology*, Vol 54B, 181-191.
- RODRIGUEZ, A., LE-VAY, L. y MOURENTE, G.J., 1994. Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. *Marine Biology* 118, 45-51.
- ROSAS, C., SANCHEZ, A., DIAZ, E., SOTO, L. A., GAXIOLA, G., BRITO, R., BAEZ, M. y PEDROZA, M. 1995. Oxygen consumption and ammonia excretion of *Penaeus setiferus*, *P. schmitti*, *P. duorarum* and *P. notialis* postlarvae fed purified test diets: effect of protein level on substrate metabolism. *Aquatic Living Resources* 18, 161-169.
- ROSAS, C., CUZON, G., TABOADA, G., PASCUAL C., GAXIOLA, G. y VAN WORMHOUDT, A. 2001. Effect of dietary protein and energy levels on growth, oxygen consumption, haemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* (Boone) and *L. setiferus* (Linne) juveniles (Crustacea, Decapoda; Penaeidae) *Aquaculture Research* 32, 531-547.
- ROSENBERRY, R. 1996. *World Shrimp Farming 1996*. Shrimp News International 9. San Diego, CA, USA. 284 pp.
- ROSENBERRY, R. 1998. *World Shrimp Farming 1998*. Shrimp News International 11. San Diego, CA, USA. 328 pp.
- RUBRIGHT, J. S., HARELL, J. L., HOLOCOMB, H. W. y PARKER, G. 1981. Responses of planktonic and benthic communities to fertilizers and feed

applications in shrimp mariculture ponds. *Journal of the World Mariculture Society* 12, 281-299.

SCHWAMBORN, R. y CRIALES, M. M. 2000. Feeding strategy and daily ration of juvenile pink shrimp (*Farfantepenaeus duorarum*) in a South Florida seagrass bed. *Marine Biology* 137, 139-147.

SELLOS, D. y VAN WORMHOUDT, A. 1992. Molecular cloning of a cDNA that encodes a serine protease with chymotryptic and collagenolytic activities in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Federation of European Biochemical Societies Letters* 309, 219-224.

TALBOT, C. Y HOYLE, R. 1994. Fish diets and the control of eutrophication resulting from aquaculture. En: *FAO Fisheries Department Review of the State of World Aquaculture. Aquafeeds and feeding strategies. Circular c886.1.*

TSAI, I. H., LU, P.J. Y CHUANG, J. L. 1991 The midgut chymotrypsins of shrimp (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus penicillatus*). *Biochimica et Biophysica Acta* 1080(1), 59-67.

TSAI, I., CHUANG, K. y CHUANG, J.L. 1986. Chymotrypsins in digestive tracts of crustacean decapods (shrimp). *Journal of comparative biochemistry and physiology*, Vol 85B, No 1, 235-239.

TSENG, H. C., GRENDALL, J.H. y ROTHMEN, S.S. 1982. Food, duodenal extracts, and enzyme secretion by the pancreas. *American Journal of Physiology* 243, G304-G312.

URIBE, J. C. y POSADA, O. 1998. El uso de comederos en estanques acuícolas. *Revista Acuicultura del Ecuador* 28, 12-14.

VAN WORMHOUDT, A., CHEVALIER, P. y 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*. *Journal of Comparative Biochemistry and Physiology*, Vol 103B, 675-680.

VAN WORMHOUDT, A., Le MOULLAC, G., KLEIN, B. y SELLOS, D. 1996. Caracterización de las tripsinas y amilasas de *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Adaptación a la composición del régimen alimenticio. En: *Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del III Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. UANL. Monterrey, NL, México. 673 pp.*

VEGA-VILLASANTE, F., NOLASCO, H. y RIVERA, C. 1993. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*. I-Properties of

amylase activity in the digestive tract. *Journal of Comparative Biochemistry and Physiology* Vol. 106B, 547-550.

VERSAW, W., CUPPETT S. L., WINTERS, D. D. y WILLIAMS, L.E. 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *Journal of Food Science* Vol. 54 No. 5.

WASSENBERG, T. J. y HILL, B. J. 1987. Natural diet of the tiger shrimp *Penaeus esculentus* and *Penaeus semisculatus*. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 38, 169-182.