



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de posgrado

**DIGESTIÓN DE PROTEÍNA EN CAMARONES
PENEIDOS**

T E S I S

Que para obtener el grado en

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación en Acuicultura)

p r e s e n t a

Julio Humberto Córdova Murueta

La Paz, B. C. S. México, Febrero 2002.

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:30 horas del día 31 del Mes de Enero del 2002, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., para revisar la Tesis de Grado titulada:

"DIGESTIÓN DE PROTEINA EN CAMARONES PENEIDOS"

Presentada por el alumno:

JULIO HUMBERTO CORDOVA MURUETA

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

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

LA COMISION REVISORA


DR. FERNANDO LUIS GARCÍA CARREÑO
DIRECTOR DE TESIS


DRA. J. MARINA EZQUIERRA BRAUER
CO-TUTOR


DRA. M. PATRICIA HERNÁNDEZ CORTÉS
CO-TUTOR


DR. NORMAN HAARD
CO-TUTOR


DR. RAMON PACHECO AGUILAR
CO-TUTOR


DR. SERGIO HERNÁNDEZ VAZQUEZ
DIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO

RESUMEN

Se evaluó harina de calamar producida en laboratorio y secada a baja temperatura (LHSM) y otra producida comercialmente y secada a fuego directo (HHSM), como fuente de proteína para camarón, ya que este producto es reconocido como promotor de crecimiento para camarones. Se encontró que el producto comercial no mejoró el crecimiento de los camarones con respecto al grupo control. Sin embargo la harina de calamar de laboratorio produjo mayor crecimiento solo en bajas concentraciones (5% y 3%).

Se realizó otro estudio sobre los efectos en el sistema digestivo de los camarones de la harina de calamar y dos hidrolizados proteicos: pescado y krill (*Euphasia* sp), ya que se tienen antecedentes de que la proteína hidrolizada también puede tener efectos benéficos sobre la digestión.

A un alimento comercial para camarón se le incorporaron los ingredientes experimentales en tres series de tres alimentos cada una con reemplazos de 3, 9 y 15% de proteína de hidrolizado de pescado (F3, F9 y F15), hidrolizado de krill (K3, K9 y K15) y harina de calamar (SQ3, SQ9 y SQ15). Como alimento control se usó el mismo alimento comercial, pero molido y repeletizado (C32). El crecimiento y la digestibilidad in vivo e in vitro de la proteína fueron afectados por la cantidad de cada uno de los ingredientes incorporados en los alimentos. Los grupos alimentados con 3% de proteína de hidrolizado de pescado y los alimentados con 3 % de calamar, crecieron mas que con mayores proporciones de reemplazo de proteína. Los grupos alimentados con krill crecieron mejor (igual entre ellos) que el grupo control en todos los niveles de reemplazo. La actividad de quimotripsina mostró correlación con el peso final de los camarones. Se estudiaron algunas posibles relaciones entre la actividad enzimática en heces y la encontrada en hepatopáncreas. Se encontró correlación entre la actividad total y la de quimotripsina tanto en hepatopáncreas como en heces. Se concluye que los hidrolizados de proteína son una buena fuente alternativa de proteína que se puede usar como complemento en los alimentos para organismos acuáticos. Sin embargo hace falta más investigación referente al grado de hidrólisis adecuado para que sea apropiado como complemento alimenticio de camarones y sobre todo determinar los niveles convenientes para incluir en alimentos para camarón. Los resultados obtenidos con los camarones alimentados con calamar se relacionaron con la presencia de péptidos pequeños y probablemente aminoácidos libres presentes en el manto del calamar (que normalmente se encuentran allí o por auto hidrólisis del músculo) que provocan un efecto parecido al de hidrolizados proteicos con alto grado de hidrólisis.

Palabras clave: Digestión, proteína, camarón.

ABSTRACT

Some protein sources like squid and protein hydrolysates are identified as growth enhancers for shrimp, little is known about the biochemical basis of this phenomenon. Giant squid meal from two sources (commercial, HHSM and a laboratory made, LHSM), were evaluated as protein source for shrimp. It was found that the HHSM did not improve the growth of shrimps. LHSM performed better at low concentrations in feeds (5% and 3%). Other experiment was done to investigate squid meal (*Dosidicus gigas*) (SQ) and two commercial protein hydrolysates from fish (FH) and krill (*Euphasia* sp) (KH) were assayed in feeding trials with *Penaeus vannamei*. Feeds were prepared with the tested protein sources commensurating 3, 9, and 15% of the total crude protein. A total of 9 experimental feeds plus a repelleted commercial feed as control (C32). Shrimp weight gain, total and specific proteolytic activity for trypsin and chymotrypsin were affected by type and quantity of supplemented protein.

The in vivo and in vitro digestibility was also influenced by the source and quantity of the protein supplement. Shrimp fed FH at 3% protein supplementation grew more than with higher quantities. Groups fed SQ had similar results as those fed FH, and gained more weight when fed the lowest SQ quantity. It was found the presence of small peptides in SQ, which may explain the results similar to FH. The KH enhanced shrimp growth at all supplementation levels and Electrophoresis showed lower degree of hydrolysis for KH than for FH.

Correlation analysis was performed on enzymatic activities in feces and in hepatopancreas. It was found correlation on total activity vs. chymotrypsin activity in hepatopancreas and in feces.

We concluded that hydrolyzed protein is a good supplement for shrimp feeds but it must meet specific requirements for adequate shrimp assimilation. SQ also demonstrated good growth performance but better at low supplementation quantity, probably because of the presence of small peptides and possibly free amino acids naturally present in the squid mantle or from auto hydrolysis by endogenous enzymes.

DEDICATORIA

A Martha...

Janine

Julio

A mi madre y hermanos

... quienes siempre están en mi mente y en mi corazón

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACyT por la beca otorgada para sacar adelante esta investigación, así como al CIBNOR por todo el apoyo brindado para la ejecución de esta tesis.

Muy especialmente le doy las gracias a María de los Ángeles Navarrete (Ann), por su gran paciencia y disposición para guiarme en el desarrollo de las técnicas bioquímicas, y sobre todo por su amistad.

A la Técnico Cynthia Aldana por la ayuda otorgada durante los experimentos con camarones vivos efectuados en el área de bioquímica del laboratorio de reproducción de especies marinas.

También quiero darle las gracias al Dr. Fernando García Carreño por su dirección en el desarrollo de esta tesis y por darme todo su apoyo y confianza para la realización de la misma.

A los doctores Norman F. Haard, Ramón Pacheco, Marina Ezquerro, Patricia Hernández y Michael Morrissey, por todas sus observaciones y comentarios que contribuyeron para el mejoramiento de esta tesis.

A todos aquellos que estuvieron a mi lado brindándome su apoyo y amistad durante el desempeño de mi trabajo, tanto en momentos de éxito como en momentos de frustración y que no los nombro por temor a olvidar mencionar a alguno.

PREFACIO

La presente investigación se basa en el trabajo desarrollado para los siguientes artículos científicos:

Córdova-Murueta, J., H.; García-Carreño F., L., 2001. The effect on growth and protein digestibility of shrimp *Penaeus stylirostris* fed with feeds supplemented with squid (*Dosidicus gigas*) meal dried by two different processes. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 10:2, 35-47 p.

Córdova-Murueta, J., H., García-Carreño F., L., 2002. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture* (En prensa).

CONTENIDO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS.....	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
PREFACIO	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS.....	ix
ABREVIATURAS	x
INTRODUCCIÓN	1
Hidrólisis de proteína	1
Hidrolizados proteicos como suplementos alimenticios	2
Fuentes de proteína para alimentos balanceados	3
RESULTADOS Y DISCUSION	8
CAPÍTULO I	8
Experimento 1	8
Experimento 2	9
CAPITULO II.....	11
Experimento de crecimiento.....	11
Digestibilidad aparente	12
Actividad proteolítica	13
SDS-PAGE.....	15
Digestibilidad in vitro	21
CAPÍTULO III	22
Actividad proteolítica en heces de camarón.....	23
Materiales y métodos.....	23
Resultados y discusión.....	24
Actividad proteolítica	24
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES.....	29
LITERATURA CITADA.....	31
ANEXOS.....	34

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 SDS-PAGE de extractos de hepatopáncreas de los diferentes grupos experimentales.....	15
Fig. 2. Zimogramas de extractos de hepatopáncreas de camarones de los grupos C32 y los alimentados con hidrolizados de pescado.....	16
Fig. 3. Zimogramas de extractos de hepatopáncreas de camarones de los grupos C32 y los alimentados con hidrolizado de krill.	16
Fig. 4. Zimogramas de extractos de hepatopáncreas de camarones de los grupos C32 y los alimentados con hidrolizados de pescado.....	17
Fig. 5. Zimogramas de extracto de hidrolizado de krill incubado de 0 a 6 horas a 50 °C.....	18
Fig. 6. Electroforesis en geles poliacrilamida al 12 % con extractos de hidrolizados y calamar. Carril 1, marcadores de masa molecular; carril 2, SDS-PAGE de hidrolizado de krill; carril 3 y 4 SDS- PAGE de hidrolizado de pescado y de harina de calamar respectivamente.	19

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Pesos de hepatopáncreas (HP) Actividades de tripsina, quimotripsina y total expresada en g/HP y por HP.....	14
Tabla II. Actividad proteolítica total y específica en heces de camarón.....	25

ABREVIATURAS

BAPNA	Benzoil-Arg-<i>p</i>-nitroanilida
SAPNA	Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-<i>p</i>-nitroanilida
TLCK	Cetona de Nα-<i>p</i>-tosil clorometilo
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
EDTA	Acido etileno-diamino-tetracético
DMSO	Dimetil sufoxido

INTRODUCCIÓN

Las proteínas son grandes moléculas compuestas de C, H, S y N. Las unidades básicas, los aminoácidos, son polimerizados por enlaces peptídicos para formar proteínas. Las enzimas digestivas fraccionan la proteína dietética para liberar los aminoácidos que pueden ser utilizados para formar nuevas proteínas para crecimiento y mantenimiento de los tejidos. Una de las principales características que afectan la calidad de las proteínas es el contenido de aminoácidos esenciales. Los aminoácidos esenciales no son sintetizados por el organismo y deberán ser ingeridos para satisfacer sus requerimientos nutricionales.

La digestibilidad o biodisponibilidad de la proteína está relacionada con sus cualidades nutritivas. Numerosos factores afectan su calidad biológica en los ingredientes proteicos durante la elaboración de alimentos balanceados y pueden sufrir cambios en su estructura primaria. Se ha reportado pérdida de cisteína, lisina, arginina, treonina y serina en diferentes fuentes de proteína como consecuencia del tratamiento térmico (Papadopulos, 1989).

La disponibilidad de aminoácidos en materia de nutrición de camarón es un tema que debe ser estudiado a detalle, ya que con este conocimiento se puede mejorar la producción de alimentos balanceados. Para que la proteína pueda ser asimilada es necesario que sea hidrolizada por las enzimas digestivas para ser incorporada a los tejidos. El calor excesivo puede alterar la estructura de la proteína impidiendo el funcionamiento de las enzimas digestivas, debido a que no reconocen el sitio específico para romper las cadenas de proteína y liberar los aminoácidos necesarios para producción de nuevas proteínas.

Hidrólisis de proteína

Como ya se mencionó anteriormente, las enzimas proteolíticas hidrolizan o rompen las cadenas de aminoácidos en sitios específicos dependiendo de la especificidad de la enzima.

Antes de que la hidrólisis ocurra, la molécula de la enzima se une a la proteína y rompe el enlace peptídico para liberar péptidos más pequeños y aminoácidos libres.

Las enzimas proteolíticas pueden ser divididas en dos grupos principales: las exo y las endo peptidasas. Exo se refiere a aquellas enzimas que reconocen y cortan aminoácidos en la parte terminal de la cadena, ya sea en el grupo carboxilo o en el grupo amino terminal, mientras que las endo peptidasas hidrolizan enlaces peptídicos dentro de la molécula de proteína. Las enzimas cortan en sitios con aminoácidos específicos, por lo que cualquier cambio en su estructura primaria inhabilita a las enzimas para hacer su trabajo.

La proteína pre-hidrolizada tiene muchas aplicaciones en la industria de alimentos, como una técnica para cambiar el sabor o la consistencia de los alimentos por las propiedades especiales conferidas principalmente por su grado de hidrólisis. También se usa para sacarle provecho a productos que normalmente se subutilizan, tal es el caso de del surimi, un producto hecho a base de proteína de pescado proveniente de especies poco utilizadas para consumo humano directo.

Los hidrolizados de proteína se clasifican de acuerdo a su grado de hidrólisis como bajo, moderado y extensivo, dependiendo del peso molecular de los péptidos del producto resultante. Un producto con hidrólisis extensiva normalmente contiene péptidos < 5000 Da y casi el 90% de ellos < 500 Da. Los hidrolizados usados como suplementos proteicos normalmente presentan menor grado de hidrólisis, ya que de lo contrario producen sabor amargo debido a la acumulación de péptidos de bajo peso molecular que contienen aminoácidos hidrofóbicos (Panyam y Kilara, 1996).

Hidrolizados proteicos como suplementos alimenticios

Se ha visto que la modificación enzimática de las proteínas puede mejorar substancialmente sus propiedades funcionales (Panyam y Kilara, 1996). En este sentido, en algunos países se han realizado esfuerzos para desarrollar productos proteicos tales como los hidrolizados de

pescado a partir de desechos de la industria procesadora de productos de la pesca. El proceso de hidrólisis se lleva a cabo mediante la modificación de las proteínas con la adición de enzimas que al predigerir el material proteico aumenta su valor nutricional. El resultado es un producto de alta calidad que se puede incorporar en los alimentos para acuicultura y al mismo tiempo se contribuye a resolver el problema de los desperdicios de esta industria (Hardy, 1991), que ocasionan contaminación en áreas adyacentes a las plantas procesadoras. Este tipo de productos pueden llegar a constituir una fuente de proteína de excelente calidad en los alimentos balanceados, sin embargo habrá que determinar las características que deban de cumplir para satisfacer los requisitos necesarios para el sistema digestivo de los organismos a alimentar.

En años recientes hay pocas investigaciones sobre el uso y efectos de proteína hidrolizada en alimentos para organismos acuáticos. Investigaciones previas han demostrado que los hidrolizados de proteína son un buen suplemento en alimentos balanceados para organismos acuáticos (Berge y Trond, 1996; Zambonino et al., 1997; Day et al., 1997; Cahu et al. 1999). También se ha visto que los hidrolizados de proteína de pescado pueden mejorar el crecimiento de camarones a bajas concentraciones en alimentos para camarón (Anggawati et al. 1990), por lo que son una buena alternativa como fuentes de proteína o suplementos alimenticios en alimentos balanceados para acuicultura. Así como los hidrolizados proteicos hay otros ingredientes que actualmente se han estado incorporando a la alimentación de animales y que requieren estudios sobre su valor biológico para los animales a los que se destinan.

Fuentes de proteína para alimentos balanceados

Se han probado diversas fuentes de proteína tanto animal como vegetal con la finalidad de abaratar el costo de los alimentos balanceados, sin tomar en cuenta su valor nutritivo. En nuestro país, el principal criterio usado para determinar el precio y la calidad nutricional de los alimentos para camaronicultura, es el porcentaje de proteína que contiene.

Generalmente se piensa que a mayor contenido proteico, la calidad del alimento es mayor

(Escutia, 1996). Sin embargo, la eficacia de este nutrimento no siempre es la esperada debido a la mala calidad de los ingredientes que se utilizan como fuentes de proteína. En la industria de alimentos balanceados para acuicultura, la calidad de los ingredientes es la principal limitante en la producción de alimentos de buena calidad (Akiyama, 1991). La complementación de los alimentos para acuicultura con ingredientes que garanticen mejoras substanciales en el crecimiento y el aprovechamiento de las proteínas es uno de los campos prioritarios que hay que fortalecer.

Uno de estos ingredientes que ha dado buenos resultados en alimentos para camarón, es el calamar, ya que se ha encontrado que mejora la tasa de crecimiento en los camarones peneidos, por ejemplo, Fenucci et al., 1980, encontraron que la presencia de 5 a 6 % de harina de calamar en el alimento mejora sustancialmente el crecimiento de *Penaeus aztecus* y *P. setiferus*. Otros autores han reportado resultados similares para diversas especies de camarón (Kanazawa 1990, Cruz-Ricque et al. 1989, Cruz-S. et al. 1987). Por lo tanto sería factible incorporar cierto porcentaje de harina de calamar en los alimentos suministrados para mejorar las tasas de crecimiento. Sin embargo debido a que el procedimiento de alto calor que se utiliza (secado a fuego directo) para elaborar la harina (incluso con otros ingredientes de origen animal: pescado, camarón, etc.) es muy probable que gran parte de las propiedades nutritivas de este ingrediente se pierdan. Adicionalmente durante la elaboración de los alimentos es común que haya calentamiento excesivo de las mezclas y en consecuencia perdida de algunas propiedades nutritivas.

También es importante conocer las respuestas del sistema digestivo de los camarones cuando son alimentados con proteína de diferentes fuentes y procesos, ya que la forma en que actúan en el sistema digestivo, ingredientes como el calamar y los hidrolizados que mejoran el crecimiento, no ha sido investigado. Es común que tales ingredientes estén incluidos en alimentos comerciales mexicanos, sin embargo este tipo de fuentes de proteína frecuentemente son procesadas sin cuidado y se incluyen en los alimentos sin considerar las cantidades mas adecuadas a incluir en las formulaciones. Generalmente los límites para incluir algún ingrediente en alimentos son económicos o de disponibilidad.

Los fabricantes de alimentos balanceados en México han incorporado diversos ingredientes proteicos a sus formulaciones para lograr balancear el perfil de aminoácidos requerido por los organismos, sin embargo tienen mayor interés por ingredientes que mejoren el crecimiento y la palatabilidad.

La evaluación de ingredientes usados en alimentos para camarón se ha enfocado principalmente en cualidades tales como altas tasas de crecimiento, disponibilidad y bajo costo, sin embargo los mecanismos de asimilación de los organismos no siempre son atendidos. El conocimiento del efecto de procesos previos sobre la calidad de las fuentes de proteína destinadas a alimentos para camarón es de alta importancia. El estudio de la fisiología del sistema digestivo de los organismos que se pretende alimentar, es la base para lograr conocer sus requerimientos nutritivos.

Diferencias entre investigaciones previas sobre el nivel de proteína adecuado para camarón pueden estar relacionadas con la calidad de la proteína y los procesos a los que ha sido sometida. Por ejemplo, se han recomendado niveles de proteína entre 30% y más de 40% como satisfactorios para alimentos balanceados para camarones peneidos (Andrews y Sick 1972; Balaz 1973; New 1976; Neal 1980; Piedad-Pascual 1990). La calidad de los alimentos balanceados depende de su composición química y valor nutritivo para los organismos, y la proteína es uno de los constituyentes más importantes de los alimentos.

El proceso más común de los ingredientes proteicos destinados a alimentos balanceados es el secado a base de calor, que con frecuencia es excesivo. Se ha demostrado que el calor extremo puede disminuir las propiedades nutritivas de la proteína, como en el caso de la harina de calamar, que es considerada como una excelente fuente de proteína para camarones (Córdova-Murueta y García-Careño, 2001). El grupo IFREMER de Francia estudió el calamar en alimentos para camarón (Cruz y Guillaume, 1983), encontraron en el calamar un factor de crecimiento no definido para decápodos. La calidad de los alimentos depende de su composición química, valor nutritivo, calidad de los ingredientes y tecnología de proceso. Sin embargo, poco se ha documentado acerca de estándares de calidad de los ingredientes utilizados en los alimentos para camarón. En la industria de

alimentos balanceados para acuicultura la calidad de los ingredientes es la principal limitante en la producción de alimentos de buena calidad (Akiyama, 1991).

En nuestro país, el calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es un producto que recientemente se ha empezado a adicionar a los alimentos comerciales. Es un abundante recurso en el Golfo de California. En 1996 los sitios de descarga mas importantes, Santa Rosalía, Baja California Sur y Guaymas, Sonora reportaron capturas de 140, 000 toneladas (Morales-Bojorquez, et al. 2001). Una fracción importante de este producto es procesada para convertirla en harina de calamar, la cual se produce con las mismas técnicas que la harina de pescado: secado a fuego directo.

No se han realizado estudios sobre propiedades nutricias de este producto en camarón, sin embargo ya se comercializa para su inclusión en alimentos balanceados. Se desconoce si el calamar mexicano posee dicho factor, pero se prevé que debido al tratamiento que se le da para producir harina, esta propiedad se pierda o se minimice (Córdova-Murueta y García-Careño, 2001).

Es importante señalar que casi la totalidad de estudios previos sobre las cualidades nutritivas del calamar en organismos acuáticos, se han llevado a cabo utilizando especies diferentes al calamar gigante (*Dosidicus gigas*), por lo que su efecto en alimentos balanceados para organismos acuáticos deberá ser ampliamente estudiado y confirmar si su valor nutritivo es similar o diferente al de las demás especies.

De acuerdo a los diversos estudios que se encuentran en la literatura referentes a nutrición y digestión de crustáceos, los camarones peneidos tienen necesidades nutricionales específicas, y es de esperarse que su sistema digestivo esté adaptado a esas necesidades específicas, por lo que es de suma importancia que las sustancias nutritivas, como la proteína tengan las propiedades adecuadas para su correcto funcionamiento. En el caso de ingredientes proteicos con procesos previos de industrialización es necesario tomar en cuenta los posibles efectos negativos sobre la proteína, los cuales pueden repercutir en su valor biológico para los organismos.

En esta tesis se investigan los efectos sobre el sistema digestivo de camarón de tres fuentes de proteína: calamar gigante (*Dosidicus gigas*), hidrolizados de krill (*Euphasia* sp.) y de pescado.

Dado que el calamar es un ingrediente ampliamente reconocido como promotor del crecimiento en camarones, este se ha venido utilizando en alimentos comerciales, sin embargo en México, la producción de harina de calamar destinada a alimentos balanceados, no se hace con los cuidados requeridos para evitar disminuir la calidad del producto, por lo que el primer capítulo se investiga si la harina de calamar producida comercialmente cumple con las expectativas de mejorar el crecimiento del camarón para luego continuar con el objetivo principal que es estudiar el efecto sobre el sistema digestivo de ingredientes que promueven crecimiento acelerado en camarones.

En el primer capítulo la hipótesis a probar es que la harina de calamar producida comercialmente puede ser usada en alimentos para camarón como un ingrediente que promueve el crecimiento acelerado.

En el segundo capítulo se estudian los efectos sobre la digestión de camarón cuando se alimenta con proteína hidrolizada y harina de calamar gigante (*D. gigas*) producida en laboratorio. El objetivo es contribuir al conocimiento de los mecanismos digestivos del camarón, evaluando algunas respuestas reflejadas en la producción de enzimas digestivas y el crecimiento cuando se alimentan con ingredientes que favorecen el crecimiento acelerado. La hipótesis a probar en este capítulo es que reemplazando una fracción de proteína del alimento balanceado con cualquiera de los ingredientes antes mencionados, se puede mejorar significativamente el crecimiento y la digestión de los camarones.

El capítulo 3 tiene el objetivo de evaluar la actividad proteolítica en las heces de los camarones alimentados con alimentos adicionados de proteína hidrolizada y calamar gigante. Se estima que con este método se puede reforzar la información obtenida en la evaluación de enzimas digestivas en el hepatopáncreas de los camarones.

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPÍTULO I

La metodología y resultados de los experimentos realizados en este capítulo se detallan ampliamente en el artículo: The effect on growth and protein digestibility of shrimp *Penaeus stylirostris* fed with feeds supplemented with squid (*Dosidicus gigas*) meal dried by two different proceses.

Éste se encuentra en la sección de anexos al final de esta tesis y en el cual esta basada esta parte del trabajo.

Experimento 1

Se llevaron a cabo experimentos de crecimiento con juveniles de camarón azul *Penaeus stylirostris* para evaluar las cualidades de la harina de calamar producida comercialmente incluida en los alimentos balanceados para camarón. En el primero de dos experimentos, se prepararon 4 alimentos con 40% de proteína que contenían 0, 5, 15 y 25% de harina de calamar. No se observó mejora en el crecimiento respecto al grupo control (C0) con los alimentos que contenían calamar ($P > 0.05$). También se observó una gran variación en los pesos finales de los diferentes grupos de camarones, por lo que se pensó que los resultados no eran confiables. Esta variación se atribuyó principalmente al hecho de que los organismos eran de origen silvestre y por lo tanto su crecimiento no fue homogéneo. Se diseñó un segundo experimento pero ahora con camarones de laboratorio de un mismo desove, de la especie (*Penaeus stylirostris*), para minimizar variaciones entre organismos.

Experimento 2

Dado que en el primer experimento no se obtuvo la respuesta esperada en el crecimiento de los camarones alimentados con calamar producido en una planta comercial, se diseñó el experimento utilizando el mismo producto comercial de calamar, pero ahora se incluyó en el experimento otra harina de calamar fresco producida en el laboratorio y secada a baja temperatura (50°C), para poder comparar y comprobar si los resultados anteriores se debían en parte a que la harina de calamar utilizada no era de la calidad adecuada para la alimentación de camarones.

Para diferenciar los dos productos de calamar usados en este ensayo, la harina producida a baja temperatura y condiciones apropiadas de higiene en el laboratorio se nombró LHSM y a la harina de la planta comercial secada a alta temperatura y en pésimas condiciones de higiene se nombró HHSM.

Se hicieron cinco grupos experimentales de camarones, dos se alimentaron con alimentos que contenían 5 y 15% respectivamente de harina de calamar HHSM y otros dos con 5 y 15% respectivamente con harina de calamar LHSM, mas un grupo control alimentado con un alimento sin calamar. Los alimentos se nombraron 5C, 15C, 5L, 15L y C0 respectivamente. Adicionalmente se evaluó la digestibilidad in vivo de los alimentos, para lo cual se prepararon alimentos con las mismas formulaciones que los mencionados anteriormente, pero adicionados con 1% Cr_2O_3 como indicador inerte para la evaluación de la digestibilidad de la proteína.

El análisis de varianza de una vía (ANDEVA) mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) en los pesos promedio finales de los diferentes grupos de camarones. El grupo 5L alcanzó el peso promedio mas alto, mientras que el grupo control (C0) obtuvo el menor peso final. Esto sugiere que la LHSM favorece el crecimiento solo cuando es suministrada en bajas concentraciones en el alimento. Adicionalmente también se encontró que la mayor digestibilidad aparente de proteína fue obtenida por el grupo 5L ($P < 0.01$).

Para obtener una mejor explicación de los resultados se hizo un análisis de varianza de dos vías donde se probó el efecto de la fuente de harina de calamar y la cantidad adicionada a los alimentos. Se demostró que el tipo de harina de calamar (HHSM y LHSM) afectaron el crecimiento, sobrevivencia y digestión de los camarones (Tabla 6 del primer artículo, $P < 0.05$). El crecimiento y sobrevivencia de los camarones fueron afectados negativamente con 15% de harina de calamar sin importar la fuente. También se observó una interacción que afectó el crecimiento de los camarones entre el tipo de harina de calamar y la cantidad presente en los alimentos, lo que sugiere que el crecimiento de los camarones dependió de la calidad y la cantidad de las harinas de calamar usadas en este experimento. En este caso el crecimiento fue favorecido con la LHSM a bajas concentraciones en el alimento.

Se han reportado factores de crecimiento para otras especies de calamar (Cruz-R. et al., 1987; 1989; Cruz-S. et al., 1992), pero para el calamar gigante no hay reportes. Sin embargo en el primer experimento, el crecimiento de los camarones fue independiente de la concentración de HHSM en los alimentos, sin embargo estos resultados no se consideraron concluyentes debido a la gran variación observada en el crecimiento de todos los grupos experimentales. En el segundo experimento los alimentos adicionados de HHSM promovieron menos crecimiento que los adicionados de 5% de LHSM ($P > 0.05$). Estos resultados indican que el proceso térmico y en general la mala calidad de la harina de calamar comercial afectaron la calidad nutritiva de la proteína. Por lo tanto para el objetivo de esta tesis que es investigar los efectos sobre la digestión de los camarones de ingredientes que promueven un crecimiento acelerado, la harina de calamar de origen comercial no se consideró apropiada, ya que no se obtuvo la respuesta esperada. Por ello la siguiente parte se desarrolla utilizando solo la harina de calamar producida en el laboratorio a baja temperatura.

Por otra parte, el grupo alimentado con 15% LHSM creció menos que los camarones del grupo alimentado con 5% LHSM. Por lo tanto ahora hay una nueva pregunta: ¿Por qué 5% de calamar produjo mayor crecimiento que 15%?

Hasta este punto puede establecerse que la harina de calamar preparada en laboratorio (LHSM) puede mejorar significativamente el crecimiento de los camarones cuando es agregada a los alimentos. La razón de que este fenómeno se presente solo a baja concentración en el alimento se estudia en el siguiente capítulo.

CAPITULO II

Efecto de proteína hidrolizada y proteína de calamar sobre la digestión de *Penaeus vannamei*.

Los objetivos de este capítulo son estudiar el efecto sobre el sistema digestivo de camarón de ingredientes proteicos que promueven crecimiento acelerado: calamar y proteína hidrolizada. Así como también dar una explicación sobre porque a menores concentraciones de estos ingredientes en los alimentos se obtienen mayores tasas de crecimiento.

La metodología y resultados de los experimentos realizados en este capítulo se detallan ampliamente en el artículo: “*Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed*” El cual se encuentra en la sección de anexos

Tomando en cuenta los resultados anteriores se optó por utilizar para los objetivos de este capítulo, la harina de calamar elaborada en laboratorio (LHSM).

Experimento de crecimiento

Se prepararon 9 alimentos experimentales mas un control. Como base para la preparación de los alimentos se usó un alimento comercial para camarón de 35% de proteína, al cual se le incorporaron los ingredientes experimentales en tres series de tres alimentos cada una con reemplazo de 3, 9 y 15% de proteína del alimento comercial por proteína de hidrolizado de pescado (F3, F9 y F15), hidrolizado de krill (K3, K9 y K15) y harina de

calamar (SQ3, SQ9 y SQ15). Como alimento control se usó el mismo alimento comercial, pero molido y repeletizado, el cual se nombró C32.

Los grupos de camarones F3 y F9 crecieron mejor que el grupo control C32 ($P < 0.05$), sin embargo el grupo F15 no presentó diferencias significativas con respecto al control. Lo que coincide con investigaciones previas realizadas con larvas de peces (Zambonino et al., 1997; Day et al., 1997; Cahu et al. 1999), donde los grupos alimentados con menores cantidades de proteína hidrolizada tuvieron un mejor desempeño.

Sin embargo este fenómeno no se presentó en los grupos alimentados con hidrolizado de krill. El crecimiento entre estos tres grupos no fue diferente estadísticamente, pero si fue mayor que el grupo control.

Con respecto a los grupos alimentados con proteína de calamar, se presentó una disminución en el peso final en los grupos alimentados con mayores proporciones SQ. El grupo alimentado con 3% de proteína de calamar fue el mas alto ($P < 0.05$). El grupo SQ15 no presentó diferencias en peso final con respecto al grupo control C32.

Hasta aquí se confirman los resultados encontrados en el segundo experimento del capítulo anterior: mayor crecimiento de los camarones a bajo contenido de harina de calamar en el alimento.

Digestibilidad aparente

Se evaluó el coeficiente de digestibilidad aparente (ADC) de la proteína de los alimentos con 1% Cr_2O_3 en alimentos de igual formulación que los utilizados para el experimento de crecimiento. Los camarones del grupo control (C32) tuvieron el valor mas bajo ($< 70\%$), seguido por el grupo SQ15. El grupo K15 mostró el mayor valor de ADC (91.8%). En general todos los grupos mostraron mayor ADC que el grupo control ($P < 0.001$), lo que hace pensar que la proteína adicionada a los alimentos contribuyó a mejorar la digestibilidad de los mismos.

Actividad proteolítica

Tomando en cuenta que el hepatopáncreas es el órgano principal del sistema digestivo de los camarones y que es en el donde se secretan las enzimas digestivas cuya función es fraccionar la proteína contenida en los alimentos para convertirla en pequeños péptidos y aminoácidos libres que pasarán a formar nueva proteína que constituirá nuevos tejidos. Se extrajeron los hepatopáncreas de 90 camarones 24 horas después de haber finalizado el experimento de alimentación. Se prepararon extractos enzimáticos de hepatopáncreas individuales para posteriormente evaluarles la actividad proteolítica total (con azocaseína como sustrato) y específica para tripsina (sustrato, BAPNA) y quimotripsina (sustrato, SAPNA) utilizando la metodología de García-Carreño y Haard (1993).

La actividad proteolítica total mostró diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$). Los menores valores de actividad total por hepatopáncreas se encontraron en los grupos F15, K15, SQ9 y SQ15. No hubo diferencia entre el grupo control y el resto de los grupos (Tabla 4, segundo artículo). Estos resultados sugieren que mayores concentraciones de proteína previamente hidrolizada representa menos trabajo para las enzimas proteolíticas, por lo que es probable que se produzca menor cantidad de enzimas en el hepatopáncreas de los camarones, sin embargo esto no explica porque ocurre también en los grupos alimentados con calamar.

Con respecto a la actividad de tripsina también se encontraron diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$). El grupo F9 presentó la menor actividad de todos los grupos y el grupo SQ15 la menor, el resto de los grupos no presentaron diferencias significativas respecto al control. Para la actividad de quimotripsina también se encontraron diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$), mostrando un patrón similar al de los pesos finales, por lo que hizo un análisis de regresión entre los pesos finales de los camarones y la actividad de quimotripsina por hepatopáncreas, mostrando una correlación significativa entre las variables ($P < 0.05$) a un nivel de confianza del 95%. Se utilizaron logaritmos naturales (Ln) de los valores de peso y actividad para linealizar la relación entre las dos

variables. La ecuación resultante fue: $Ln(Y) = -382747 + 320482 * Ln(X)$, donde Y es la actividad de quimotripsina por hepatopáncreas y X es el peso final de los camarones. El coeficiente de correlación fue de 0.75 y $R^2 = 56.36$. Estos resultados sugieren una relación directa entre la actividad de la quimotripsina y el crecimiento de los camarones.

En la Tabla I se muestran los pesos promedio de los hepatopáncreas (HP) de cada grupo experimental así como las actividades total y específicas para tripsina y quimotripsina expresadas en unidades por HP y por gramo de HP. Se observa que los pesos promedio menores de HP estuvieron en los grupos F15, K9, K15, y los 3 grupos alimentados con calamar (SQ) sin diferencias significativas entre ellos. ($P < 0.05$), también se pueden agrupar entre los de HP de mayor peso sin diferencias significativas entre ellos a los grupos C32, F3, F9, K3, K9, K15 y SQ3. Por lo que no se aprecia que la actividad enzimática esté directamente relacionada al tamaño del HP.

Tabla I. Pesos de hepatopáncreas (HP) Actividades de tripsina, quimotripsina y total expresada en g/HP y por HP

* Grupo	Peso de HP (g)	Ⓜ Actividad total (g/HP)	° Actividad de tripsina (g/HP)	° Actividad de quimotripsina (g/HP)	Ⓜ Actividad total/HP	° Actividad de tripsina/HP	° Actividad de quimotripsina/HP
C32	0.32 ^{cd}	46.4 ^c	16.5 ^{cd}	70.6 ^{ab}	14.5 ^c	5.4 ^{bc}	23.9 ^{cde}
F3	0.32 ^{cd}	45.1 ^{bc}	18.9 ^{cd}	70.2 ^{ab}	14.4 ^c	5.8 ^{cd}	20.7 ^{bed}
F9	0.33 ^{cd}	42.4 ^{bc}	20.6 ^d	66.9 ^{ab}	14.5 ^c	7.1 ^e	22.5 ^{cd}
F15	0.26 ^a	45.1 ^{bc}	16.5 ^{cd}	63.6 ^b	11.4 ^b	4.2 ^b	16.2 ^b
K3	0.35 ^d	45.2 ^{bc}	14.9 ^c	70.7 ^{ab}	15.9 ^c	5.2 ^{bc}	24.5 ^{de}
K9	0.30 ^{abc}	47.4 ^c	15.5 ^c	87.1 ^c	15.2 ^c	5.0 ^{bc}	28.4 ^e
K15	0.30 ^{bc}	36.4 ^{ab}	14.6 ^{ab}	66.0 ^{ab}	10.8 ^{ab}	4.9 ^{bc}	24.1 ^{cde}
SQ3	0.30 ^{abc}	49.9 ^c	16.1 ^{cd}	74.3 ^{ab}	15.4 ^c	4.9 ^{bc}	22.7 ^{cd}
SQ9	0.27 ^{ab}	40.7 ^{abc}	17.0 ^{cd}	77.4 ^{ab}	10.6 ^{ab}	4.9 ^{bc}	20.1 ^{bc}
SQ15	0.27 ^{ab}	31.9 ^a	10.3 ^a	39.9 ^a	8.4 ^a	2.2 ^a	11.2 ^a

* C32 = Grupo control; K3 = 3% hidrolizado de krill; K9 = 9% hidrolizado de krill; K15 = 15% hidrolizado de krill; F3 = 3% hidrolizado de pescado; F9 = 9% hidrolizado de pescado; F15 = 15% hidrolizado de pescado; SQ3 = 3% calamar; SQ9 = 9% calamar; SQ15 = 15% calamar;

Letras diferentes en la misma fila representan diferencias significativas ($P < 0.05$)

° Una unidad de actividad = $\text{abs}_{366} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ proteína

Ⓜ Una unidad de actividad para sustrato sintético = Cantidad de enzima necesaria para hidrolizar μmol de sustrato en 1 minuto.

SDS-PAGE

Se separaron las fracciones proteicas de los extractos enzimáticos por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) y las fracciones de actividad de endopeptidasas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% con sustrato (S-SDSPAGE) de acuerdo a García-Carreño et al. (1993) Se inyectaron 20 µg de proteína en cada carril. La actividad también se analizó usando inhibidores para tripsina y quimotripsina en S-SDS-PAGE: TLCK, PMSF y EDTA. Las muestras se incubaron con el de inhibidor una hora antes de ponerlos en los geles de electroforesis, en estos geles se aplicó volumen de enzima equivalente a 15 mU de actividad.

El patrón de bandas de la proteína presente en los extractos enzimáticos fue similar para todos los grupos con variaciones en intensidad de algunas bandas (Fig. 1).

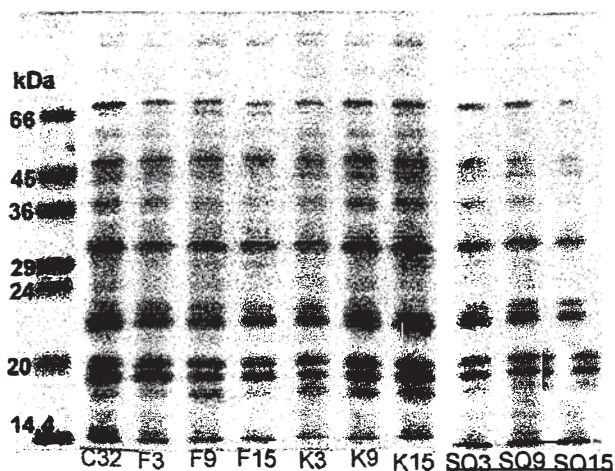


Fig. 1 SDS-PAGE de extractos de hepatopáncreas de los diferentes grupos experimentales. El primer carril muestra los marcadores de pesos moleculares. Los demás nombres de cada carril son como están explicados en la Tabla I.

Los zimogramas (S-SDS-PAGE) mostraron variación en el patrón de bandas, principalmente en el área alrededor de los 23-33 kDa (figuras 2-4, áreas marcadas con óvalos). Pareciera que las bandas presentes en esta área disminuyen con la adición de cada uno de los tres ingredientes a prueba. Esta misma área no fue afectada por los inhibidores empleados. Los grupos alimentados con hidrolizado de pescado mostraron bandas brillantes

correspondientes a proteasas > 66 kDa, no presentes en extractos de otros grupos (Fig. 2).

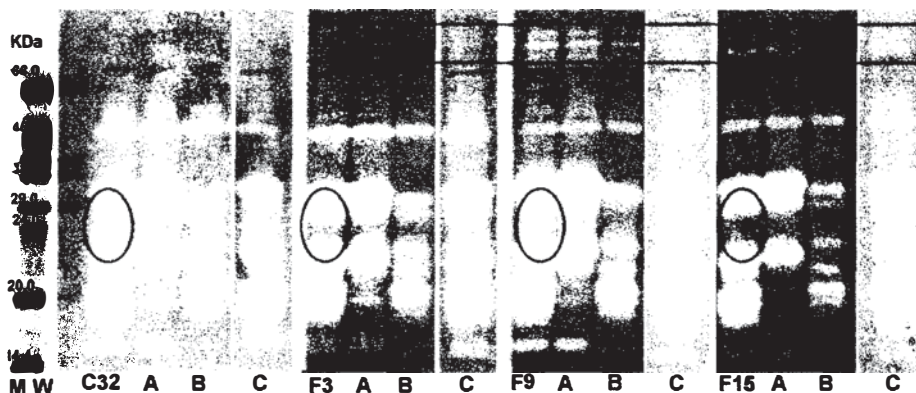


Fig. 2. Zimogramas de extractos de hepatopáncreas de camarones de los grupos C32 y los alimentados con hidrolizados de pescado.

Carriles A, B, y C son incubados con inhibidores de proteasas. A= TLCK, B= PMSF, C=EDTA. C32= grupo control, F3 = 3% hidrolizado de pescado (FH); F9 = 9% FH; F15 = 15% FH.

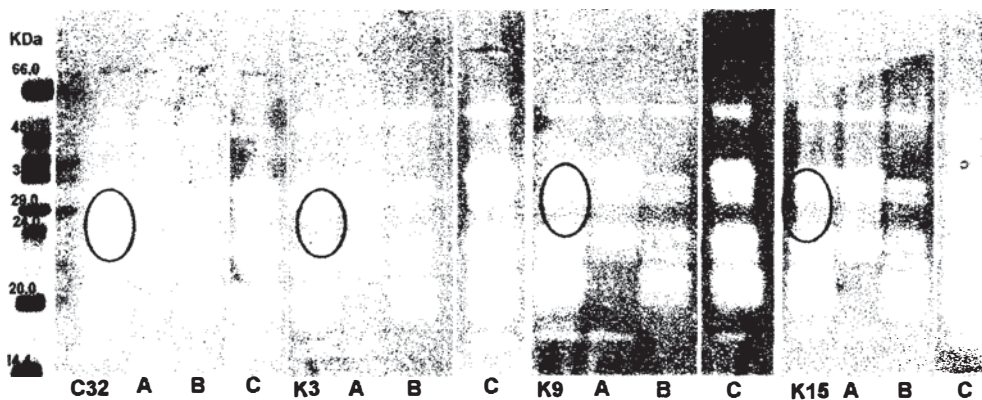


Fig. 3. Zimogramas de extractos de hepatopáncreas de camarones de los grupos C32 y los alimentados con hidrolizado de krill.

Carriles A, B, y C son incubados con inhibidores de proteasas. A= TLCK, B= PMSF, C=EDTA. C32= grupo control, K3 = 3% hidrolizado de krill (KH); K9 = 9% KH; K15 = 15% KH.

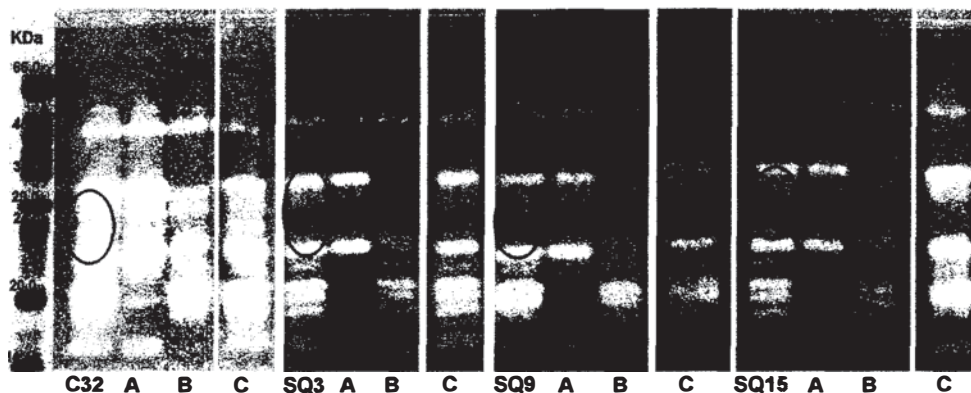


Fig. 4. Zimogramas de extractos de hepatopáncreas de camarones de los grupos C32 y los alimentados con hidrolizados de pescado. Carriles A, B, y C son incubados con inhibidores de proteasas. A= TLCK, B= PMSF, C=EDTA. C32= grupo control, SQ3 = 3% calamar (SQ); SQ9 = 9% SQ, SQ15 =15% SQ.

La harina de calamar y los dos hidrolizados fueron analizados para actividad proteolítica residual usando azocaseína como sustrato. Solo el hidrolizado de krill mostró actividad proteolítica (0.33 U/ml de actividad proteolítica total). Se separaron por SDS-PAGE al 12% las fracciones proteicas de cada uno de los ingredientes y otros geles para revelar actividad (S-SDS-PAGE 12%). No se detectó actividad en gel para la harina de calamar y para el hidrolizado de pescado, pero sí para el hidrolizado de krill, por lo que el extracto de KH se incubó por 6 horas a 50 °C, tomando muestra cada hora, para ver si las enzimas que contenía eran resistentes al calor y podrían llegar a estar activas en el alimento. Se observó que después de 6 horas de incubación no perdieron su actividad (Fig. 5), por lo que es probable que la presencia de estas enzimas en los alimentos hayan contribuido para los buenos resultados de crecimiento que se obtuvieron con los tres grupos alimentados con KH. Se cree que las enzimas presentes en el KH provengan de enzimas propias del krill, ya que es un producto liofilizado y por lo tanto puede contener enzimas activas. Sin embargo no se tiene la certeza de ello, ya que también estas enzimas pueden haber sido adicionadas al producto para un mejor desempeño en los alimentos balanceados que lo contengan.

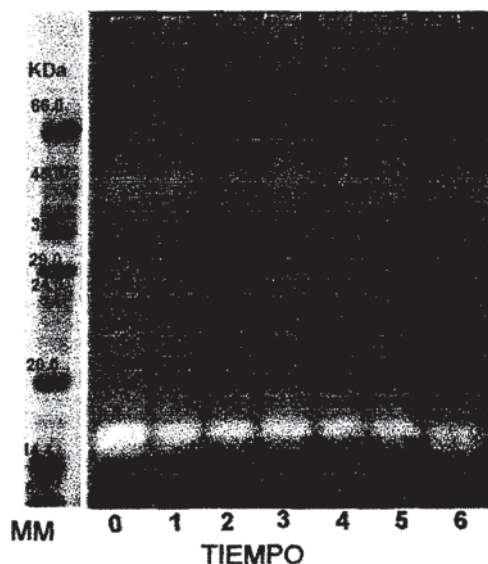


Fig. 5. Zimogramas de extracto de hidrolizado de krill incubado de 0 a 6 horas a 50 °C.

Las electroforésis (SDS-PAGE) de FH y KH, mostraron que en los dos hidrolizados la mayor parte de la proteína soluble son fracciones de menos de 20 kDa (Fig.6, carriles 2 y 3). En el hidrolizado de pescado no se observaron fracciones por arriba de 20 kDa, sin embargo para el hidrolizado de krill se observan bandas por encima de los 66 kDa, por lo que se presume un menor grado de hidrólisis (DH%) para este último, lo que puede estar relacionado con los resultados de crecimiento, ya que la presencia de péptidos de bajo peso molecular en el hidrolizado de pescado (DH alto) y tal vez hasta aminoácidos libres, pueden ocasionar menor crecimiento, como se observó en el grupo F15.

El crecimiento de los grupos de camarón alimentados con KH se afectó positivamente tanto con cantidades bajas como cantidades altas de KH en los alimentos. Esto se relaciona con un menor grado de hidrólisis y a la presencia de enzimas activas que pueden contribuir a mejorar la asimilación de la proteína presente en los alimentos.

Una de las características más importantes en los hidrolizados de proteína, para una buena calidad nutricional, es el grado de hidrólisis del producto. Para el caso de peces se ha reportado que altos niveles de aminoácidos libres en los alimentos, puede alterar el ritmo natural de absorción en el tracto digestivo (Hardy 1991), lo que induce a absorción

prematura de ciertos aminoácidos libres en relación con la absorción de aminoácidos que aun se encuentran en las cadenas polipeptídicas y como resultado ocurre un desbalance en la absorción de aminoácidos. También se ha demostrado que la adición de aminoácidos libres no ha proporcionado resultados satisfactorios para el crecimiento de camarones, así como para algunos animales terrestres (Akiyama, et al. 1991; Fox et al. 1994; Shiau, S.-Y. 1998).

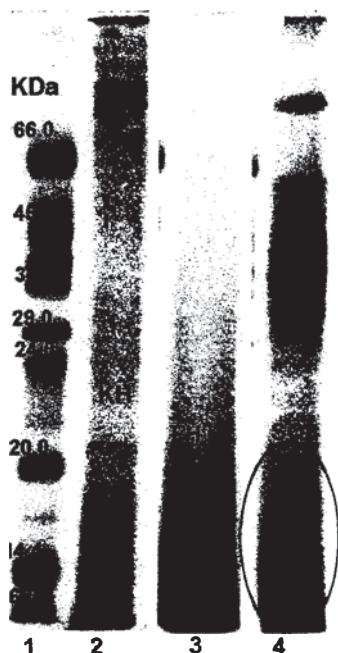


Fig. 6. Electroforesis en geles poliacrilamida al 12 % con extractos de hidrolizados y calamar. Carril 1, marcadores de masa molecular; carril 2, SDS-PAGE de hidrolizado de krill; carril 3 y 4 SDS- PAGE de hidrolizado de pescado y de harina de calamar respectivamente.

Es posible la respuesta de crecimiento observada en los grupos alimentados con calamar sea el resultado de presencia de pequeños péptidos y tal vez aminoácidos libres que se encuentran en el músculo de calamar mostrados en el gel de electroforesis correspondiente extracto de calamar (Fig. 6 carril 4) en las bandas correspondientes a pequeños péptidos por debajo de los 20 kDa (señalados por un ovalo), los cuales también podrían ser el resultado de hidrólisis de la proteína por enzimas endógenas del músculo de calamar (catepsina y cistein-proteinazas) durante el período post-mortem (Ponce et al. 1999). Hay evidencias de

que la miosina es la principal proteína hidrolizada durante el almacenamiento y es responsable de la pérdida de calidad del músculo del manto de calamar gigante durante el almacenamiento (Dublán et al. 2000). Aunque también se sabe que existen péptidos y aminoácidos libres en el músculo del manto de calamar de algunas especies (Suyama y Kobayashi, 1980), por lo que pudieran estar los dos factores involucrados en los resultados del presente experimento.

En base a lo anterior, la presencia de péptidos pequeños y posiblemente aminoácidos libres en el músculo de calamar, puede ser la explicación a los resultados de crecimiento observados en los grupos alimentados con calamar adicionado en los alimentos, similar a los obtenidos en los grupos alimentados con hidrolizado de pescado, ya que al secar a 50 °C sin haber cocido previamente el músculo, las enzimas endógenas pudieron haber hecho su trabajo sobre el músculo.

Algunas investigaciones previas han reportado resultados similares a los actuales en experimentos de alimentación cuando se ha utilizado calamar como complemento o fuente única de proteína, por ejemplo Che-Utama, (1992), reemplazó harina de pescado por calamar en alimentos para *Penaeus monodon*. el grupo alimentado con el nivel más bajo de reemplazo de harina de pescado por calamar (10%) fue el que creció mejor que los otros grupos con reemplazos entre 0-30%. También Lim et al. (1997) reportaron para langosta americana (*Homarus americanus*), que de dos tipos de alimento artificial preparado con mezclas proteicas que incluían entre otros, calamar en distintas proporciones (43 y 35 % respectivamente), el alimento que produjo mayor crecimiento fue el que contenía menor cantidad de calamar, sin embargo ninguno de los dos alimentos fue satisfactorio para el experimento. Otro ejemplo que apoya los resultados obtenidos en este trabajo con los camarones alimentados con calamar es el de Nair et al. 1995, quienes alimentaron camarones de la especie *Metapenaeus dobsoni* en dos grupos, uno con adultos vivos de artemia y otro con calamar fresco. El grupo alimentado con artemia creció 84% mas que el alimentado con calamar.

Digestibilidad in vitro

Para entender mejor el proceso de digestión de los alimentos adicionados de las fuentes de proteína experimentales, se evaluó su digestibilidad in vitro, aplicando el método de pH-stat utilizando los extractos enzimáticos de los hepatopáncreas de los camarones de acuerdo a lo descrito por Ezquerro et al. (1997). Todas las muestras para los ensayos in vitro se pesaron de acuerdo al contenido de proteína determinado por el método de Kjeldahl. Después de los ensayos con enzimas de camarón, se evaluó el DH de los alimentos utilizando una mezcla de enzimas comerciales (ver segundo artículo). Se usó cantidad de muestra equivalente a 0.08 g de proteína para todos los alimentos. Para cada ensayo se adicionó un volumen equivalente a 2.5 unidades de actividad enzimática. El mayor grado de hidrólisis (DH%) utilizando las enzimas de los camarones se obtuvo para los alimentos F9 y F15, El menor DH% fue para el alimento control (C32). Cuando se usaron las enzimas de camarón para hidrolizar caseína, los menores DH se obtuvieron con enzimas de los grupos F3, k3 y SQ3.

Se investigó la relación entre el DH% de los alimentos vs. ADC pero no hubo correlación cuando se usaron los datos de todos los grupos, pero cuando se separaron los datos de los grupos alimentados sin proteína hidrolizada, la regresión lineal mostró correlación negativa en DH vs. ADC de los alimentos con proteína hidrolizada (F3, F9, F15, K3, K9, y K15; $R^2 = 0.5408$, $P < 0.01$), La misma respuesta se observó con las enzimas comerciales, pero con mejor correlación ($R^2 = 0.8127$, $P < 0.01$), en el resto de los datos (los alimentos sin hidrolizados) se observó una tendencia contraria, con pendiente positiva pero sin correlación significativa. Es muy probable que este efecto se deba a la presencia de proteína parcialmente hidrolizada y al hecho de que hay menos enlaces peptídicos que hidrolizar en los alimentos. Dimes et. al. (1994) concluyó que el método de pH-stat, no es apropiado para muestras de alimento con hidrólisis previa.

El ADC de la proteína en todos los grupos fue mejor cuando se comparó con el grupo control, lo que indica que el reemplazo de una pequeña parte de la proteína de los alimentos

por otra de mayor valor biológico para los camarones, puede mejorar la asimilación del alimento.

Los resultados de alimentación con proteína hidrolizada en camarones concuerdan con previas investigaciones realizadas en peces y no es recomendado su uso en altas concentraciones en los alimentos para camarón. Derivado de este estudio se recomienda adicionar pequeñas cantidades de proteína hidrolizada a los alimentos para camarón. Ravallec-Ple et al. (2000) reportaron la existencia de ciertas fracciones en hidrolizados de proteína de pescado, que mostraron contener péptidos biológicamente activos como factores de crecimiento en cultivos de células, por lo que es importante el estudio de este tipo de productos en el sistema digestivo de los camarones.

CAPÍTULO III

La digestión de peneidos es un tópico que ha sido objeto de muchos estudios. Uno de los principales parámetros que se utilizan para estudiar el sistema digestivo es la actividad proteolítica de las enzimas digestivas. El método que normalmente se usa para obtenerlas es haciendo homogenizados del hepatopáncreas, que es el órgano donde se concentran las principales funciones digestivas, como es la secreción de enzimas.

El objetivo de este capítulo es evaluar un método alternativo para medir la actividad proteolítica del sistema digestivo de los camarones a través de colecta de heces. Se esperaría que las enzimas digestivas que participan en la digestión estén presentes en las heces y que se puedan usar para medir la actividad enzimática que estuvo involucrada en la digestión. Se relaciona la información sobre actividad enzimática del capítulo anterior con la que aquí se presenta.

Actividad proteolítica en heces de camarón.

Adicional al estudio de las proteasas presentes en el tracto digestivo de los camarones, se midió la actividad proteolítica en las heces, buscando información adicional que contribuya al entendimiento de las respuestas del sistema digestivo del camarón a las diferentes fuentes y proporciones de proteína suministrada en los alimentos.

Materiales y métodos

Se colectaron heces del estudio de digestibilidad in vivo (descrito en el Capítulo 2 y en el segundo artículo). Después de haber sido evaluado el ADC, las heces liofilizadas restantes permanecieron a -20°C por aproximadamente 8 meses, hasta la realización de esta parte del trabajo.

Extractos enzimáticos

Se prepararon extractos enzimáticos de heces agregando 0.1 g (seco) a 1 ml de agua destilada. Se agitó durante 20 minutos a 25°C . Posteriormente se centrifugó a $10\ 000\times g$ por 10 minutos a 4°C . Se recuperó el sobrenadante y se guardó a -20°C hasta su uso. Se evaluó la proteína soluble por el método de Bradford (1976) y se determinó la actividad proteolítica total y específica para tripsina y quimotripsina, tal como se hizo con las enzimas de camarón en el capítulo 2.

Electroforesis

Se hicieron electroforesis de proteína en SDS-PAGE y para actividad proteolítica en S-SDS-PAGE al 15%.

Para los geles de proteína se puso extracto equivalente a 3 μg de proteína en cada uno de los carriles. Se revelaron utilizando el protocolo para tinción con plata de Amersham Pharmacia Biotech (1999). Para los geles de actividad (S-SDS-PAGE) se colocaron volúmenes de extracto equivalentes a 10 mU de actividad en cada carril.

Se analizó la actividad, composición y clase de las proteasas presentes en las heces en S-SDS-PAGE usando inhibidores para tripsina y quimotripsina: TLCK 0.001M en HCl 0.001M, pH 3; PMSF 0.2M en DMSO; EDTA 0.2 M pH 8. Las muestras fueron incubadas con el inhibidor 1 hora antes de ponerlas en los geles de electroforesis en una solución 1:5 (inhibidor:enzima).

Se hizo un análisis de correlación utilizando los logaritmos naturales (\ln) de la actividad total vs. \ln de actividad de tripsina y \ln de actividad total vs. \ln de actividad de quimotripsina en hepatopáncreas y en heces. Se usaron logaritmos naturales con la finalidad de linealizar la función y poder aplicar el análisis.

Resultados y discusión

Actividad proteolítica

Se encontraron diferencias significativas en actividad proteolítica total ($P < 0.01$) en los extractos de heces de los diferentes grupos de camarones (Tabla. II)

El valor más bajo en actividad total fue para las heces del grupo SQ15 y el más alto para el grupo SQ3. Los grupos con mayor actividad que el grupo control fueron los grupos SQ3 y SQ9. Se observó una disminución en la actividad total de los grupos SQ al aumentar la harina de calamar en los alimentos. En los grupos alimentados con FH y KH también se observa disminución de actividad total al subir más de 3% la concentración de hidrolizado de pescado.

Tabla II. Actividad proteolítica total y específica en heces de camarón.

Grupo	U de Act. total/mg proteína	U de act. Tripsina/mg de proteína	U de act. de Quimiotripsina
C32	6.21 ^{efg}	2.90 ^d	0.43 ^a
F3	6.48 ^{fg}	1.92 ^c	0.47 ^f
F9	4.30 ^{ab}	0.98 ^a	0.29 ^b
F15	4.90 ^{bc}	0.83 ^a	0.34 ^c
K3	6.81 ^{gh}	0.85 ^a	0.46 ^f
K9	5.05 ^{bcd}	0.79 ^a	0.35 ^c
K15	5.62 ^{def}	1.97 ^c	0.38 ^d
SQ3	9.25 ⁱ	2.13 ^c	0.58 ^h
SQ9	7.98 ^h	3.08 ^d	0.54 ^g
SQ15	3.38 ^a	1.57 ^b	0.21 ^a

Con respecto a la actividad de tripsina en heces también se observaron diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los grupos. El grupo control y el grupo SQ9 alcanzaron la mayor actividad, mientras que las menores se observaron para los grupos F9, F15, K3 y K9. No se observó un patrón de aumento o disminución de acuerdo a las concentraciones de los ingredientes a prueba. La actividad de quimotripsina fue menor en las heces del grupo SQ15 y la mayor para el grupo SQ3. Se observó que para los grupos alimentados con KH y SQ hay una disminución en la actividad al aumentar el ingrediente en el alimento. Para los grupos de FH no se observa un patrón similar.

No se encontró ninguna relación entre actividad total y tripsina tanto para heces como para hepatopáncreas ($P > 0.1$), sin embargo para actividad total vs. actividad de quimotripsina se obtuvo una alta correlación tanto en hepatopáncreas como en heces. ($P < 0.01$, Figs. 7 y 8). Sin embargo la correlación fue mas alta para las enzimas de heces que en hepatopáncreas ($R^2 = 0.97$ y 0.62 respectivamente), lo que sugiere que la actividad de la tripsina puede ser una parte fija de la actividad enzimática total, o bien una fracción variable pero que no está asociada a la actividad total y que la quimotripsina puede ser modulada de acuerdo a las características de la proteína del alimento y una porción fija relativa a la actividad proteolítica total. Esta posibilidad es explicada porque la tripsina no varía de acuerdo a la actividad total como lo hace la quimotripsina. Esta relación es mas evidente en las enzimas

de heces que en las de HP, posiblemente porque cuando se homogeniza el HP se liberan enzimas y posiblemente inhibidores que en condiciones naturales no estarían allí, mientras que en las heces las enzimas existentes fueron secretadas por el tracto digestivo y existe la posibilidad de que la información relativa a actividad enzimática tenga menos variaciones en las heces que en el hepatopáncreas. Sin embargo también en las heces puede haber fuentes de variación, ya que mientras se encuentran en el agua puede haber pérdida de enzimas, así como producción enzimática de bacterias.

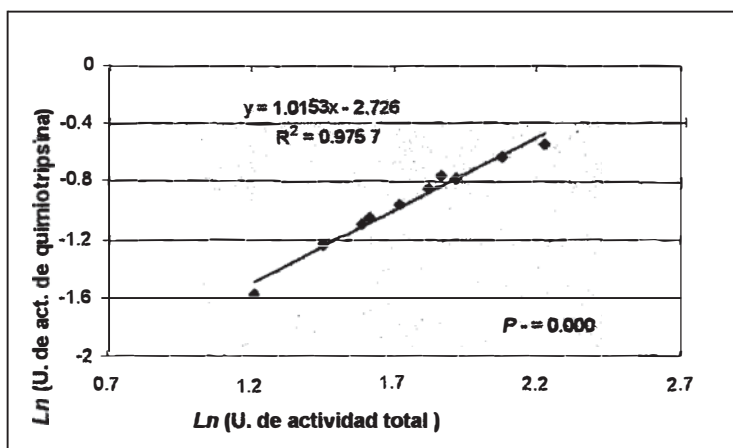


Fig. 7. Análisis de correlación de Ln (logaritmo natural) de actividad total vs. Ln actividad de quimotripsina en extractos enzimáticos de heces de camarones.

En los presentes resultados puede haber involucrada alguna interferencia por actividad bacteriana, sin embargo como todas las heces estuvieron el mismo tiempo aproximado de permanencia en el agua, se estima que si hay contribución de actividad enzimática por parte de bacterias esta puede ser un factor de la misma magnitud en las heces de todos los grupos. En este sentido habrá que hacer mas investigación para determinar la confiabilidad de este método como alternativo de estudio para las enzimas del tracto digestivo de los camarones.

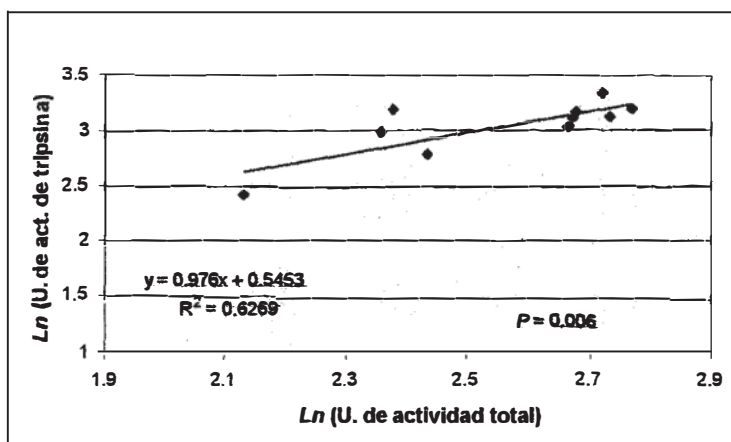


Fig. 8. Análisis de correlación de Ln (logaritmo natural) de actividad proteolítica total vs. Ln actividad de quimotripsina en extractos enzimáticos de hepatopáncreas de camarones.

Electroforésis

Los geles de electroforesis para heces mostraron un patrón similar de bandas para proteína (Fig. 9) al igual que ocurrió con los extractos de hepatopáncreas (Fig. 1). Lo que indica que no hay cambios importantes en proteína soluble tanto en heces como en hepatopáncreas entre los grupos experimentales. Lo mismo ocurrió con los zimogramas de heces, todos muestran un patrón similar de actividad proteolítica (Fig. 10).

Con la finalidad de hacer comparaciones, en la Fig. 11, se presentan zimogramas de HP y heces del grupo C32 (carriles 2 y 7 respectivamente), ya que el patrón de bandas en heces fue muy parecido solo se presentan los zimogramas de inhibición de este grupo. En el carril 3 de esta figura se observa que la inhibición para tripsina con TLCK en extracto de hepatopáncreas ocurre a partir de los 23 kDa, mientras que en el extracto de heces se observa inhibición solo por debajo de los 16 kDa (carril 8). Los carriles 4 y 9 contienen HP y heces respectivamente con inhibidor PMSF que presenta desaparición de bandas en áreas similares en ambos carriles. Los carriles 5 y 10 con EDTA mostraron mas inhibición en HP que en heces. Es necesaria mas investigación para determinar las diferencias en patrones de inhibición entre las enzimas de heces y las de hepatopáncreas.

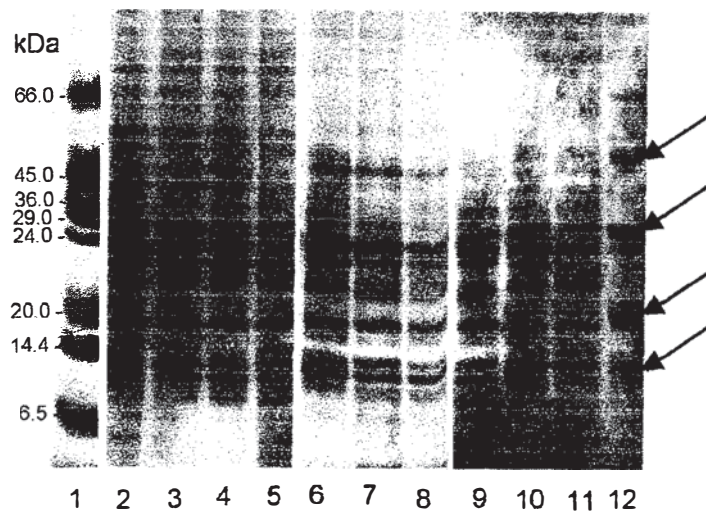


Fig. 9. SDS-PAGE al 15% de extractos de heces de camarones y un hepatopáncreas. Carril1, marcadores de masa molecular, carriles 2-11: C32, F3, F9, F15, K3, K9, K15, SQ3, SQ9 y SQ15 respectivamente; carril 12, extracto de HP. Se muestran con flechas las bandas de proteína en HP que se conservan en los extractos de heces.

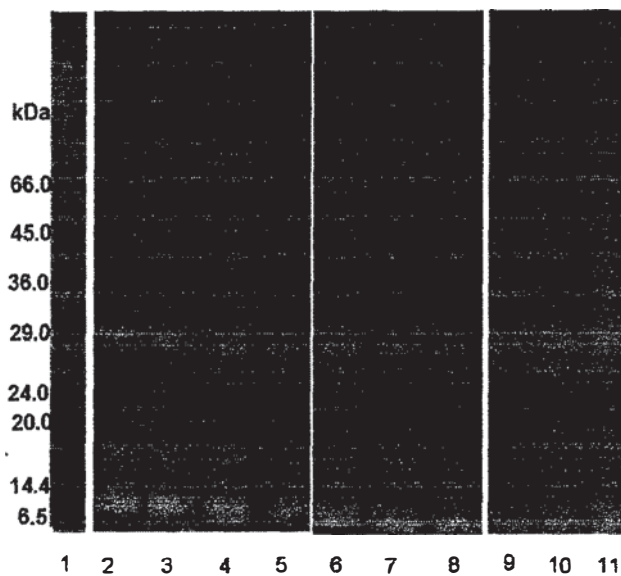


Fig. 10. S-SDSPAGE al 12% de extractos de heces. Carril 1, Marcadores de masa molecular; carriles 2-11, C32, F3, F9, F15, K3, K9, K15, SQ3, SQ9, y SQ15 respectivamente.

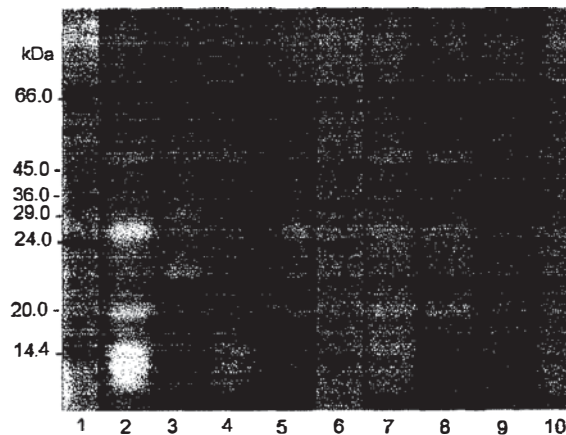


Fig. 11. Inhibición en S-SDS-PAGE al 15% de extractos de HP (carril 2) y heces de camarones (carril 7). Carril 1 y 6, marcadores de peso molecular; carriles 3, 4, y 5, extracto de hepatopáncreas mas TLCK, PMSF, y EDTA respectivamente, carriles 8, 9, y 10, extractos de heces mas TLCK, PMSF y EDTA respectivamente.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

Como conclusión general puede establecerse que el sistema digestivo de los camarones necesita proteína de características específicas para una mejor asimilación y como resultado mejores tasas de crecimiento. También es necesaria mayor investigación para entender cabalmente los mecanismos de asimilación del sistema digestivo. Puesto que se observó correlación entre el crecimiento de los camarones y la actividad de la quimotripsina, es probable que este sea un parámetro que se pueda seguir para evaluar calidad de alimentos para camarón. Sin embargo habrá que hacer mas investigación para confirmar estos resultados.

El calamar gigante (*D. gigas*) posee propiedades que estimulan el crecimiento acelerado en los camarones y 3% de proteína de este ingrediente en el alimento demostró ser suficiente. Sin embargo se recomienda seguir investigando sobre las propiedades de este ingrediente sobre el sistema digestivo de los camarones, ya que se evidencian límites para su inclusión en alimentos y que produce un efecto contrario cuando se administra en exceso.

Se recomienda investigar hidrolizados de calamar de distintos DH%, en alimentos para camarón, así como los extractos solubles del músculo.

Se recomienda mejorar el proceso de producción de harina de calamar, evitando el calor excesivo al secar el producto y la putrefacción de la materia prima antes del proceso para obtener un producto que realmente promueva el crecimiento.

Los hidrolizados de proteína son una buena fuente alternativa de proteína que se puede usar como complemento en los alimentos para organismos acuáticos. Sin embargo hace falta mas investigación referente al grado de hidrólisis adecuado para que sea apropiado como complemento alimenticio de camarones y sobre todo determinar los niveles adecuados que se pueden incluir en alimentos para camarón.

Se concluye que la información obtenida de las enzimas digestivas es importante, sin embargo hace falta mejorar las técnicas para evaluar la actividad de proteasas en el sistema digestivo de los camarones, la técnica en heces aún necesita mas investigación para que sea considerada como un método alternativo. Sin embargo los resultados de actividad y la presencia de patrones de bandas parecidos en los geles de electroforesis con extractos de heces y HP, mostraron que los extractos enzimáticos de heces pueden reflejar lo que ocurre en el hepatopáncreas de los camarones.

Se recomienda analizar las actividades de exopeptidasas tanto en hepatopáncreas como en heces para estudios posteriores ya que pueden ayudar a una mejor explicación de los resultados.

También se recomienda que para evaluar el DH% en pH-stat con proteína previamente hidrolizada, se evalúe el DH% de la proteína hidrolizada con el OPA, antes y después del ensayo, para validar los resultados y determinar el error introducido al utilizar proteína previamente hidrolizada.

LITERATURA CITADA

- Akiyama, D. M., Dominy, W. G., and Lawrence A., L., 1991. Proceeding of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop. Thailand and Indonesia, September 19-25. Dean M. Akiyama and Ronnie K. H. Tan Editors, pp. 80-97.
- Amersham Pharmacia Biotec, 1999. Protein electrophoresis. Technical manual. 76, pp.
- Andrews James W. and Sick Lowel V., 1972. Studies on the nutritional requirements of Penaeid shrimps. Proc. World Maricult. Soc., 3 : 403 - 414.
- Anggawati Agnes M., J. T. Murtini, E. S. Heruwati, 1990. The use of hydrolyzed protein concentrate in practical feeds for *Penaeus monodon* juveniles. Research Report. Research Institute for Fish Technology. Palmerah Jakarta.
- Balazs George H., 1973. Preliminary studies on the preparation and feeding of crustacean feeds. Aquaculture 2 : 369-377.
- Berge G., M.; Trond, S.; 1996. Fish protein hydrolysate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. Aquaculture, 145:205-212.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. An. Biochem. 72: 248-254.
- Cahu, C.L. Zambonino Infante, J.L. Quazuguel, and P. Le Gall, M.M., 1999. Protein hydrolysate vs. fishmeal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. Aquaculture. 171:109-119.
- Che-Utama-Che-Musa, 1992. The effect of different levels of protein sources on survival and growth of the tiger prawn larva. Fish. Bull. Dep. Fish. Malays, 79: 27 pp.
- Córdova-Murueta, J., H., and García-Carreño F., L., 2001. The effect on growth and protein digestibility of shrimp *Penaeus stylirostris* fed with feeds supplemented with squid (*Dosidicus gigas*) meal dried by two different processes. Journal of Aquatic Food Product Technology. 10 (2): 35-47 p.
- Cruz E. Guillaume J. 1983. Facteur de croissance inconnu de la farine de calamar pou la crevette japonaise: localization de ce facteur. Conseil International pou l'Exploitation de la

Mer. F:14.

Cruz-Ricque L. E., J. Guillaume; A., Van Wormhoudt., 1989. Effect of squids extracts on time course apperance of glucose and free amino acids in haemolymph in *Penaeus japonicus* after feeding: preliminary results. *Aquaculture*, 76, 57-65

Cruz-Rique, E., L., and Guillaume, J., Cuzon, G., and AQUACOP, 1987. Squid protein effect on growth of four penaeid shrimp. *Journal of the World Aquaculture Society*, 18(4):209-217.

Cruz-Suarez L. E., Denis Ricque & ACQUACOP, 1992. Effect of squid meal on growth of *Penaeus monodon* juveniles reared in pond pens and tanks. *Aquaculture*, 106, 293-199.

Day, O.J. Howell, B.R. Jones, D.A. Anglesey, 1997. The effect of dietary hydrolyzed fish protein concentrate on the survival and growth of juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.), during and after weaning. *Aquaculture & Research*. December 1997. 28 (12): 911-921.

Dimes, L., E.; Haard N., F.; Dong, F., M.; Rasco, B., A.; Forster, I., P.; Fairgrieve, W., T.; Arndt, R.; Hardy, R., W.; Borrows§ and Higgs, D., A., 1994. Estimation of protein digestibility - II In vitro assay of protein in salmonid feeds. *Comp. Biochem. Physiol.* 108a:2/3, pp. 363-370.1.

Dublán-G., O.; Pérez-Ch., M.; Guerrero-L., I.; Ponce-A., 2000. Effect of endogenous proteinases isolated from giant squid (*Dosidicus gigas*) on myofibrillar proteins. IFT Annual Meeting and Food Expo, session 51C-26, June 10-14, Dallas, Texas, USA.

Escutia, S., 1996. El alimento balanceado en México desde el punto de vista del acuacultor. CANAIMPES. Tercer simposium Internacional de nutrición Acuícola. 11 - 13 de noviembre, 1996, Facultad de Ciencias Biológicas, UAN, Monterrey, NI. México.

Ezquerria, J. M., García-Carreño, F.L., Civera, R., and Haard, N.F., 1997. pH-stat method to predictct digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 175:249-260.

Fenucci Jorge L., Zein-Eldin Z. P., Lawrence A. L., 1980. The nutritional response of two penaeid species to various levels of squid meal in a prepared feed. *Proc. World Maricul. Soc.* 11:403-409.

- Fox, C., Brown, J. H., and Briggs, M., 1994. The nutrition of prawns and shrimp in aquaculture - a review of recent research. In *Recent advances in Aquaculture V.*, Muir, James, F.; Roberts, and Ronald J., Eds, Institute of Aquaculture Blackwell Science, pp. 131- 206.
- García Carreño, F.L., and Haard, N., 1993. Characterization of proteinases classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and cray fish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *J. Food Biochem.*, 17:97-113.
- García-Carreño, F.L.; Dimes E. L., and Haard, N., 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214:65-69.
- Hardy, Ronald, W., 1991. Fish hydrolysates: production and use in aquaculture feeds. *Proceeding of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop. Thailand and Indonesia, September 19-25.* Dean M. Akiyama and Ronnie K. H. Tan Editors, pp. 109 - 115.
- Lim, Boon, K., Sakurai, N., Sugihara, T.; Kittaka, J., 1997. Title Survival and growth of the American lobster *Homarus americanus* fed formulated feeds. *Bulletin of Marine Science.* 61(1): 159-163.
- Morales-Bojorquez, E.; Hernandez-H., A.; Nevarez-M., M.; Cisneros-M., M.; Guerrero-Escobedo, F., 2001. Population size and exploitation of giant squid (*Dosidicus gigas* D'Orbigny, 1835) in the Gulf of California, Mexico. *Scientia Marina* 65(1):75-80.
- Nair, S., R., S.; Achuthankutty, -C.,T.; Royan-J., P., 1995. Comparison live adult *Artemia* and squid meat on the growth of Penaeid shrimp *Metapenaeus dobsoni* (Miers). *Proc.- Indian-Natl.-Sci.-Acad.-B-Biol.-Sci.* 1995. 61(6): 419-422
- Neal R. A. 1980. Penaeid shrimp culture research at the National Marine Fisheries Service Galveston Laboratory; *Advances in Aquaculture. Papers presented at the FAO Technical conference on Aquaculture. Kyoto, Japan, 26 May - 2 June 1976.* Ed. by Pillay T. V. R. and Dill Wm. A.. Fishing News Books Ltd. 653 pp.
- New Michael B. 1976. A review of dietary studies with shrimp and prawns. *Aquaculture*, 9:

101-144.

Panyam D. y Kilara A., 1996. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in food science & Technology*, 7: 120-125.

Papadopulos M. C., 1989. Effect of processing on high-protein feedstuffs: A review. *Biological Wastes* 29: 123-138.

Piedad-Pascual F. 1990. Feeds and Feeding of cultured tiger prawns in Southeast Asia. *SEAFDEC Asian Aquaculture* Vol. 12: 2, pp. 5-9

Ponce-A., E.; Castellanos, C.; Morales, R.; Shirai, K.; and Guerrero I., 1999. Isolation and characterization of proteinases from giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle. IFT 1999 Annual Meeting, Session 20-4, July 24-28, Chicago, USA.

Ravallec-Ple, R.; Gilmartin, L.; Van-Wormhoudt A.; Le-Gal, Y. Influence of the hydrolysis process on the biological activities of protein hydrolysates from cod (*Gadus morhua*) muscle *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (15): 2176-2180.

Shiau, S.-Y., 1998. Nutrient requirements of penaeid shrimps. *Aquaculture* 164:77-93.

Suyama, M.; Kobayashi, H., 1980. Free amino -acids and quaternary ammonium bases in mantle muscle of squids. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 46 (10): 1261-1264.

Zambonino-Infante, J. L.; Chantal, L. C., and A., Peres. 1997. Partial Substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *American Society for Nutritional Sciences*. pp. 608-614.