

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES COSTERAS

TESIS

CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS
DIGESTIVAS EN FIGUAS (*Macrobrachium
americanum*, Bate, 1868)

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
**LICENCIADO EN BIOLOGÍA MARINA Y
MANEJO INTEGRAL DE CUENCAS**

PRESENTA:

VICTOR MANUEL LAGUNA NATARÉN



Tonalá, Chiapas

Enero 2019

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES COSTERAS

TESIS

CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS
DIGESTIVAS EN PIGUAS (*Macrobrachium
americanum*, Bate 1868)

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA MARINA Y
MANEJO INTEGRAL DE CUENCAS

PRESENTA:

VICTOR MANUEL LAGUNA NATARÉN

DIRECTOR:

MC. ARKADY USCANGA MARTÍNEZ
UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS - CENTRO DE INVESTIGACIONES COSTERAS

ASESORES

DR. CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ GONZÁLEZ
UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO – DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

MC. NATALIA PERALES GARCÍA

MC. JOSÉ REYES DÍAZ GALLEGOS
UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS - CENTRO DE INVESTIGACIONES COSTERAS

Tonalá, Chiapas

Enero 2019





Tonalá, Chiapas
15 de noviembre de 2018

C. Victor Manuel Laguna Nataren

Pasante del Programa Educativo de: Lic. en Biología Marina y Manejo Integral de Cuencas.

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:

Caracterización de enzimas digestivas en piguas (*Macrobrachium americanum*, Bate, 1968).

En la modalidad de

TESIS

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

Revisores:

M. en C. Jesús Manuel López Vila

M. en C. Delmar Cancino Hernández

M. en C. Arkady Uscanga Martínez

Suplente:

M. en C. Carlos Alberto Gellida Esquinca

Firmas:

Ccp. Expediente

DEDICATORIA

A Dios.

Por terminar mis estudios, las metas propuestas, las oportunidades que llegaron en el lapso de vida, la oportunidad de existir y conocer a personas asombrosas en mí vida.

A mis padres.

Existen dos personas a quienes les agradezco la confianza y la fe en mí, durante mi formación académica y la motivación para alcanzar mis metas, en todo lo que realizo mi madre Carmelita Natarén y padre Manuel Laguna.

Familia Natarén y Laguna.

Por el apoyo íntegro y motivación que constantemente me han deseado durante mi vida.

AGRADECIMIENTO

Al MC. Arkady Uscanga Martínez y MC. Natalia Perales García, por su gran esfuerzo, paciencia y constancia para dirigir este trabajo... de corazón gracias.

Al Dr. Carlos Alfonso Álvarez Gonzáles y Mc. José Reyes Díaz Gallegos por las aportaciones y consejos brindados para hacer posible este trabajo de investigación.

Al comité de revisores Arkady Uscanga Martínez, Delmar Cancino Hernández, Jesús Manuel López Vila y Carlos Alberto Gellida Esquinca, por sus valiosas contribuciones y sugerencias para mejorar el presente trabajo de investigación.

A mis compas Williams Rodríguez Valencia y Francisco Emmanuel Vidal Bello por todo su apoyo y consejos brindados, sin olvidar a Javier Toledo Solís que me brindo la confianza y asilo durante mi estancia en Villahermosa, para poder concluir el presente trabajo de investigación.

Muchas gracias a las personas que de una u otra forma participaron, los consejos y las recomendaciones permitieron que durante la elaboración de este trabajo pudiera ser una excelente persona a nivel profesional.

Siempre Tener El Espíritu Científico.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO.....	4
2.1	Biología de <i>Macrobrachium americanum</i>	4
2.2	Taxonomía de <i>M. americanum</i> (Bate, 1868).....	6
2.3	Ciclo de vida.....	7
2.4	Ritmos circadianos	7
III.	ANTECEDENTES	8
3.1	Generalidad del langostino <i>M. americanum</i> en cultivo	8
3.2	Análisis bioquímicos del langostino <i>M. americanum</i>	10
3.2.1	Sistema digestivo de los crustáceos	10
3.3	Enzimas digestivas	11
3.3.1	Proteasas	12
3.3.2	Amilasas.....	12
3.3.3	Lipasas.....	13
3.3.4	Fosfatasas ácida y alcalina.....	13
3.4	Estudios de caracterización enzimática	13
3.4.1	Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de la enzima	14
3.4.2	Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la enzima.....	14
3.4.3	Caracterización mediante inhibidores específicos	14
3.5	Utilización de técnicas electroforéticas	15
IV.	OBJETIVOS.....	16
4.1	Objetivo General.....	16
4.2	Objetivos específicos.....	16
V.	MÉTODOS.....	17
5.1	Obtención de ejemplares.....	17
5.2	Obtención de extracto enzimático.....	18

5.3	Determinación de la proteína soluble.....	19
5.4	Identificación de actividades específicas	20
5.4.1	Actividad de proteasas	20
5.4.2	Actividad de lipasas	21
5.4.3	Actividad de amilasas	22
5.4.4	Actividad de las fosfatasas alcalinas.....	22
5.4.5	Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de proteasas alcalinas.....	23
5.4.6	Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de proteasas alcalinas.....	24
5.4.7	Estudios de inhibición enzimática	24
5.4.8	Estudios de inhibición por técnicas electroforéticas para proteasas alcalinas.....	25
VI.	RESULTADOS.....	26
6.1	Determinación de la proteína soluble.....	26
6.2	Caracterización de actividades específicas	26
6.3	Efecto del pH sobre la Actividad y estabilidad de proteasas alcalinas	27
6.3.1	pH óptimo	27
6.3.2	Estabilidad de pH	28
6.4	Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de proteasas alcalinas.....	29
6.4.1	Temperatura óptima	29
6.4.2	Estabilidad de temperatura	30
6.5	Estudios de inhibición enzimática	31
6.6	Estudios de inhibición mediante técnicas electroforéticas para proteasas alcalinas.....	32
VII.	DISCUSIÓN.....	33
7.1	Actividad enzimática digestiva	33
7.2	Caracterización enzimática.....	34

7.2.1	pH óptimo y estabilidad de proteasas alcalinas	34
7.2.2	Temperatura óptima y estabilidad de proteasas alcalinas.....	35
7.2.3	Caracterización mediante inhibidores y uso de SDS-PAGE.....	36
VIII.	CONCLUSIÓN	38
IX.	RECOMENDACIÓN	39
X.	REFERENCIAS.....	40

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1. Actividad de enzimas digestivas (Promedio \pm desvest) de adultos de <i>M. americanum</i>	26
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A) Anatomía general en <i>Macrobrachium</i> ; B) Anatomía de <i>M. americanum</i> (Fischer <i>et al.</i> , 1995).....	5
Figura 2. Instalaciones Centro de Investigaciones Costeras (CEICO).	17
Figura 3. <i>M. americanum</i> : A) sistema donde se mantuvieron los ejemplares; B) Sacrificio mediante <i>shock</i> térmico.	18
Figura 4. Preparación de extractos multienzimáticos: A) Extracción de hepatopáncreas; B) Homogenizado de tejido; C) Sonificador; D) Centrifugas.	19
Figura 5. Efecto del pH sobre la actividad de proteasas alcalinas de los extractos de adultos <i>M. americanum</i>	27
Figura 6. Estabilidad de proteasas alcalinas a diferentes pH y con tres tiempos de preincubación de los extractos enzimáticos en adultos de <i>M. americanum</i>	28
Figura 7. Efecto de la temperatura sobre la actividad de proteasas alcalinas de los extractos de adultos de <i>M. americanum</i>	29
Figura 8. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de proteasas alcalinas de los extractos de adultos de <i>M. americanum</i>	30
Figura 9. Estudio de inhibición de proteasas alcalinas presentes en los extractos multienzimáticos de adultos de <i>M. americanum</i>	31
Figura 10. Análisis de electroforesis SDS-PAGE de inhibición de proteasas alcalinas presentes en el extracto multienzimático de adultos de <i>M. americanum</i>	32

GLOSARIO

Absorbancia: Es la intensidad de la luz con una longitud de onda específica tras haber atravesado una muestra.

Ácido tricloroacético (TCA): Es un ácido orgánico, derivado del ácido acético, en el cual tres átomos de hidrógeno del grupo metilo han reemplazado por átomos de cloro.

Actividad proteolítica: Capacidad de las enzimas de hidrolizar enlaces peptídicos en las biomoléculas.

Almidón soluble: Es una macromolécula que está compuesta de dos polisacáridos, la amilosa y la amilopectina.

Buffer: Es una solución amortiguadora, capaz de resistir cambios en el pH. Consiste en un par ácido-base conjugado en el cual la razón aceptor de protones/donador de protones está cerca de la unidad.

Caseína: Proteína fundamental de la leche. Que es ingrediente utilizado como proteína de referencia en estudios de nutrición.

Curva patrón: Es un marco de referencia que se construye de cantidades conocidas de una sustancia (por ejemplo la albúmina sérica bovina) que se utiliza para determinar la cantidad de proteínas presente en una muestra incógnita.

Desnaturalización: Cambio en la conformación de una proteína o ácido nucleico causado por el aumento en la temperatura y/o exposición agentes químico que usualmente resulta en la pérdida de su función biológica.

Dimetilsulfóxido (DMSO): Es líquido orgánico incoloro de fórmula química CH_3SOCH_3 que contiene sulfóxido.

Electroforesis: Las proteínas se separan en bandas de acuerdo a su tamaño conforme migran a través de un gel. Las bandas de proteínas separadas son visualizadas mediante tinción con un colorante.

Enzima: Proteína u otra molécula que actúa como catalizador de las reacciones biológicas.

Hepatopáncreas: Órgano de digestión compuesto de ductos ciliados y de túbulos cerrados en los extremos, que segrega enzimas digestivas a través del epitelio del túbulo

digestivo; también responsable de la liberación de subproductos metabólicos y de otros desechos moleculares o microbianos.

Hidrólisis: Reacción química en la cual el agua interacciona con otra sustancia para formar una o más sustancias nuevas.

Inhibidor enzimático: Sustancia que en contacto con las enzimas inhibe su actividad de manera reversible o irreversible.

Isoforma: Las diferentes formas de una proteína pueden ser producidas a partir de genes relacionados, o pueden surgir del mismo gen mediante corte y empalme alternativo.

N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide (SAAPNA): Sustrato específico para quimotripsina.

N α -Benzoil-DL-Arginina-P-Nitroanilida (BAPNA): Sustrato específico para tripsina.

pH óptimo: Valor del pH cual la velocidad de una reacción enzimáticamente catalizada es máxima, debido a que el estado iónico del centro activo es idóneo para la unión del sustrato y la catálisis.

Pool enzimático: Es conjunto o agrupación de diferentes líquidos para generar el extracto enzimático.

Proteasa: Enzima capaz de degradar proteínas al hidrolizar algunos de sus enlaces peptídicos.

Shock térmico: Es la rotura de algún material al sufrir un cambio drástico de temperatura.

Sobrenadante: Parte superior clara de cualquier mezcla después de ser centrifugado.

Sustrato: En bioquímica: compuesto biológico que es transformado por la acción de las enzimas.

Tirosina: Un amino ácido que resulta de la hidroxilación de la fenilalanina.

RESUMEN

Macrobrachium americanum es un crustáceo apreciado en el sureste del país, debido a que alcanza las tallas más grandes dentro del género *Macrobrachium*, por lo que el desarrollo de su cultivo se torna de suma importancia al ser una de las 10 especies de langostinos con mayor potencial acuícola. Esta investigación tuvo como objetivo caracterizar las enzimas digestivas en adultos de la pigua *M. americanum* evaluando la actividad, condiciones óptimas y grado de inhibición. Los ejemplares fueron capturados en el río Coapa del municipio de Pijijiapan, posteriormente fueron sacrificados por *shock* térmico y se procedió a la disección y extracción de los hepatopáncreas, éstos fueron homogeneizados en solución buffer de Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (15 mg ml⁻¹) y centrifugadas (16,000 rpm por 30 min a 4 °C) para obtener los extractos enzimáticos. Se realizó la determinación de la actividad de proteasas alcalinas, cuantificación de actividades específicas, las condiciones óptimas y estabildades de pH, temperatura; y el grado de inhibición de las enzimas. Se encontró que existe una mayor actividad de proteasa alcalina 2.22 ± 0.11 mU/mg proteína. Se obtuvo la temperatura óptima para las proteasas alcalinas a 35 °C y el pH de las proteasas alcalinas es de 11. Además, los estudios de estabilidad a diferentes tiempos y temperaturas de pre-incubación mostraron que las proteasas alcalinas son inestables a 45 °C en relación a 30, 60 y 90 min de pre-incubación. Sin embargo, en 55 °C logran ser estables después de 30 min de pre-incubación. De igual manera las estabildades de las proteasas alcalinas manifestaron alta actividad en los pH's de 4, 9 y 11, dando una determinación de los inhibidores, en el cual se observó una inhibición total por PMSF y en su mayoría el SBT1. Se concluye que las enzimas encontradas coinciden con especies correspondientes al orden de los decápodos. Desde el punto de vista de su capacidad digestiva, apunta a ser considerada de hábitos omnívoros pero con tendencia a la carnivoría.

Palabras claves: *Macrobrachium americanum*, proteína soluble, enzimas digestivas, inhibición específico.

I. INTRODUCCIÓN

La producción mundial de alimentos se basa principalmente en la agricultura, ganadería y recursos acuáticos. La agricultura produce más del 60% de los alimentos básicos que representan hasta el 80% del consumo de energía y proteínas para los hogares de menores ingresos (FAO, 2009; FAO, 2011). En lo que respecta a la ganadería, ésta constituye una proporción fundamental de la dieta de la población, contribuyendo con un 40% total de energía procedente de los alimentos. Por otra parte, el principal objetivo de la pesca y la acuicultura es el de crear empleo, contribuir a la mitigación de la pobreza, así como a la seguridad alimentaria y nutricional proporcionando aproximadamente el 50% de los nutrientes necesarios para la vida humana (FAO, 2012).

La pesca se ha mantenido relativamente estable, sin embargo en la última década se expresa la preocupación sobre la situación de las poblaciones sobreexplotadas por la pesca en donde se presenta una baja significativa en el volumen de pesca (FAO, 2010). Sin embargo, existen otras alternativas para mejorar la producción de organismos acuáticos dentro de ello está la acuicultura, que es uno de los sectores de producción de alimentos de origen animal de más rápido crecimiento en los últimos años, al inicio proporcionó solo el 7% del pescado para consumo humano en 1974, este porcentaje aumentó al 26% en 1994 y al 39% en 2004, pero se prevé que para el 2030 aumentará al 62% (FAO, 2014; FAO 2016).

La acuicultura permite cultivar especies como peces, crustáceos, moluscos y plantas acuáticas en una etapa de vida o su ciclo completo (FAO, 2013). En las últimas dos décadas, la acuicultura ha realizado estudios bioecológicos, nutrimentales y socioeconómicos para el desarrollo individual, comunitario y al sector empresarial de producción de organismos acuáticos (Vega y Chong, 2006). Dentro del sistema de producción acuícola uno de los grupos que más importancia genera es el cultivo de crustáceos, principalmente por los beneficios que estos

proporcionan, ya sea de manera directa o indirecta, nutrimental y/o económica (Espinosa, *et al.*, 2011).

El cultivo de crustáceos es una actividad productiva en los países de Latinoamérica donde se ha potencializado el desarrollo económico (Sánchez y Álvarez, 2007). Durante la presente década el cultivo creció a una intensidad del 30% anual, donde el cultivo de langostinos tuvo un crecimiento muy acelerado en desarrollo en algunos países (Echeverry, 2012).

En México fue introducida la especie *Macrobrachium rosenbergii* la cual no fue exitosa, por la carencia de tecnología para la producción de postlarvas de langostinos que impiden su cultivo en México (Ortega y Arana, 2006). Sin embargo, en Brasil se llevó a cabo el cultivo exitoso de *M. amazonicum* que es una especie endémica del Amazonas en Brasil, el cual debe ser un ejemplo a seguir para México; en impulsar el desarrollo de la tecnología de cultivo de especies nativas como el *M. americanum*; la cual es una de las diez especies de langostinos para el pacífico con mayor potencial acuícola, debido a que alcanza las tallas más grandes dentro del género *Macrobrachium* y por ello tiene importancia económica en países como México, Guatemala, Salvador y Costa Rica (Rojo, 2009).

Dada la importancia ecológica y comercial de la pigua *M. americanum* es trascendental desarrollar su paquete tecnológico. En este sentido, el área de la nutrición es uno de los más importantes, esto se debe principalmente a los costos de operación siendo mayores al 60%, esencialmente por el aporte de proteína en la dieta (Madrid *et al.*, 2005; FAO, 2010; Toledo, 2012).

En este aspecto, el alimento para realizar las actividades acuícolas puede llegar a constituir un 50 a 70% de los costos totales de producción, siendo la proteína 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 (León, 2015). De esta manera, las enzimas digestivas, como las proteasas son de gran importancia ya que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos que forman la estructura primaria de las proteínas y están presentes en muchos organismos; por lo cual, los estudios de fisiología digestiva generan la información adecuada para la formulación de dietas, la cantidad de nutrientes y el tipo de harina a utilizar, a partir de la actividad enzimática presente en el sistema digestivo (Lazo *et al.*, 2007; Perales, 2009).

Las proteasas son esenciales, si se quiere entender sus tipos y modos de acción, así como el nivel de actividad que presentan, lo que determina las condiciones óptimas y estabilidad a factores como pH y temperatura; en el cual las enzimas alcanzan la mayor actividad y como son afectadas a lo largo del tiempo (Moyano, 2006). Los estudios de caracterización enzimática se han complementado con el uso de inhibidores específicos, en las técnicas bioquímicas y electroforéticas; los cuales afectan los centros activos y disminuyen la actividad enzimática, permitiendo con ello conocer la sensibilidad y los mecanismos de acción de las enzimas digestivas (Álvarez *et al.*, 2010). Por lo tanto, en el presente trabajo de investigación, se realizó la caracterización enzimática digestiva en adultos del langostino de agua dulce *M. americanum* a través de métodos de análisis bioquímicos, ya que existe poca información sobre la fisiología digestiva de estos organismos, con estos resultados se podrán realizar posteriores estudios de formulación y fabricación de dietas específicas para esta especie.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Biología de *Macrobrachium americanum*

La familia Palaemonidae, la cual incluye organismos conocidos como langostinos, se distribuye geográficamente en sistemas marinos, estuarios y dulceacuícolas (Hernández, 2008); se conocen aproximadamente 125 especies del género *Macrobrachium* de las cuales en México existen diez nativas y una exótica, este género representa una alternativa comercial en acuicultura a nivel nacional (Román, 1979; Hendrickx, 1995; Arroyo y Magaña, 2001; Luna *et al.*, 2007).

En América Latina el género *Macrobrachium*, presenta cuatro especies de importancia comercial; *M. carinus*, *M. acanthurus*, *M. americanum*, y *M. tenellum*, desarrollándose estudios de su ciclo biológico (Ponce *et al.*, 2002). Los camarones de agua dulce, conocidos como camarones de río. Así mismo estos organismos son cosmopolita, es decir, los encontramos en aguas dulces, salobres y marinas, donde migran a las desembocaduras de los ríos en temporada de reproducción (Espinosa, 1987).

El género *Macrobrachium* incluye a los crustáceos dulceacuícolas que presentan las siguientes características: rostro bien desarrollado, caparazón con espina hepática y antenal; ojos con pedúnculos y corneas negras; mandíbulas con palpos triarticulados; los dos primeros pares de apéndice toraxicos son quelados y el segundo es usualmente muy largo en los machos adultos; los tres apéndices posteriores presentan dactilos sencillos; el primer par de pleopodos del macho carece del apéndice interno y en el segundo (Figura 1), se aprecia el apéndice masculino; dos pares de espinas en la parte dorsal del telson y otros dos en el margen posterior (Holthuis, 1952; Acuña, 2002).

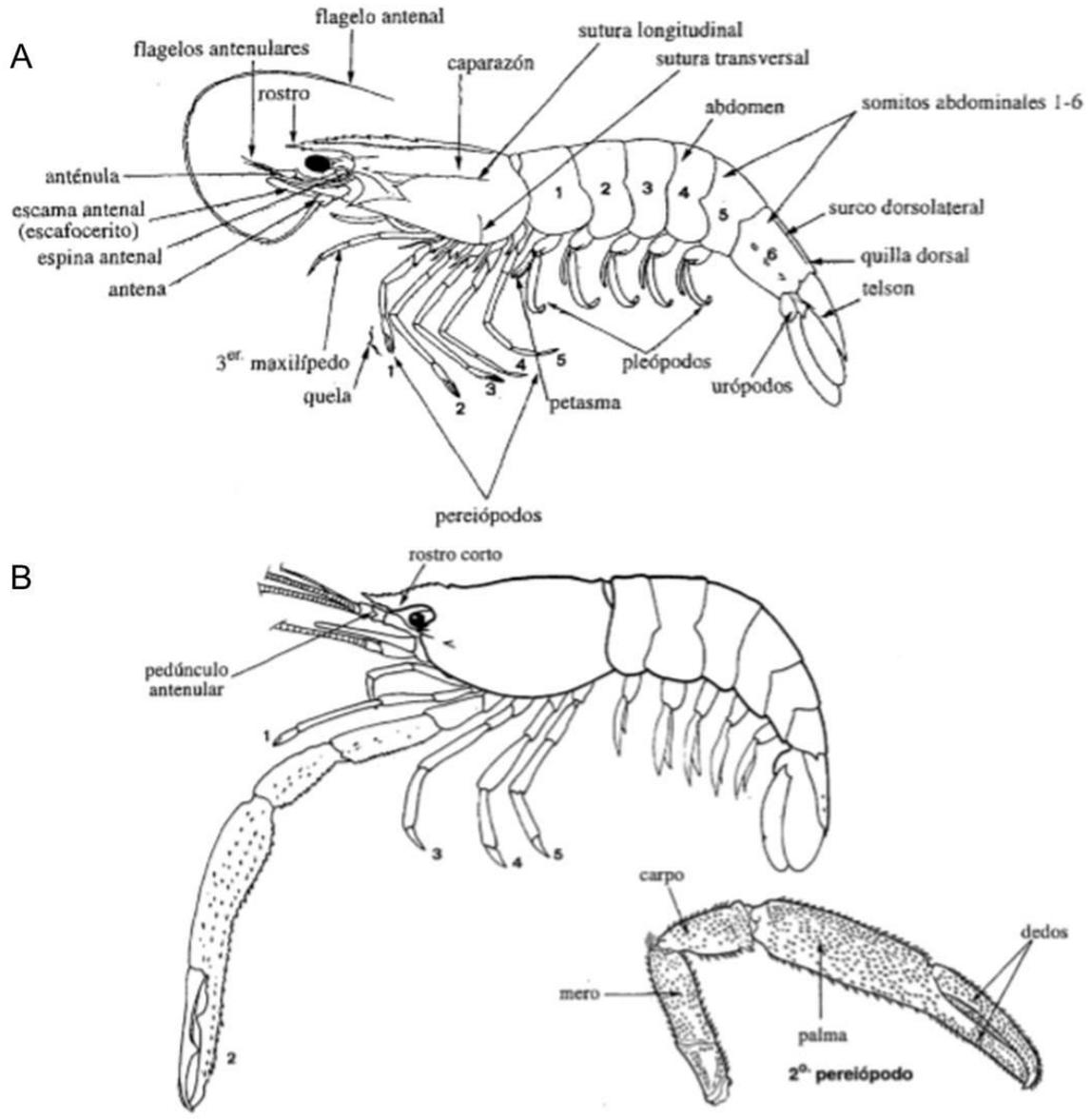


Figura 1. A) Anatomía general en *Macrobrachium*; B) Anatomía de *M. americanum* (Fischer *et al.*, 1995).

2.2 Taxonomía de *M. americanum* (Bate, 1868)

Reino: animalia

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Euarthropoda

Clase: *Malacostraca*

Subclase: *Eumalacostraca*

Superorden: *Eucarida*

Orden: *Decápoda*

Suborden: *Pleocyemata*

Infraorden: *Caridea*

Superfamilia: *Palaemonoidea*

Familia: *Palaemonidae*

Subfamilia: *Palaemoninae*

Género: *Macrobrachium*

Especie: *Macrobrachium americanum*

(Díaz *et al.*, 2001).

M. americanum cuenta con un rostro fuerte y arqueado en el margen de la órbita que alcanza el final del pedúnculo antenular. En el margen superior con 10 a 12 dientes, de los cuales tres o cuatro están colocados por detrás del margen orbital; borde ventral que presente de dos a cuatro dientes. Segundo par de periopodos simétricos, subyúgales en forma y tamaño, con espina en todos los artejos. El carpo es casi el doble de largo que alto y más corto que el mero. La palma es alargada, los dedos forman un hueco al cerrar y son ligeramente más

cortos que la palma. Presenta un diente fuerte en parte medio del d ctilo y otro en el primer tercio del dedo fijo (alternados) con dos a cuatros dentículos proximales (Hernández, 2007).

2.3 Ciclo de vida

Son considerados como dulceacuícolas, sin embargo su ciclo de vida se completa cuando las hembras ovígeras llegan a los estuarios a desovar en aguas salobres (Villalobos, 1982; De Bruyn *et al.*, 2003; Mossolini y Bueno, 2003). Existen ciertas excepciones, ya que algunas especies que habitan en ríos distantes del mar o donde los cauces no presentan comunicación con la zona litoral, han adaptado ciclos reproductivos restringidos al ambiente dulceacuícola.

2.4 Ritmos circadianos

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

III. ANTECEDENTES

3.1 Generalidad del langostino *M. americanum* en cultivo

El *M. americanum* es una de las especie con un gran potencial para su cultivo comercial, dado su gran tamaño y valor económico (Ponce *et al.*, 2002), aún no se han documentado estudios sobre su capacidad digestiva, por lo cual los estudios realizados en esta especie se han dedicado a conocer los atributos biológicos o ecológicos. La especie *M. americanum*, es una especie que puede alcanzar un gran tamaño (250 mm machos y 193 mm hembra) en el medio silvestre y su distribución natural comprende desde el norte de México hasta Perú (Hernández *et al.*, 2007).

En muchos países y en diversas ocasiones, se ha intentado cultivarlo y producirlo bajo un esquema económicamente productivo sin éxito y sin que exista alguna técnica confiable, sobre todo en la producción larval (García *et al.*, 2013). Con referencia a México, en 1992, la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, empezó a realizar investigación sobre las ventajas y desventajas para el cultivo *M. americanum* en comparación con la especie introducida *M. rosenbergii*. Mónaco en 1975 cultivó las larvas de *M. americanum* hasta obtener juveniles, cuya sobrevivencia fue considerablemente baja. McNamara *et al.* (1983) estudiaron el efecto de la salinidad en la tasa respiratoria, la sobrevivencia y la muda del primer estadio zoea, encontrando en ésta una reducida tolerancia a la salinidad. Arana y Ortega (2004) intentaron cultivarlo bajo condiciones controladas ofreciendo algunas ideas para su manejo en cautiverio.

El parasitismo sobre esta especie, particularmente por isópodos bopíridos, fue estudiado por Román (1993). Ruiz *et al.* (1996) estudiaron las relaciones morfométricas encontrando crecimiento mayor en machos, pero igual proporción en ambos sexos. García y Apun (2008) analizaron el efecto de la densidad y la presencia-ausencia de refugios en la sobrevivencia y crecimiento de juveniles

mantenidos en tinas, observando que los ejemplares mantenidos a baja densidad y con refugio disponible crecen mejor.

García y Hendrickx (2009) describieron que las hembras pueden desovar varias veces al año y producir miles de huevos en cada desove, que son portados bajo el abdomen durante su incubación. García (2010) estudió la composición proximal de los huevos incubados a diferentes temperaturas, encontrando los lípidos como el componente que se usa más como combustible y las proteínas como el más abundante. Gutiérrez (2010) desarrolló estudios comparativos morfométricos y de reproducción de *M. tenellum*, *M. panamensis* y *M. americanum*, especies de importancia pesquera. Sobre distribución y ecología, existe el trabajo de Villalobos *et al.* (2010), en la costa del Pacífico mexicano, que también incluye este género. García *et al.* (2011) estudiaron el consumo de oxígeno de especímenes, siendo la temperatura el factor determinante en su consumo. Echeverry (2012), estudió la evaluación de reproducción y desarrollo larval de camarón de río *M. americanum* en condiciones de laboratorio.

Hay estudios que han documentado sobre las enzimas digestivas el cual ha constituido un elemento clave en el entendimiento del sistema digestivo, y los requerimientos nutricionales en estadios específicos de desarrollo (Le Moullac *et al.*, 1996). Es así, que la nutrición enfocada a la caracterización de las enzimas digestivas, ha sido una de las áreas más estudiadas en la alimentación de crustáceos en general (Galgani y Nagayama, 1987; Fang y Lee, 1992; García *et al.*, 1994).

En algunas especies de langostas (*Panulirus* spp), los estudios se han enfocado a enzimas digestivas proteolíticas tales como tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas, leucina aminopeptidasas, elastasas y colagenasas (Brockerhoff *et al.*, 1970; Hoyle, 1973; Galgani y Nagayama, 1987; Glass y Stark, 1994,1995). De esta forma, en la langosta espinosa *Panulirus interruptus*, se encontró una variedad de proteasa sintetizadas por glándulas digestivas; muchas

de ellas catalizan la hidrólisis de sustratos naturales y artificiales a un pH alcalino; en estos organismos la tripsina es la proteasa más importante en la hidrólisis de proteínas del alimento seguida de la quimotripsina (Celis *et al.*, 2004).

Espinosa (2013), determinó la actividad enzimática digestiva del langostino *M. tenellum* y evaluar los factores que la afectan y su crecimiento bajo diferentes horarios de alimentación y niveles de proteína en dietas formuladas; así como, el establecer el cómputo químico de dichas dietas. Sacristán *et al.* (2013), estudio la influencia de la alimentación sobre el ritmo circadiano de las enzimas digestivas en el cultivo de juveniles de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae). Santos *et al.* (2017), determinaron el efecto del fotoperíodo y la temperatura sobre el crecimiento y la actividad de las enzimas digestivas en juveniles del camarón de río de brazo largo *Macrobrachium tenellum* (Smith, 1871) (Caridea: Palaemonidae). Manríquez *et al.* (2018), describieron la caracterización de enzimas digestivas en adultos de la pigua *M. carcinus* y la digestibilidad *in vitro* de algunos ingredientes utilizados en su alimentación que fomentará la formulación de dietas.

3.2 Análisis bioquímicos del langostino *M. americanum*

3.2.1 Sistema digestivo de los crustáceos

El aparato digestivo del *Macrobrachium* es el sistema de órganos más voluminoso de la cavidad del cuerpo y está constituido por tres secciones: intestino anterior (esófago y estómago), intestino medio (canal del intestino medio y hepatopáncreas) e intestino posterior. Después de pasar por la boca, los alimentos pasan por el esófago y luego al estómago, en donde se distingue dos partes principales, el cardias y píloro. En la primera se lleva a cabo la molienda de los alimentos, las partículas del alimento suficientemente pequeñas pasan al saco pilórico y son filtradas por sedas muy cerradas, pasando luego a la glándula del intestino medio o hepatopáncreas (Cruz, 1994; Vogt, 2002).

El hepatopáncreas sintetiza las enzimas digestivas y emulsifica los lípidos, metaboliza nutrientes y los almacena (Jussila, 1997), dentro de los hepatopáncreas existen estructuras que se pueden distinguir cuatro tipos de células, conocidas como células F, E, R y B; (Gibson y Baker, 1979; Cruz, 1994).

- ❖ Las células B o secretoras, tienen grandes vacuolas con material acidofílico y presentan diversos mecanismos de secreción.
- ❖ Las células R o de absorción captan los nutrientes en la luz de los túbulos y sintetizan glucógeno y lípidos.
- ❖ Las células F o fibrilares, sintetizan las enzimas digestivas y las mantienen de reserva en una vacuola supranuclear.
- ❖ Células E o embrionario, son de núcleo proximal sin borde en cepillo y con muchas figuras mitóticas en su estado normal.

Pero el intestino posterior se localiza en la porción superior del músculo abdominal y es de consistencia quitinosa. A su vez el intestino posterior es el transporte de heces al exterior, además de funciones asociadas con la osmorregulación (Vogt, 2002).

3.3 Enzimas digestivas

Las enzimas son catalizadores biológicos que aumentan la rapidez o la velocidad de una reacción, sin verse alterada ella misma en el proceso global. La mayor parte de los catalizadores biológicos son proteínas, las cuales se han clasificado por parte de la Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica en seis grandes grupos (Lehninger, 1984; Mathes y van Holde, 1998; Perales, 2009; Toledo, 2013):

- ❖ Óxido reductasas: catalizan las reacciones de oxidación-reducción.
- ❖ Transferasas: catalizan las transferencias de grupos funcionales de una molécula a otra.

- ❖ Liasas: catalizan las eliminaciones de un grupo o adiciones a un grupo de un doble enlace, u otras rupturas que implican un reordenamiento electrónico.
- ❖ Isomerasas: catalizan los reordenamientos intramoleculares.
- ❖ Ligasas: catalizan las reacciones en las que se unen dos moléculas.
- ❖ Hidrolasas. catalizan las rupturas hidrolíticas.

La mayoría de las enzimas digestivas pertenecen al grupo seis y se dividen en grupos de acuerdo con la función del nutriente que hidrolizan:

3.3.1 Proteasas

Son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos que forman la estructura primaria de las proteínas, presentan en muchos organismos (Dixon y Webb, 1979; Álvarez, 2003). Se dividen en dos subgrupos: las exopeptidasas, que hidrolizan enlaces peptídicos entre aminoácidos terminales y las endopeptidasas, que hidrolizan enlaces peptídicos internos (Mathews y van Holde, 1998).

3.3.2 Amilasas

Las amilasas catalizan la hidrólisis del enlace α 1-4 del almidón y glucógeno. Se divide en alfa (α) y beta (β), o endo y exo amilasas. La α -amilasas está presente en el jugo pancreático de gran cantidad de animales (Archibal, 1987), ya que hidroliza indistintamente enlaces a largo de la cadena del polímero hidrocarbonado, liberando moléculas de glucosa y maltosa. Por su parte la β -amilasa hidroliza a los carbohidratos por el extremo no reductor, y se restringen exclusivamente al reino vegetal (Hirikado *et al.*, 1994).

3.3.3 Lipasas

Las lipasas son enzimas que han sido clasificadas en dos tipos principales:

- ❖ Las esterasas, que preferentemente actúan sobre ésteres simples de ácidos grasos con bajo peso molecular que tiene una cierta capacidad de solubilizarse.
- ❖ Las lipasas verdaderas, que se distinguen porque hidrolizan sustrato soluble, estas se han descrito en varios tejidos animales (páncreas, plasma sanguíneo, saliva y jugo pancreático).

3.3.4 Fosfatasas ácida y alcalina

Las fosfatasas ácidas y alcalinas catalizan la separación de fósforo inorgánico a partir de fósforos orgánicos. Se encuentran en los epitelios intestinales y en diferentes cepas tisulares del estómago. Su papel fisiológico en los vertebrados superiores está relacionado con los procesos de mineralización de los huesos (Harris, 1989). Así como en procesos de transporte de nutrientes a través de membrana, tales fosfatasas se asocian con el transporte activo de glucosa, proteína y lípidos, e incluso de agua e iones en el caso de la fosfatasa alcalina (Duppuis *et al.*, 1991).

3.4 Estudios de caracterización enzimática

El estudio de las enzimas puede realizarse a través de parámetros operacionales, como el pH y la temperatura, y por la acción de sustancias específicas para comprender su modo de acción (Álvarez, 2003). Los estudios de caracterización de las distintas enzimas digestivas son esenciales si se quiere entender el tipo y modo de acción, así como el nivel de actividad que representan, la caracterización, se pueden realizar por diversos ensayos: efecto del pH, temperatura y mediante inhibidores específicos.

3.4.1 Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de la enzima

Las enzimas en general requieren un pH característico, donde la actividad es máxima y sus centros activos presentan una adecuada conformación iónica para llevar a cabo la catálisis con eficiencia. En soluciones muy ácidas o alcalinas las enzimas están fuera del intervalo de pH fisiológico u óptimo, y la estabilidad de la enzima puede afectar la conformación secundaria, terciaria y/o cuaternaria sufriendo desnaturalización irreversible en soluciones muy ácidas o alcalinas (Ásgeirsson *et al.*, 1995).

3.4.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la enzima

La temperatura es una variable que influye directamente sobre la enzima, aumenta la actividad enzimática cuando la temperatura se incrementa, de igual manera la enzima pierde actividad por desnaturalización térmica fuera del intervalo de operación, ya que al absorber demasiada energía, los enlaces no covalentes, que mantienen la estructura terciaria se rompen y la enzima se desnaturaliza (Álvarez, 2003). La temperatura óptima es aquella en la cual la enzima muestra alta actividad y estabilidad a través del tiempo.

3.4.3 Caracterización mediante inhibidores específicos

Los inhibidores son compuestos que disminuyen la actividad de muchas enzimas (Stryer, 2003). El uso de inhibidores específicos es una herramienta importante para la caracterización enzimática, ya que éstos se unen a la enzima la inactivan, y disminuyen la tasa de hidrólisis del sustrato (Salvensen y Nagase, 1989). En el caso específico de las proteasas, existen al menos dos grupos de inhibidores que varían en función del mecanismo químico de catálisis: los que forman complejos covalentes entre el sitio activo de la enzima y el lugar de enlace con el sustrato (grupo serina y cisteína); y los que no forman enlaces covalentes (ácidas y metal proteasas) (García, 1992).

Esta diferencia permite que las enzimas del primer grupo posean aminoácidos fuertemente nucleofílicos en su centro activo, por lo que sus inhibidores deberán poseer grupos altamente nucleofílicos que incluyan dobles enlaces. Las otras proteasas realizan una catálisis más del tipo ácido/base sobre una molécula de agua, de forma que la catálisis carece del carácter nucleofílico. Los quelantes (ácido etilendiamintetraacético (EDTA) y 1,10 fenantrolina) no se consideran en esta clasificación como inhibidores, ya que son inactivadores porque solo eliminan ciertos iones (Ca^+ , Zn^+ y Mg^+) que son esenciales para la activación de metal proteasas (García, 1992); sin embargo, se utilizan con propósitos prácticos en la determinación del mecanismo de acción de las proteasas. Existen distintos tipos de inhibidores, con especificidad y mecanismo de acción.

3.5 Utilización de técnicas electroforéticas

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida, incluida SDS-PAGE (electroforesis en presencia de duodecil sulfato sódico), es una herramienta bioquímica empleada en varias funciones como: en estudios de caracterización de proteínas (Laemmli, 1970) y detección de actividad enzimática (García *et al.*, 1993).

La electroforesis de macromoléculas, se realiza con una pequeña cantidad de muestra en una solución estabilizada en una matriz porosa bajo la influencia de un voltaje determinado. Al final del proceso, las diferentes especies moleculares se observan como bandas en diferentes posiciones de la matriz (Andrews, 1995). Adicionalmente, se puede determinar mediante electroforesis el mecanismo de acción de las enzimas utilizando inhibidores específicos (García *et al.*, 1993).

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Caracterizar las enzimas digestivas en adultos de la pigua *M. americanum* evaluando la actividad enzimática, condiciones óptimas y grado de inhibición.

4.2 Objetivos específicos

- ❖ Determinar las actividades específicas de proteasa alcalinas, lipasas, amilasas y fosfatasas en presentes enzimas de la pigua *M. americanum* en etapa adulto.
- ❖ Determinar el valor óptimo de las condiciones ambientales (pH y temperatura) e inhibidores por medio de pruebas específicas sobre los extractos multienzimáticos de la pigua *M. americanum*.
- ❖ Caracterizar la actividad enzimática a través de análisis electroforéticos sobre las proteasas presentes en los extractos multienzimático de la pigua *M. americanum*.

V. MÉTODOS

Los trabajos de laboratorio y experimentación se llevaron a cabo en el Laboratorio de Nutrición y Producción Acuícola, en el Centro de Investigación Costeras (CEICO) (Figura 2) del Instituto de Biología de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.



Figura 2. Instalaciones Centro de Investigaciones Costeras (CEICO).

5.1 Obtención de ejemplares

Para el material biológico se utilizaron cinco hembras y cinco machos adultos de langostino, de un lote de cincuenta organismos, capturados del río Coapa, en el municipio de Pijijiapan, Chiapas, México., fueron transportados al Laboratorio de Acuicultura del CEICO, UNICACH.

5.2 Obtención de extracto enzimático

Los ejemplares de *M. americanum* se mantuvieron en ayunas por 24 hrs; posteriormente fueron sacrificados por *shock* térmico (Figura 3). Se mantuvieron en hielo hasta el procesado.

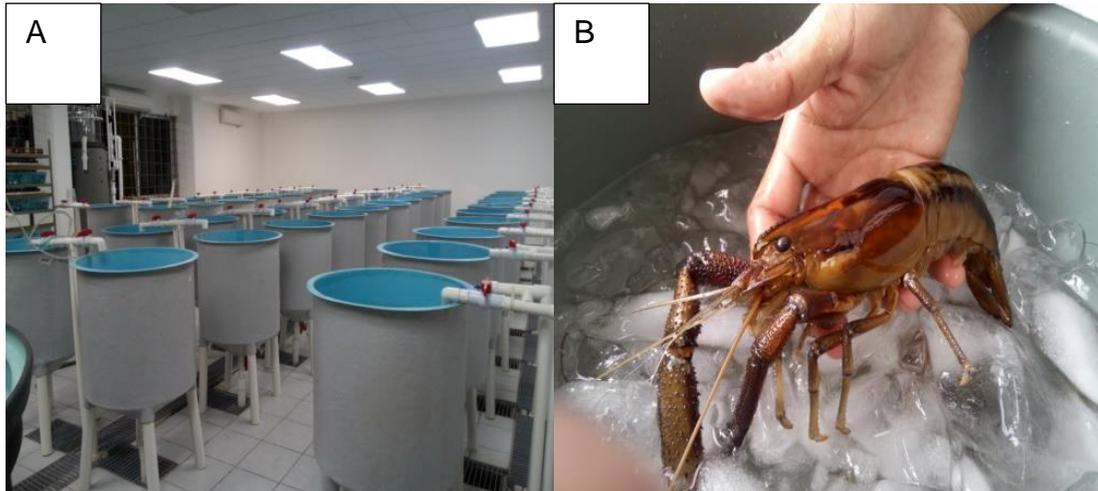


Figura 3. *M. americanum*: A) sistema donde se mantuvieron los ejemplares; B) Sacrificio mediante *shock* térmico.

A continuación se disectaron por la parte cefálica para obtener la sección de hepatopáncreas realizando posteriormente un *pool* enzimático, se homogenizaron con agua milli-Q (1:10 peso/volumen), se utilizó un homogenizador de tejido marca Misonix (modelo Microson Ultrasonic Cell Disruptor, NY). Las muestras se centrifugaron a 16,000 rpm durante 30 min a 4 °C, el sobrenadante se almaceno en tubos marca eppendorf y se conservaron en refrigeración a -20 °C (Figura 4).

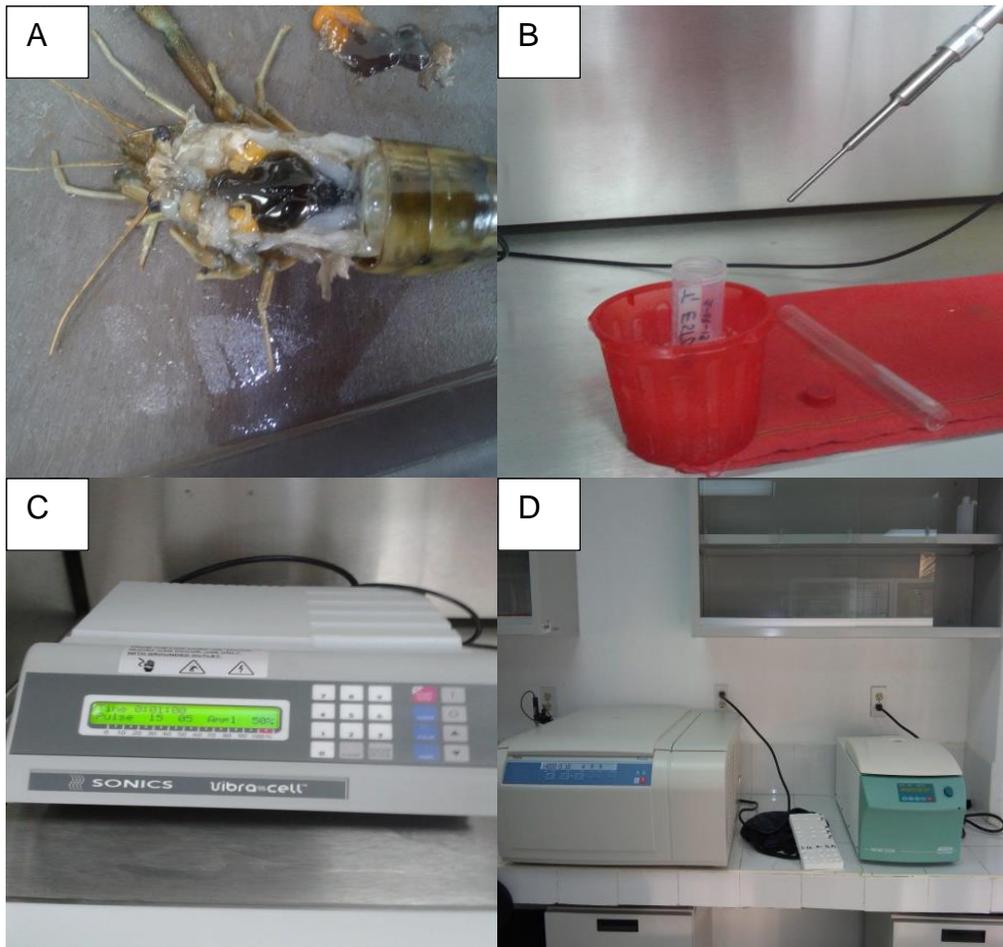


Figura 4. Preparación de extractos multienzimáticos: A) Extracción de hepatopáncreas; B) Homogenizado de tejido; C) Sonificador; D) Centrifugas.

5.3 Determinación de la proteína soluble

La concentración de proteína soluble en los extractos se determinó por el Método de Bradford (Bradford, 1976), usando como estándar una curva patrón de albúmina sérica bovina a razón de 1 mg/ml^{-1} . Para llevar a cabo el análisis se realizó en una microplaca (marca BRAND *plates*), se agregaron $25 \mu\text{l}$ de extracto, con una dilución de 25:1 y $225 \mu\text{l}$ del reactivo Bradford, la lectura de la microplaca se realizó en un MULTISKAN FC (Thermo SCIENTIFIC) previamente programado para agitar durante 30 segundos y realizar lecturas de Abs a 620 nm cada 15 seg, durante 5 min, las pruebas se realizaron por triplicado.

5.4 Identificación de actividades específicas

5.4.1 Actividad de proteasas

5.4.1.1 Alcalina

Se calculó en función de las siguientes técnicas: Se realizó por el método de Kunitz (1947) modificado por Walter (1984), usando como sustrato caseína Hammerstein al 1% en tampón 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂ a pH 9. Utilizando 20 µl extracto enzimático en donde se incubó a 37 °C durante 120 min; la reacción se detuvo por adición de 0.5 ml de Ácido tricloroacético al 20% (TCA). Después de reposar la mezcla de reacción a 4 °C (15 a 30 min), se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 min. En el sobrenadante, se midió la cantidad de tirosina liberada (ABS 280 nm) mediante un espectrofotómetro UV/visible. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 mg de tirosina por minuto. Para determinar el coeficiente de extinción molar de la tirosina, se realizó un recta patrón con diferentes concentraciones de tirosina (de 0 a 300 mg/ml⁻¹). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5.4.1.2 Tripsina

Esta prueba se utilizó la técnica descrita por Erlanger *et al.* (1961). Se colocó en una microplaca (marca BRAND *plates*) utilizando 5 pozos (2 de blanco y tres de réplica): se colocó 10 µl de extracto (en las réplicas se colocó extracto y en los blancos fue agua destilada), 167 µl de Tris-HCl (60 mM, pH 7.5), 10 µl CaCl₂ (192 mM, en Tris.HCl, pH 7.5), 5 µl de BAPNA (N α -Benzoil-DL-Arginina-P-Nitroanilida a 19.2mM). Posteriormente la microplaca se introdujo en un MULTISKAN FC (marca Thermo SCIENTIFIC), previamente programado para agitar durante 30 segundos y realizar lecturas de Abs a 405 nm cada 15 seg, durante 30 min.

5.4.1.3 Quimotripsina

Para esta actividad se implementó la técnica descrita por Delmar *et al.* (1979). Se colocó en una microplaca (marca BRAND *plates*) utilizando 5 pozos (2 de blanco y

tres de réplica): en los cuales se colocaron 10 µl de extracto (en las réplicas colocó extracto y en los blancos agua destilada), 167 µl de Tris-HCl (60 mM, pH 7.5), 10 µl CaCl₂ (192 mM, en Tris.HCl, pH 7.5), 5 µl de SAAPNA (N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide, a 19.2 mM). Posteriormente la placa se introdujo en un MULTISKAN FC (marca Thermo SCIENTIFIC), previamente programado para agitar durante 30 segundos y realizar las lecturas de Abs a 405 nm cada 15 seg, durante 30 min.

5.4.1.4 Leucina aminopeptidasa

Se determinó por el método de Maraux (1973), utilizando como sustrato Leucina p-nitroanilida (0.1 mmol). El sustrato se disolvió en 200 ml de DMSO y se aforó con 10 ml del buffer (fosfato sódico 50 mM, pH 7.2). La reacción se inicia con 4 µl de extracto en 0.980 ml de sustrato, se incubó por 60 min a 37 °C. Se detuvo la reacción con 0.250 ml de ácido acético 30 % y se leyó a 410 nm. Una unidad de actividad es 1 mM de alanina p-nitroanilida liberada por minuto, usando como coeficiente de extinción molar 8.2. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5.4.1.5 Carboxipeptidasa A

Se determina por el método de Folk y Schirmer (1963), utilizando como sustrato Hippuryl-L-phenylalanine (1 mM). El sustrato se disolvió en 10 ml de buffer (25 Mm Tris, 0.5 M NaCl, pH 7.5). La reacción se inicia con la adición de 5 µl de extracto enzimático, se detiene después de 6 min y la actividad fue leída a 254 nm. Una unidad de actividad enzimática se define como 1 mM de hippuryl-L-phenilalanina hidrolizado por minuto, se utiliza como coeficiente de extinción molar 19.4. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

5.4.2 Actividad de lipasas

Se realizó a través del método de Versaw *et al.* (1989), en el cual a 0.2 ml de taurcolato de sodio (100 mM disuelto en agua destilada) y a 1.9 ml de buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7.2), se le agrega 10 µl de extracto enzimático, se pre-incubó

por 5 min a 35 °C y se inició la reacción con 20 µl de β-naftilcaprilato (100 Mm en DMSO) por 15 min a 35 °C; Se le agrega 20 µl de fastblue (100 Mm en DMSO) y se incuba por 5 min a 35 °C. Se detuvo la reacción con 200 µl de TCA (0.72 N al 12 %), y se clarifica la reacción con 2.71 ml de etanol-acetato de etilo (1:1 v/v). Se agitó en el vortex y se lee la absorbancia a 540 nm en cubetas de cuarzo. Una unidad de actividad fue definida como la liberación de 1 µg de naftol por minuto evaluada a 540 nm. Utilizando el coeficiente de extinción molar 0.2.

5.4.3 Actividad de amilasas

La actividad α-amilasa (α1-4 glucán 4-glucanohidrolasa), de los extractos se valoró incubando a 250 °C de la siguiente forma: 4 µl de extracto (dilución 80:1), con 0.125 ml de almidón soluble 1 % (p/v) en 0.125 ml de tampón 0.1 M citrato-fosfato pH 7.0. Después de 5 min de incubación, se midió los azúcares reductores a 600 nm usando el procedimiento descrito por Robyt y Whelan (1968). Para determinar el coeficiente de extinción molar de la maltosa, se construye una curva patrón con distintas concentraciones de maltosa. Se define una unidad como la cantidad de enzima que libera 1 mg de maltosa por minuto.

5.4.4 Actividad de las fosfatasas alcalinas

Se experimentó utilizando como sustrato 4 nitrofenilfosfato. Para ello se incubó 10 µl de extracto enzimático (dilución 7:1), con 10 µl de 4 nitrofenilfosfato al 2% en tampón glicina NaOH 0.1 N a pH 10.1. Después de 30 min de incubación a 37 °C se detiene la reacción con NaOH 0.05 N y se mide la absorbancia a 405 nm. La hidrólisis del sustrato por las fosfatasas libera el grupo 4-nitrofenol que produce un intenso color amarillo. Se define una unidad como la cantidad de enzima que produce un ABS 405 nm de 0.01. Descrita por (Begmeyer 1974).

La actividad del extracto se determinó utilizando las siguientes ecuaciones:

Ecuación 1. Cálculo de la actividad en unidades por ml.

$$\text{Unidad / ml} = \frac{\Delta_{\text{abs}} \times \text{volumen final reacción (ml)}}{\text{CEM} \times \text{tiempo (min)} \times \text{volumen extracto (ml)}}$$

Siendo:

Δ_{abs} : el incremento de absorbancia a una determinada longitud de onda Volumen

final_{reacción}: el volumen final de la reacción

CEM: el coeficiente de extinción molar del producto obtenido calculado de la recta de regresión ($\text{ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Ecuación 2. Cálculo de la actividad de unidades por ml

$$\text{Unidades / mg proteína soluble} = \frac{\text{unidades ml}^{-1}}{\text{mg proteína soluble ml}^{-1}} =$$

Ecuación 3. Cálculo de la actividad en unidades de actividad enzimática por

Adulto

$$\text{Unidades /adulto} = \frac{\text{unidades ml}^{-1}}{\text{No. adulto ml}^{-1}}$$

5.4.5 Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de proteasas alcalinas

El efecto del pH sobre la actividad proteasa alcalina se determinó en los extractos enzimáticos de los langostinos adultos. Para la determinación de las proteasas alcalinas; se utilizó como sustrato caseína (1 %) (pH 8 al 12), usando hemoglobina (1%) (pH 2 al 6) como sustrato y sustituyendo las soluciones amortiguadoras Tris-HCl 50 mM, CaCl_2 20 mM, pH 7.5 y 100 mM Glicina-HCl, pH 2.0, tamponada de pH 2 al 12 con tampón universal (Stauffer, 1989). Todos estos ensayos se realizaron por triplicado. El efecto del pH sobre la estabilidad de la actividad proteasa alcalina se determinó pre-incubando el extracto a diferente pH (2, 3, 4, 5,

6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12) durante 0, 30, 60 y 90 min, a 37 °C y después se añadió 500 µl de caseína disuelta en buffer pH 9, se incubó durante 120 min y posteriormente se detiene la reacción con 0.5 ml de Ácido tricloroacético al 20% (TCA), dejar reposar las muestras en un congelador a 4 °C (15 a 30 min), se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 min para después leer la absorbancia a 280 nm. La actividad residual se cuantificó a intervalos regulares con respecto a un control sin pre-incubar.

5.4.6 Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de proteasas alcalinas

Para determinar la influencia de la temperatura sobre la actividad de la proteasa alcalina, se incubaron los extractos enzimáticos de los langostinos adultos en caseína (1 %), estabilizándolos durante 120 min a temperaturas crecientes (15, 25, 35, 45, 55, 65 75 °C). La reacción se inició por la adición del extracto. Todos estos ensayos se realizaron por triplicado. La influencia de la temperatura sobre la estabilidad de la actividad enzimática, se determinó pre-incubando el extracto a temperatura creciente (15, 25, 35, 45, 55 65 y 75 °C) durante 0, 30, 60 y 90 min. Después de la pre-incubación se determinó la actividad a intervalos de tiempo regulares, donde se añadió 500 µl de caseína disuelta en buffer pH 9, se incubó durante 120 min y se detiene la reacción con 0.5 ml de Ácido tricloroacético al 20% (TCA), dejar reposar las muestras en un congelador a 4 °C (15 a 30 min), se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 min para después leer la absorbancia a 280 nm. A continuación, se determinó la actividad residual frente a un control sin pre-incubar (Stauffer, 1989).

5.4.7 Estudios de inhibición enzimática

La caracterización del mecanismo de acción enzimática de las distintas enzimas que componen los extractos del langostino *M. americanum*, se realizaron de acuerdo con el método descrito por Dunn (1989). Para la caracterización de la actividad proteasa alcalina, se incubó 20 µl de extracto con 20 µl de cada

inhibidor, Fenil-metil-sufonil fluoruro PMSF, Inhibidor trípico de la soya SBT1, Tosil fenilalaninclorometil cetona TPCK, Tosil-lisin-cetona TLCK, fenantrolina y ovoalbúmina y el inactivador quelante EDTA, se mezcló 500 µl de buffer (Tris-HCl 100 mM + CaCl₂ 10 mM pH 9.9). La mezcla fue pre-incubada durante 60 min a 37 °C, a continuación, se añadió a la mezcla de reacción 500 µl de caseína (1 %, pH 9) y se incubó durante 120 min a 37 °C, después de ese tiempo la reacción se detuvo adicionando 0.5 ml de TCA, la mezcla se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 min a 4 °C y la absorbancia fue leída a 280 nm. La actividad se expresó como el porcentaje de inhibición respecto a un control de actividad sin inhibidores (100 % de actividad). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5.4.8 Estudios de inhibición por técnicas electroforéticas para proteasas alcalinas

El estudio de proteasas se complementó mediante electroforesis SDS-PAGE y el uso de inhibidores. Se estudió la evolución de las proteasas alcalinas con objetivo de cuantificar el número de bandas caseinolíticas, así como su masa molecular, además de establecer los tipos de proteasas que componen los extractos. Para esto se incubó el extracto enzimático del langostino *M. americanum* (20 µl) con 5 µl de cada uno de los inhibidores antes descritos durante 120 min para después tomar 25 µl de la mezcla y realizar la electroforesis bajo las mismas condiciones (SDS-PAGE). La electroforesis se realizó en presencia de lauril duodecil sulfato sódico (SDS), en condiciones desnaturalizantes, empleando un sistema discontinuo (gel almacenador preparativo y gel separador resolutivo), de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli (1970) y adaptada por García-Carreño *et al.* (1993). La electroforesis se llevó a cabo en la cubeta Mini PROTEAN® II (Bio-Rad) con 2 placas de geles verticales de 8x10x0.075 cm con capacidad para 10 muestras por electroforesis. Cada placa estuvo compuesta por dos tipos de gel; un gel almacenador con 4 % de poliacrilamida (PAA) y un gel separador con poliacrilamida al 12 %. Para el cálculo del peso molecular se utilizó un marcador de bajo intervalo (LRMWM, SIGMA, M-3913), además del programa Quality One V. 4.6.5 (Hercules, CA, USA).

VI. RESULTADOS

6.1 Determinación de la proteína soluble

En los extractos de *M. americanum* adultos, la concentración de proteína soluble (mg/ml) se mantuvo constante a lo largo del tiempo. El promedio de proteína soluble fue de 18.92 ± 1.05 mg/ml.

6.2 Caracterización de actividades específicas

La actividad de proteasas digestivas en *M. americanum* resultó con mayor actividad específica de amilasa, que fue 3205 ± 51 u/mg de proteína (Tabla 1), mientras que la actividad específica de lipasa se redujo, siendo un valor de 39.3 ± 4.4 u/mg de proteína, donde el valor más bajo de la actividad se presentó en la quimotripsina fue 0.00016 ± 0.00019 u/mg de proteína.

Tabla 1. Actividad de enzimas digestivas (Promedio \pm desvest) de adultos de *M. americanum*.

Enzimas	U/ml	U/individuo	U/mg de proteína
Proteasa alcalina	42.15 ± 2.26	7.02 ± 0.37	2.22 ± 0.11
Tripsina	0.004 ± 0.001	0.058 ± 0.012	0.00022 ± 4.90
Quimotripsina	0.003 ± 0.003	0.043 ± 0.050	0.00016 ± 0.00019
Carboxipeptidasa	0.653 ± 0.252	0.108 ± 0.042	0.034 ± 0.013
Leucina aminopeptidasa	0.25 ± 0.01	0.042 ± 0.001	0.013 ± 0.0
Lipasa	743.6 ± 84.84	123.9 ± 14.14	39.3 ± 4.4
α -amilasa	6064 ± 96	1010 ± 16	3205 ± 51
Fosfatasa alcalina	250.1 ± 7.5	41.6 ± 1.26	13.2 ± 0.40

6.3 Efecto del pH sobre la Actividad y estabilidad de proteasas alcalinas

6.3.1 pH óptimo

De acuerdo al análisis de determinación de pH se muestra que la máxima actividad de las proteasas se presentan a pH 11 (Figura 5), mostrando una actividad de 4.42 ± 0.10 U/mg de proteína en relación con el pH de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 y 12 respectivamente.

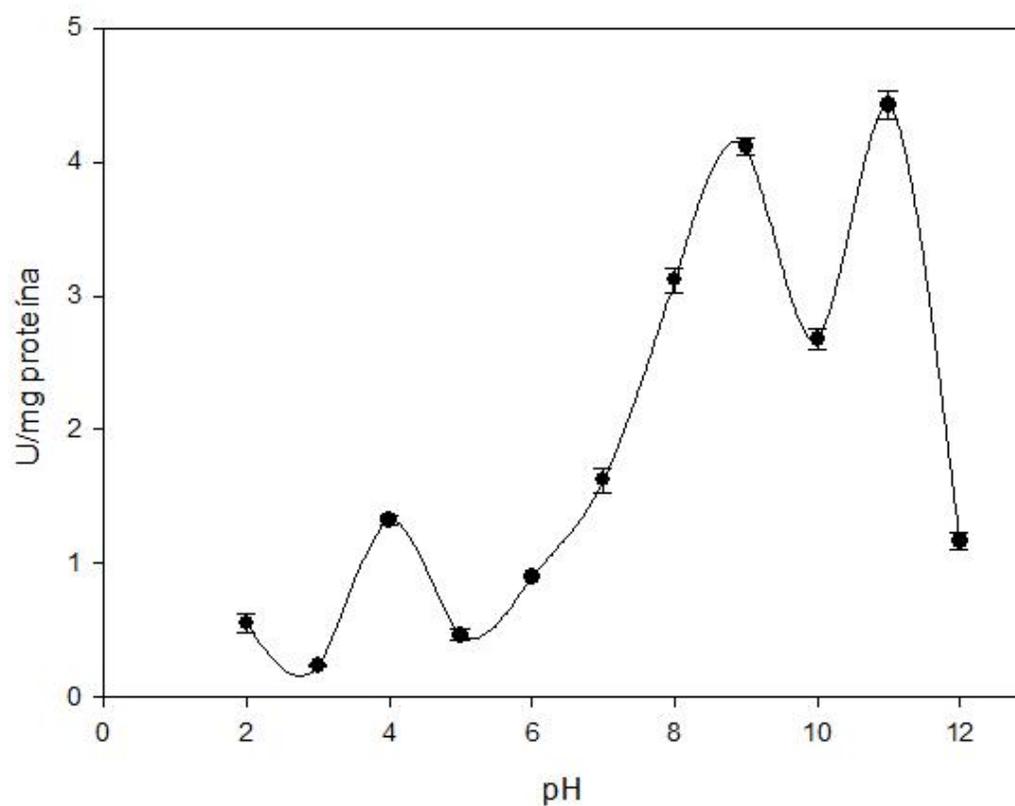


Figura 5. Efecto del pH sobre la actividad de proteasas alcalinas de los extractos de adultos *M. americanum*.

6.3.2 Estabilidad de pH

Las proteasas alcalinas mostraron baja actividad a pH de 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 10 donde su actividad residual es por debajo del 100% (Figura 6), a pH 3 empieza subir a los 90 min de pre-incubación la actividad; pero la actividad del pH 12 se estabiliza después de los 60 min de pre-incubación, la actividad de las proteasas alcalinas en los pH 9 y 11 solo se mantuvo a los 60 min de pre-incubación respectivamente.

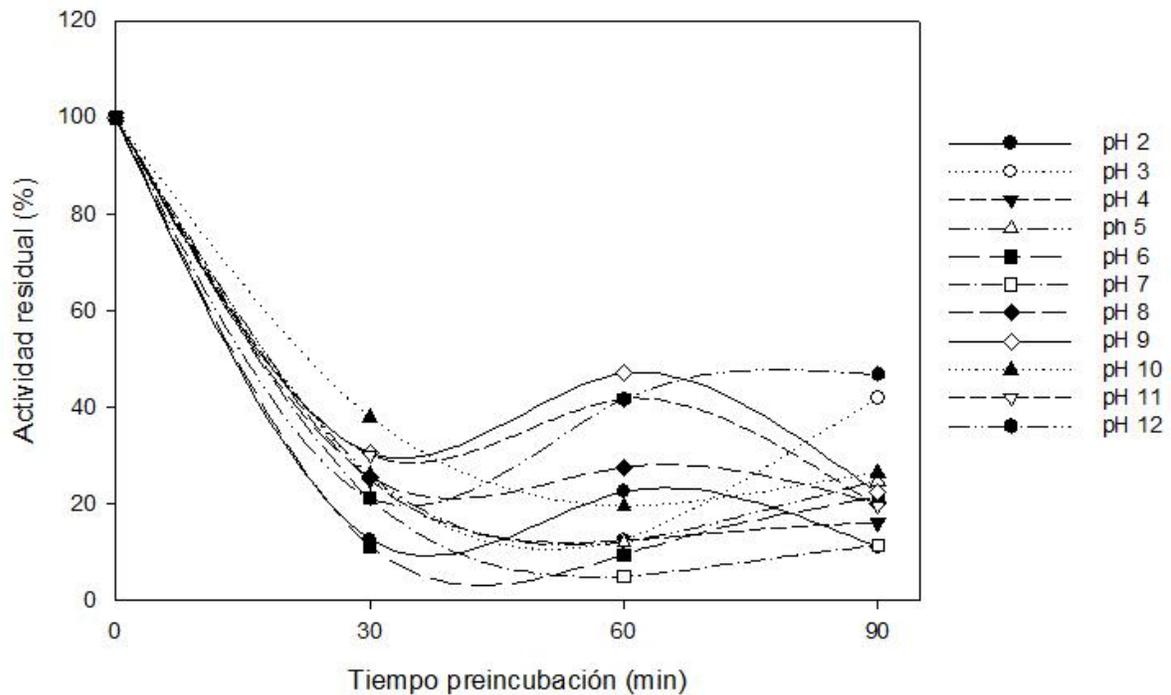


Figura 6. Estabilidad de proteasas alcalinas a diferentes pH y con tres tiempos de pre-incubación de los extractos enzimáticos en adultos de *M. americanum*.

6.4 Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de proteasas alcalinas

6.4.1 Temperatura óptima

La temperatura óptima para la actividad de las proteasas alcalinas se detectó a 35 °C alcanzando su máxima actividad con 2.11 U/mg proteína; sin embargo, se observó que a la actividad proteásica disminuye después de los 65 °C de incubación (Figura 7).

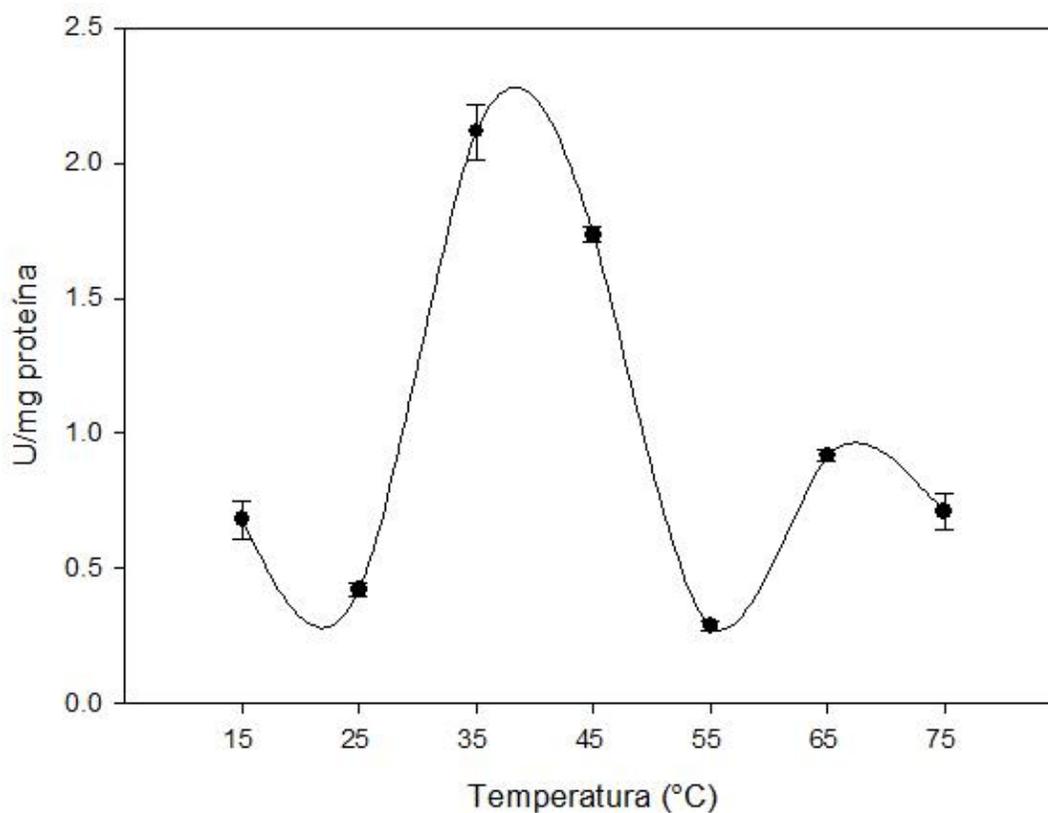


Figura 7. Efecto de la temperatura sobre la actividad de proteasas alcalinas de los extractos de adultos de *M. americanum*.

6.4.2 Estabilidad de temperatura

Los estudios de estabilidad a diferente tiempo y temperatura de pre-incubación, mostraron que las proteasas alcalinas no son muy estables a 45 °C con 30, 60 y 90 min de pre-incubación; sin embargo a 55 °C logran ser estables después de 30 min de pre-incubación (Figura 8).

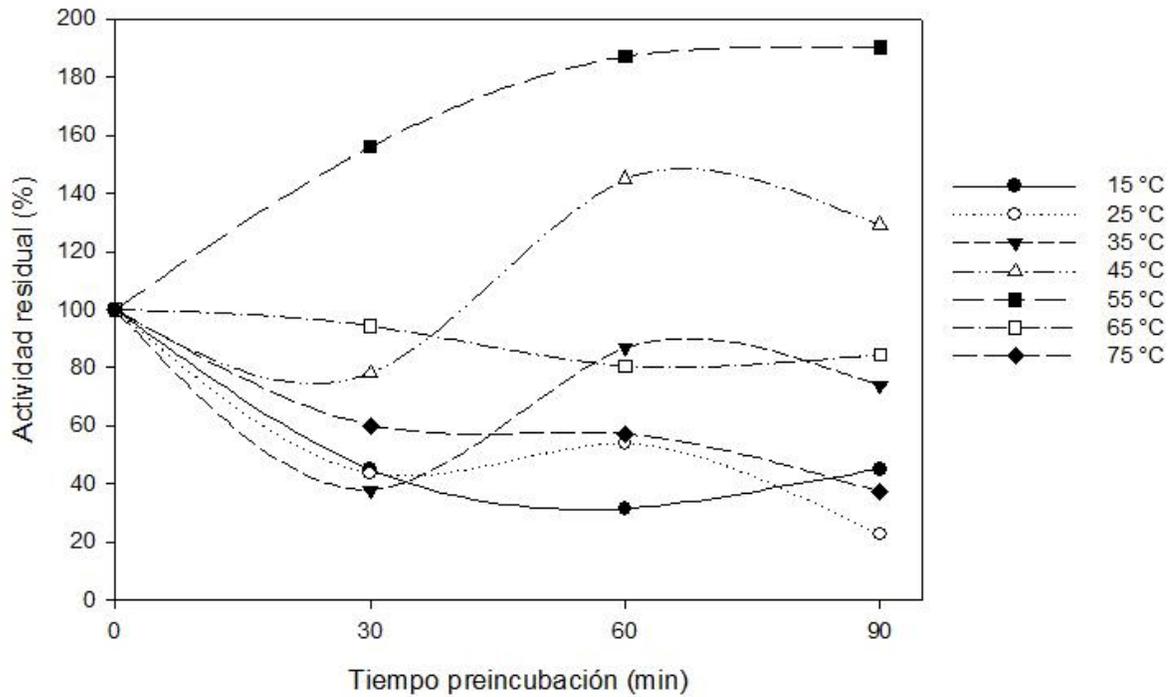


Figura 8. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de proteasas alcalinas de los extractos de adultos de *M. americanum*.

6.5 Estudios de inhibición enzimática

Los inhibidores para la actividad de las proteasas alcalinas muestran una inhibición mayor al 30% para Fenantrolina y el EDTA, el cual son inhibidores metal-proteasas, para TPCK es un inhibidor específico de quimotripsina, para TLCK que es un inhibidor específico de tripsina. Mientras que para Ovoalbúmina y SBT1 los cuales inhiben serina-proteasas, y el PMSF, es un inhibidor general de serina-proteasa, presentan una inhibición al 42% (Figura 9).

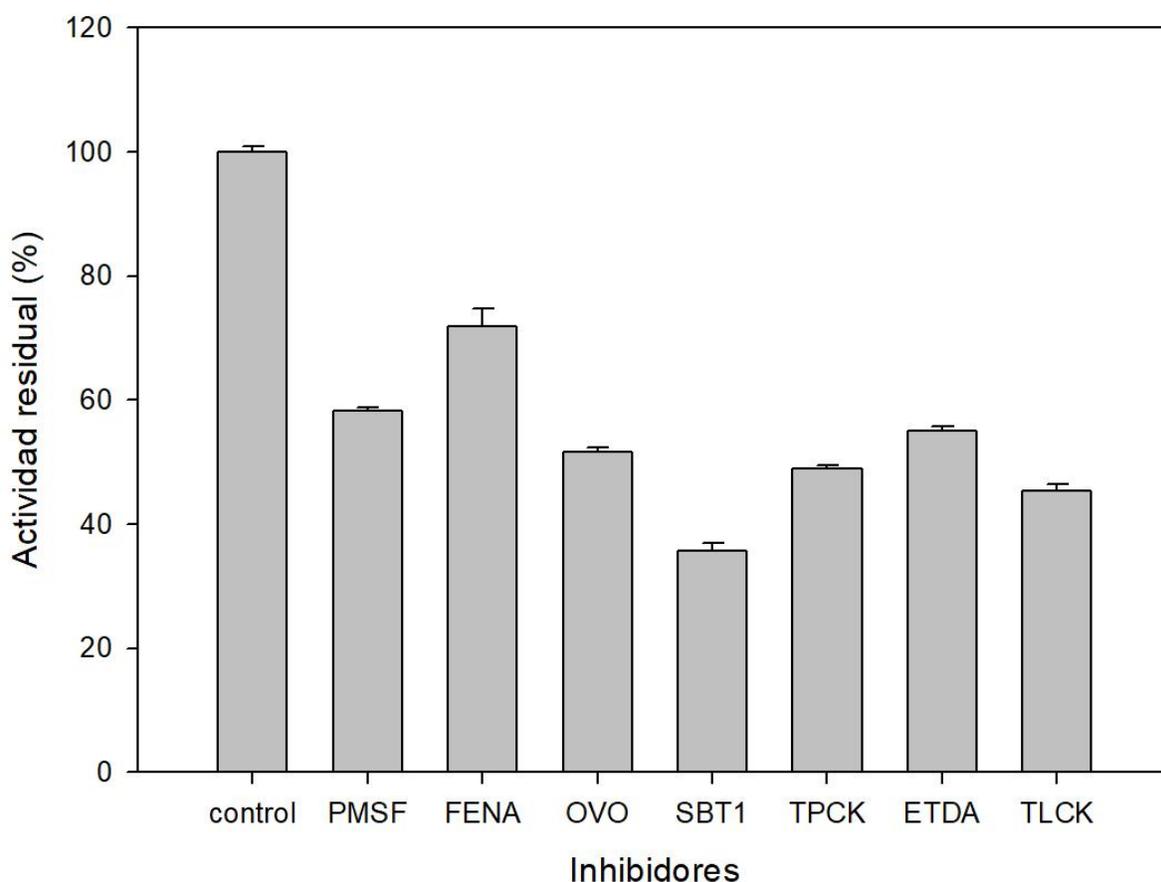


Figura 9. Estudio de inhibición de proteasas alcalinas presentes en los extractos multienzimáticos de adultos de *M. americanum*.

6.6 Estudios de inhibición mediante técnicas electroforéticas para proteasas alcalinas

El estudio de inhibición de proteasas alcalinas mediante técnicas electroforéticas (Figura 10) mostró que existen 7 bandas de actividad proteolítica en el extracto multienzimático sin inhibidor (testigo), donde revelo, para el control tres bandas con pesos moleculares desde 64.2 hasta 23.2 kDa. La Ovoalbúmina y la Fenantrolina inhibió dos bandas (64.2 y 23.2 kDa), mientras que el SBT1 y el TLCK inhiben una banda (64.2 kDa). Los inhibidores TPCK y PMSF únicamente inhiben dos banda (35.1 y 23.2 kDa). Por su parte, la EDTA no inhibe ninguna banda.

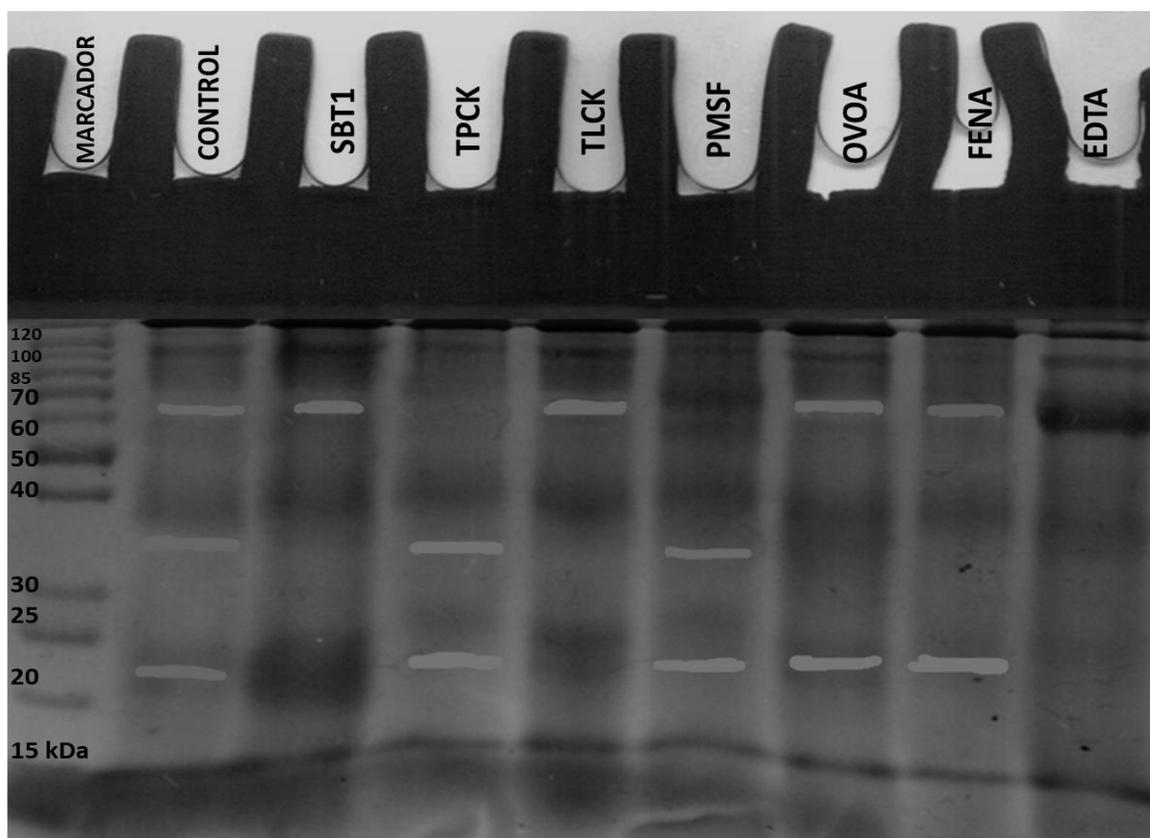


Figura 10. Análisis de electroforesis SDS-PAGE de inhibición de proteasas alcalinas presentes en el extracto multienzimático de adultos de *M. americanum*.

VII. DISCUSIÓN

7.1 Actividad enzimática digestiva

Las actividades enzimáticas proteolíticas se da en la hepatopáncreas, donde este órgano es el encargado del almacenamiento y secreción de dichas enzimas. Así mismo en el organismo, desempeñan un papel muy impórtate en la fisiología nutricional de los crustáceos (Van Wormhoudt, 1977; Lee y Lawrence, 1984; Cruz, 1996; Fernández *et al.*, 1997; Rosas *et al.*, 2001; Isiordia, 2006; Ayala, 2014). Sin embargo, existen en los crustáceos causas que afectan las actividades enzimáticas digestivas que varían en función de: el ciclo de muda, ciclo circadiano, desarrollo embrionario, factores ambientales, la calidad y cantidad de proteína en los alimentos (Nolasco y Vega, 2000; Gamboa, 2001; Fernández *et al.*, 2001; López, 2004; Espinosa, 2013).

La caracterización enzimática digestiva del langostino adulto *M. americanum* mostró una alta actividad para proteasa alcalina, lipasa, amilasa y fosfatasa alcalina y en menor actividad proteolítica carboxipeptidasa A, tripsina, quimotripsina y leucina aminopeptidasa. La caracterización de estas enzimas en *M. americanum* corresponden al orden decápoda en donde varios trabajos realizados con este grupo de organismo lo confirma como es el caso del *Penaeus notialis* (Fernández *et al.*, 1997), *Cherax quadricarinatus* (Pavasovic *et al.*, 2007), *Procambarus clarkii* (Dait *et al.*, 2009) y *M. carcinus* (Manríquez *et al.*, 2018). Donde muestran que la mayor actividad proteolítica corresponde al mismo grupo de enzimas amilasa y lipasa; asimismo, se manifiestan con menor actividad proteolítica en las enzimas tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa A y leucina aminopeptidasa.

7.2 Caracterización enzimática

7.2.1 pH óptimo y estabilidad de proteasas alcalinas

El presente estudio del *M. americanum* tiene la máxima actividad alcalina de los extractos multienzimáticos en el rango de pH de 7 a 11, lo que indica que las proteasas de este organismo actúan de manera óptima en pH neutro y alcalino, esto concuerda con las especies *Panulirus japonicus*, *M. carcinus*, *M. rosenbergii*, *Penaeus californiensis*, *Pleoticus muelleri*; *Cherax quadricarinatus*, *M. lanchesteri*; *Nephrops norvegicus*; *Farfantepenaeus paulensis* las cuales reportan los rangos de pH 7 a 10 respectivamente (Galgani y Nagayama, 1987; Vega *et al.*, 1995; Fernández *et al.*, 2001; Omondi y Stark, 2001; López *et al.*, 2003; Buarque *et al.*, 2009; Hasan *et al.*, 2009; Pongsetkul *et al.*, 2016; Manríquez *et al.*, 2018). Lo cual difiere con lo reportado para el *Litopenaeus vannamei* en el cual se observan que alcanzan pH ácidos y alcalinos que van de pH 5 a 11 (Hernández *et al.*, 1997). Donde las proteasas de crustáceos, el pH varía, en algunos casos más que en los vertebrados.

Aunque se debe tener en cuenta de la presencia de un incremento en la actividad en un pH de 4, indicando que posiblemente existe una proteasa ácida en esta especie, sin embargo no se sabe a ciencia cierta el papel funcional de esta proteasa ácida en la hepatopáncreas, así mismo se ha observado dicha actividad en el pH 3 de las especies *Homarus gammarus*, *Panulirus interruptus*, *M. carcinus* y *M. rosenbergii* (Glass y Stark, 1994; Celis *et al.*, 2004; Hasan *et al.*, 2009; Manríquez *et al.*, 2018), y además se obtuvo una actividad similar en un pH de 4.5 para el *Metapenaeus monoceros* (Ramana y Surendranath, 1991).

Por otra parte, en este estudio, la estabilidad a los cambios de pH de las proteasas alcalinas mostró baja resistencia a la mayoría de pH's evaluados y manteniendo su actividad relativa por debajo del 100 %. A pesar de que la mayor estabilidad de las proteasas alcalinas se obtuvo a pH 9, se observa que a pH 4 y 11 la estabilidad de las proteasas es alta; asimismo para el *M. lanchesteri* que la

estabilidad de pH fueron bastante estables a pH 6 a 8, con la actividad restante por encima del 70% (Pongsetkul *et al.*, 2016), y por lo tanto, el pH de 4 indica, por un lado, que estas proteasas son altamente resistentes a condiciones de pH ácido, como se observó en el caso de la determinación del pH óptimo y por otro, que en los extractos enzimáticos de este organismo posiblemente se presente una proteasa ácida de la que hasta ahora no se tiene explicado su papel funcional como ya se explicó anteriormente.

7.2.2 Temperatura óptima y estabilidad de proteasas alcalinas

La temperatura óptima de la actividad de las proteasas alcalinas de adultos de *M. americanum* fue de 35 °C, que es similar a lo observado en especies de cangrejos como *C. affinis* y *Chionoecetes* sp. (Galgani y Nagayama, 1987), la langosta espinosa *Panulirus interruptus* (Celis *et al.*, 2004) y la langosta roja *Cherax quadricarinatus* (López *et al.*, 2003). Donde *M. lanchesteri* tiene un rango de temperatura de 30 a 80 °C, pero la actividad más alta se observó a 60 °C (Pongsetkul *et al.*, 2016). La estabilidad de las proteasas de *M. americanum* se observa entre 45 y 55 °C con 30 min de incubación, también se puede comparar con el *M. carcinus* donde la temperatura óptima de la actividad de las proteasas alcalinas fue de 45 °C, pero en la estabilidad de las proteasas se observa entre 35 °C y 55 °C con 30 min de incubación (Manríquez *et al.*, 2018), es decir estas dos especies (*M. americanum* y *M. carcinus*) coinciden con la caracterización de enzimas digestivas. A su vez esto es similar a los valores reportados en las especies de cangrejos, *Callinectes bellicosus*, *C. arcuatus* (Díaz *et al.*, 2006), y el cangrejo *Pacifastacus astacus* (García y Haard, 1993) con una actividad residual del 75% entre 30 y 50 °C durante 30 min de incubación, lo cual concuerda fuertemente con la forma en que los crustáceos tienden a alimentarse al permanecer largo tiempo triturando y digiriendo el alimento, de tal modo que les permite maximizar la capacidad de hidrolizar y asimilar los nutrientes dentro del hepatopáncreas (Ceccaldi, 1997 y Vega *et al.*, 1999).

7.2.3 Caracterización mediante inhibidores y uso de SDS-PAGE

En otro aspecto, el estudio de los inhibidores específicos de las proteasas digestivas de la hepatopáncreas en *M. americanum*, se acompañó con el zimograma SDS-PAGE, en donde se presentaron siete bandas en el control conformadas en tres grupos de isoformas establecidas. El primer grupo de cuatro bandas con peso molecular de 64.2 kDa, el segundo con dos bandas con peso molecular promedio de 35.1 kDa y el tercer con cuatro bandas con promedio de peso molecular de 23.2 kDa. Donde la actividad proteolítica es relativamente similar con muchos estudios realizados, como el *M. carcinus* que presentan un rango de peso molecular entre 17.8 a 94.0 kDa (Manríquez *et al.*, 2018), asimismo para el *M. rosenbergii* tuvo la presencia de proteasas digestivas correspondiente de masas moleculares entre 13.48 y 136.1 kDa (Hasan *et al.*, 2009), así para el *Cherax quadricarinatus* obtuvo un rango de peso molecular entre 63 y 118 kDa (López *et al.*, 2003), y por otro lado, con el cangrejo *Pacifastacus astacus*, donde se observan bandas de actividad con rangos de peso molecular entre 14 a 81 kDa, entre ellas se encuentran las bandas corresponden a tripsina y quimotripsina (García *et al.*, 1993).

En presente estudio los inhibidores en *M. americanum* mostraron una inhibición residual del 42% por PMSF y una inhibición residual de más del 65% SBT1, lo cual indica la presencia de serina-proteasas (García y Haard 1993); dicho resultado indica una menor resistencia que lo reportado para *M. carcinus* donde se mostró una actividad residual de más del 80% (Manríquez *et al.*, 2018), y asimismo concuerda con los resultados *M. rosenbergii* y *M. lanchesteri* donde los resultados reflejan una inhibición alta (Hasan *et al.*, 2009 y Pongsetkul *et al.*, 2016). De igual manera, los resultados del presente estudio manifiestan que el SBT1 solo inhibió una banda (64.2 kDa) mientras, que el PMSF inhibió dos bandas (35.1 y 23.2 kDa) de actividad proteolítica; lo cual no difiere con estudios recientes en *Artemisa longinaris* (Fernández, *et al.*, 2002), en el cual se encontró que la tripsina tiene peso molecular con rango de 14.79 a 17.32 kDa, la quimotripsina en rango de 21.38 a 27.54 kDa y de igual manera para el *Pleoticus muelleri*

(Fernández *et al.*, 2001), donde la quimotripsina obtuvo un rango de 21.9 kDa. Lo cual coinciden con la presencia de serina-proteasas reportadas en diversos decápodos como lo son: *P. monodon*, *P. japonicus*, *Marsopenaeus japonicus*, *P. penicillatus*, *Fenneropenaeus penicillatus*., *L. vannamei*, *Metapenaeus monoceros* y *Macrobrachium* (Tsai *et al.*, 1986; Fernández *et al.*, 2001).

Los inhibidores específicos PMSF, SBT1 y TLCK presenta una reducción de la actividad proteolítica en los extractos de *M. americanum* esto se debe a la inhibición de la tripsina. Estos resultados son similares a los que se presentan en las siguientes especies *Pleuroncodes planipes* (García y Haard, 1993), *M. rosenbergii* (Hasan *et al.*, 2009), *M. lanchesteri* (Pongsetkul *et al.*, 2016) y *M. carcinus* (Manríquez *et al.*, 2018). Esto indica la sensibilidad de las isoformas para especies de estos tipos de inhibidores.

La metal-proteasas presenta una inhibición del 29% por Fenantrolina y por EDTA el 45%. Por otra parte, la ovoalbúmina presento una inhibición del 49% en *M. americanum*. Manríquez *et al.*, (2018) presento una inhibición del 75% en la pigua *M. carcinus*; asimismo, los resultados obtenidos en esta investigación son similares a los presentados con larvas de camarón blanco *L vannamei* (Alarcón *et al.*, 2007), por lo tanto se puede decir que el hábito alimenticio de camarones y palemónidos en su ambiente natural es principalmente omnívoro, pero con una tendencia a la carnivoría, en donde el uso de los inhibidores proteolíticos generales, como SBT1 y PMSF, así como los específicos como TLCK y TPCK permiten entender la capacidad digestiva de la especie (Wikins, 1976; Fernández *et al.*, 1987). Esto nos permite afirmar, que determinar los tipos de enzima que componen las proteasas digestivas de las especies y permite delimitar el uso de ciertos ingredientes, que pudieran reducir la actividad de ciertas enzimas y limitar la digestibilidad de los alimentos balanceados, así como la posibilidad del uso de algunos ingredientes vegetales, sin que se observe un efecto negativo directo al momento de ser cultivados, ya sea durante la engorda o en la reproducción.

VIII. CONCLUSIÓN

- ❖ De acuerdo a la información generada durante el desarrollo de esta investigación, las enzimas que presentan el *M. americanum* son similares a las que ostenta otros organismos del mismo género, que comparten los mismos hábitos alimenticios.
- ❖ Los extractos multienzimáticos del *M. americanum* presentaron su mayor actividad aun pH óptimo de 11. Así mismo, los extractos presentan una estabilidad de pH 12 con un tiempo de pre-incubación de 30 min.
- ❖ Los organismos presentan una temperatura óptima de 35 °C, de esta manera la estabilidad de las proteasas se observa a los 45 y 55 °C con un tiempo de pre-incubación de 30 min.
- ❖ Los extractos multienzimáticos presentaron sensibilidad ante los inhibidores de PMSF, SBT1 y TLCK con la inhibición de tripsina. Los inhibidores Fenantrolina y EDTA inhibieron las isoformas que corresponde a la metal-proteasas.

IX. RECOMENDACIÓN

- ❖ Desarrollar investigación sobre la ontogenia enzimática, para conocer desde que edad los organismos (larvas) cuentan con el paquete enzimático completo, para empezar alimentarlos con dietas peletizadas y tengan la capacidad digestiva de aprovechar los nutrientes que son ofrecidos en las dietas.
- ❖ Realizar estudios de digestibilidad *in vitro* e *in vivo*, para la selección de ingredientes con los más altos porcentajes de digestibilidad, para diseñar alimentos hacia su cultivo y que estos se han amigables al medio ambiente.
- ❖ Determinar los requerimientos nutricionales óptimos para la generación de alimentos específicos para cada etapa de desarrollo del M. americano.
- ❖ Se recomienda un estudio de expresión de genes codificantes para las enzimas digestivas de esta especie.

X. REFERENCIAS

- Acuña, E.P. (2002). Estructura genética, variación isoenzimática y morfología de dos poblaciones de *Macrobrachium spp.* De Veracruz, México. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F. 187 pp.
- Alarcón, F.J., Oña, C., Díaz, M., García, F.L., Moyano, F.J., Navarrete, M.A. (2007). The effect of proteinase inhibitors in food protein hydrolysis by digestive proteinases of white shrimp (*Penaeus vannamei*) larvae. *J. Sci. Food. Agric.* 87: 120-126.
- Álvarez, C. A. (2003). Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la Cabrilla Arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae). Tesis de doctorado. IPN-CICIMAR. La Paz, Baja California Sur, Mexico.
- Álvarez, C.A., Gabriela, G., Jiménez, L.D., Sánchez, A., Arena, G., Martínez, T., Tovar, D., Concha, B., Márquez, G., Perales, N., Asencio, G.G., Jesús, F. (2010). Avances en la fisiología digestiva del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) en Tabasco, México. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D.A., Gamboa-Delgado, J., (Eds). Memorias del X Avances en Nutrición Acuícola y X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. 99-232 pp.
- Andrews, A. T. 1995. Electrophoresis: Theory, techniques, biochemical and clinical applications. Clarendon Press. Oxford, Great Britain. 452 pp.
- Arana, F., Ortega, A. (2004). Rearing of the cauque prawn under laboratory conditions. *N. Am. J. Aquacult.*, 66(2): 158-161.
- Archibal, A.L. (1987). Comparison of the serum amylases of farm animals. *Biochem. Physiol.* 88: 963-968.

- Arroyo, G., Magaña, L. (2001). Contribución al conocimiento de las especies de *Macrobrachium* y *Atya* con especial referencia a los langostinos en el cauce del río Baluarte (1991). Tesis de licenciatura en biología pesquera, Universidad Anáhuac México Sur, Ciudad de México, 58 pp.
- Ásgeirsson, B., Hartemink, R., Chlebowski, J.F. (1995). Alkaline phosphatase from atlantic cod *Gadus morhua*. Kinetic and structural properties wich indicate adaptation to low temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.* 110B: 315-329.
- Ayala, E.G. (2014). Efecto de la inclusion de harina de langostilla (*pleuroncodes planipes*) en el alimento sobre la expresión y actividad enzimática digestiva en el intestino del camarón blanco (*litopenaeus vannamei*). Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste, S.C. La Paz, Baja California Sur, Mexico.
- Bate, S. (1868). On a new genus with four new species o freshwater prawns. *Proceeding of the zoological society of London.* 363-368 pp.
- Bergmeyer, H.V. (1974). *Methods of enzymatic analysis. Phophatases.* Vol 2. Verlag Chemic. Academic press. Inc.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye dinging. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brockhoff, H., Hoyle, R.J., Hwang, P.C. (1970). Digestive enzymes of the american lobster *Homarus americanus*. *J. Fish Res. Board Can.* 27: 1357–1370.
- Buarque, D.S., Castro, P.F., Santos, F.M.S., Lemos, D., Junior, L.B.C., Bezerra, R.S. (2009) Digestive peptidases and proteinases in the midgut gland of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Aquacul. Res.* 40:861-870.
- Carrillo, O., González, R., Suárez, A. (1997). Ritmo circadiano de las proteasas generales en adultos de *Penaeus schmitti*. I. Efecto del horario de alimentación. *Revista de Investigación Marinas* 18: 162-168.

- 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.
- Celis, L.E., García, F.L., Navarrete, M.A. (2004). Characterization of proteases in the digestive system of spiny lobster *Panulirus interruptus*. Mar. Biotechnol. 6: 262–269.
- Cruz, L., Ricque, D., Pinall, J., Wesche, D. (1994). Effect of different carbohydrate sources on the growth of *Penaeus vannamei*; economical impact. Aquaculture, 123; 349-360.
- Cruz, L.E. (1996). Digestión en camarón y su relación con la formulación y fabricación de alimentación balanceados. Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 11-13 Noviembre. Monterrey, Nuevo León, México. Pp 209.
- Dai, Y., Wang, T., Wang, Y., Gong, X., Yue, C. (2009). Activities of digestive enzymes during embryonic development in the crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda). Aquaculture research. 40: 1394-1399.
- De Bruyn, M., Wilson, J.A., Mather, P.B. (2003). Huxley's line demarcates extensive genetic divergence between eastern and western forms of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Mol. Phylogen. Evol. 30: 251-257.
- DelMar, E.G., Largman, C., Broderick, J.W., Geokas, M.C. (1979). A sensitive new substrate for chymotrypsin. Anal Biochem. 99: 316-230.
- Díaz, F., Díaz, P., Rodríguez, L. (2001). Producción larval de camarón de río nativo, *Macrobrachium americanum*, en laboratorio. Universidad de san Carlos de Guatemala. Programa Universitario de Investigación en Alimentación y Nutrición. Centro de Estudios del Mar y Acuicultura. Guatemala, Guatemala.
- Díaz, L.M., García, F.L., Navarrete, M.A. (2006). Characterization and comparison of digestive proteinases of the cortez swimming crab, *Callinectes bellicosus*,

- and the arched swimming crab, *Callinectes arcuatus*. *Invertebrate Biology* 125
2: 125–135.
- Dixon, M., Webb, E. (1979). *Enzymes*. 3a edición, Academic Press. New York.
- Dunn, B. (1989). Determination of protease mechanism. pp. 57-81. En: R.J. Beynon y J.S. Bond (Eds.). *Proteolytic Enzymes: A practical approach*. I.R.L. Press, Oxford, England.
- Dupuis, Y., Tardival, S., Poremska, Z., Fournier, P. (1991). Effect of some alkaline phosphatase inhibitors of intestinal calcium transfer. *Int. J. Biochem.* 23: 175-180.
- Echeverry, P.A. (2012). Evaluación de reproducción y desarrollo larval de camarón de río *Macrobrachium americanum* (bate, 1868) en condiciones de laboratorio. Buenaventura, valle del cauca. Universidad del Valle Facultad de Ciencias Programa Académico de Biología Buenaventura.
- Erlanger, B.F., Kokorsky, N., Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 96: 271-278.
- Espinosa, J.L. (1987). El langostino: Un alimento en peligro. México, Ingramex. 10: 19-30.
- Espinosa, L.D. (2013). La actividad enzimática digestiva y su aplicación nutricional en el langostino *Macrobrachium tenellum* (Smith, 1871). Tesis de doctorado. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de la Costa. Puerto Vallarta, Jalisco.
- Espinosa, L.D., Vargas, M.A., Guzmán, M., Nolasco, H., Carrillo, O., Chong, O., Vega, F. (2011). Biología y cultivo de *Macrobrachium tenellum*: Estado del arte. *Hidrobiológica* 21(2): 99-117.
- Fang, L., Lee, B. (1992). Ontogenic changes in digestive enzymes in *Penaeus monodon*. *Comp Biochem Physiol* 103B: 1033–1037.
- FAO (2009). Directrices para el ecoetiquetado de pescado y productos pesqueros de la pesca de captura marina. Roma. 108 págs.

- www.fao.org/docrep/012/i1119t/i1119t00.htm (Consultado el 9 de septiembre de 2018).
- FAO (2010). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010. Roma, FAO. 219p. www.fao.org/3/a-i1820s.pdf (Consultado el 9 de septiembre de 2018).
- FAO (2010). Report of the FAO Expert Workshop on On-farm feeding and feed management in aquaculture. Manila, the Philippines. Pp. 13-15.
- FAO (2011). Directrices para el ecoetiquetado de pescado y productos pesqueros de la pesca de captura continental. Roma. 106 págs. www.fao.org/docrep/015/ba0001t/ba0001t00.htm (Consultado el 9 de septiembre de 2018).
- FAO (2012). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012. Roma. 231págs. www.fao.org/3/a-i2727s.pdf (Consultado el 9 de septiembre de 2018).
- FAO (2013). Visión general del sector acuícola nacional México. National aquaculture sector Overview fact sheets. In: Departamento de pesca y acuicultura de la FAO. Roma. Actualizado 10 June 2013. www.fao.org/fishery/countrysector/naso_mexico/es (Consultado el 9 de septiembre de 2018).
- FAO (2014). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014. Roma. 253 págs. www.fao.org/3/a-i3720s.pdf (Consultado el 9 de septiembre de 2018).
- FAO (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp. www.fao.org/3/a-i5555s.pdf (Consultado el 9 de septiembre de 2018).
- Fernández, A.V., García, F.L., Navarrete, M.A., Fenucci, J.L. (2001). Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda, Penaeoidea): partial characterization and relationship with molting. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 130: 331-338.
- Fernández, A.V., García, F.L., Navarrete, M.A., Fenucci, J.L. (2002). Digestive proteinases of *artemisa longinaris* (decapada, penaeidae) and relation ship with molting. Comparative Biochemistry and physiology Part B 132: 593-598.

- Fernández, I., Oliva, M., Carrillo, O., Van Wormhoud, A. (1997). Digestive enzyme activities of *Penaeus notialis* during reproduction and moulting cycle. *Camp. Biochem. Phystol.* Vol. 118A: 1267-1271.
- Fernández, R., Celada, J.D., Muñoz, F. (1987). Nutrición y alimentación en crustáceos. En espinosa de los Monteros, J. y Labarta, U. (Eds.). *Nutrición en Acuicultura I*, CAICYT. Pp. 1-52.
- Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K.E., Niem, V.H. (1995). Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental. Plantas e invertebrados. Roma, FAO. Vol. 1:1-646 p.
- Folk, J., Schirmer, E. (1963). The porcine pancreatic carboxypeptidase a system. I. Three forms of the active enzyme, *J Biol Chem.* 238: 3884.
- Galgani, F., Nagayama, F. (1987). Digestive proteinases in the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B: 889–893.
- Gamboa, J. (2001). Estudio de la actividad de las enzimas digestivas de *Litopenaeus vannamei* en función del tamaño corporal y la preferencia alimenticia. Tesis de Magisterado. Escuela Superior Politécnica del Litoral Facultad De Ingeniería Marítima Y Ciencias Del Mar. Guayaquil, Ecuador.
- García, F. (1992). Protease inhibition in theory and practice. *Biotechnol. Edu.* 3: 145-150.
- García, F., Dimes, L., Haard, N. (1993). Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214: 65-69.
- García, F., Haard, N. (1993). Characterization of proteinase clases in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *J. Food Biochem.* 17: 97-113.
- García, F.L., Hernández, M.P., Haard, N. (1994). Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of fresh wáter and marine decapod. *J. Agricul. Food Chem.* 42: 1456-1461.

- García, M. (2010). Effect of temperature on consumption rate of main yolk components during the embryo development of the prawn *Macrobrachium americanum* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). J. World. Aquacult. Soc., 41(1): 84-92.
- García, M., Apun, P. (2008). Density and shelter influence the adaptation to wild juvenile cauque prawns *Macrobrachium americanum* to culture conditions. N. Am. J. Aquacult., 70 (3): 343346.
- García, M., Hendrickx, M. (2009). External description of the embryonic development of the prawn *Macrobrachium americanum* based on the staging method. Crustaceana, 82: 1413-1422.
- García, M., Orduña, J., Cortes, E. (2011). Oxygen consumption of the prawn *Macrobrachium americanum* (Bate, 1868) over the temperature range of its native environment and in relation to its weight. N. Am. J. Aquacult., 73 (3): 320-326.
- García, M.U., Becerril, F., Vega, F., Espinosa, L.D. (2013). Los langostinos del género *Macrobrachium* con importancia económica y pesquera en América Latina: conocimiento actual, rol ecológico y conservación. Latin American Journal of Aquatic Research, vol. 41, núm. 4, septiembre-, 2013, pp. 651-675 Pontificia Universidad Católica de Valparaíso Valparaiso, Chile.
- Gibson, R., Barker, P. (1979). The decapod hepatopancreas. Oceanogr. Marine Biological Annual Review, 17:285-346.
- Glass, H., Stark, J. (1994). Protein digestión in the european lobster, *Homarus gammarus* (L.) Comp. Biochem Physiol 108B: 225-235.
- Glass, H.J., Stark, J.R. (1995). Carbohydrate digestion in the european lobster *Homarus gammarus* (L). J Crust Biol 15 (3) 424–433.
- Gutiérrez, Y. (2010). Morfometría y reproducción de tres especies langostinos de la vertiente del Pacífico de Costa Rica: *Macrobrachium panamense*, *M. americanum* y *M. tenellum* (Decapoda: Palaemonidae). Tesis de licenciatura

en biología con énfasis en recursos acuáticos. Universidad de Costa Rica, San José, 53 pp.

Harris, H. (1989). The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin. Chim. Acta* 186: 133-150.

Hasan, M., Hashim R., Shu-Chien, A. (2009) Identification and partial characterization of selected proteolytic enzymes in the digestive system of giant freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) Postlarvae. *Aquaculture research*, 40: 519-525.

Hendrickx, M.E. (1995). Checklist of lobster-like decapod crustaceans (Crustacea: Decapoda: Thalassinidea, Astacidea and Palinuridea) from the eastern tropical Pacific. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Zoología* 66:151-163.

Hernández, L., Murugan, G., Ruiz, G., Meada, A. (2007). Freshwater shrimp of the genus *Macrobrachium* (Decapoda Palaemonidae) from the Baja California Peninsula, Mexico. *J. Crust. Biol.*, 27 (2): 351-369.

Hernández, M.L. (2007). *Revisión sistemática del género Macrobrachium (Decapoda: Palaemonidae) de la península de Baja California Sur. Tesis de doctorado. CIBNOR, La Paz. Mexico. 29 p.*

Hernández, P. (2008). Efecto de la temperatura en el crecimiento y sobrevivencia del langostino *Macrobrachium occidentale* y del acocil *Cherax quadricarinatus*. Tesis de maestría en ciencias (Recursos Naturales y Medio Ambiente), Departamento de Acuicultura, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, IPN. Sinaloa, México. 60 p.

Hernández, P., Whitaker, J., García, F. (1997). Purification and characterization of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *J. Food Biochem.* 21: 497-510.

Hirikado, M., Hirata, K., Uemarsu, Y., Hatooka, Y., Kazama, M. (1994). Assay for activities of α -amylase and glucoamylase used in food processing. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 35: 28-33.

- Holthuis, L.B. (1952). A general revision of the Palaemonidae (Crustacea: Decapoda: Natantia) of the Americas. II. The subfamily Palaemoninae. Allan Hancock Found. Pub. Occas. Pap., 396 pp.
- Hoyle, R.J. (1973). Digestive enzyme secretion after dietary variation in the american lobster *Homarus americanus*. J Fish Res Bd Can 30: 1647–1653.
- Isiordia, E., Puello, A., D' Abramo, L., González, H. (2006). Evaluation of the enzymatic activity and protein content in larvae of white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed with different diets. Revista electrónica de veterinaria REDVET ISSN 1695-7504. Vol. VII, N° 04.
- Jussila, J. (1997). Physiological responses of astacid and parastacid crayfishes (Crustacea: Decapoda) to conditions of intensive culture. Kuopio University Publications C. natural and environmental sciencia. Perth, Western Australia. 136 p.
- Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. J. Gen. Physiol. 30: 291-310.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Lazo, J.P., Mendoza, R., Holt, G.J., Aguilera, C., Arnold, C.R. (2007). Characterization of digestive enzymes during larval development of red (*Sciaenops ocellatus*). Aquaculture 265: 194-205.
- Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D., 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., Smith, L.L., Lawrence, A.L. (1984). Digestive proteases of *penaeus vannamei* Boone: Relationship between enzyme activity, size and diet. Aquaculture. 42: 225-239.
- Lehninger, A.L. (1984). Enzimas. Bioquímica. 2ª ed. Omega. Barcelona, España. 1198 pp.

- León, R. (2015). Panorama sobre los alimentos balanceados para acuicultura en México, en comparación con otros países. Universidad de Guadalajara, México. www.engormix.com/balanceados/articulos/panorama-sobre-alimentos-balanceados-t31919.htm. (Consultado el 10 de agosto del 2018).
- López, S. (2004). Estudio de la actividad enzimática digestiva de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacide). Tesis de doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, Baja California Sur, México.
- López, S., Nolasco, H., Vega, F. (2003). Characterization of digestive gland esterase–lipase activity of juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Comparative biochemistry and physiology Part B 135: 337–347.
- Luna, M., Graziani, C., Villarroel, E., Lemus, M., Lodeiros, C., Salazar, G. (2007). Evaluación de tres dietas con diferente contenido proteico en el cultivo de postlarvas del langostino de río *Macrobrachium rosenbergii*. Zootecnia Tropical 25 (2): 111-121.
- Madrid, J.A., Mendiola, P., Ángeles, M., Rubio, V.C., Sánchez, F.J. (2005). Alimentación voluntaria en peces de cultivo. En: Acuicultura, pesca y marisqueo en el Golfo de Cádiz. Servicio de Publicaciones y Divulgación. Consejería de Agricultura y pesca. Junta de Andalucía (DL: SE-6014-2005): Sevilla. 85: 615-640.
- Manríquez, T.J., Álvarez, C.A., Peña, E., Camarillo, S., Martínez, R., Vega, F. (2018). Partial characterization of digestive proteases in adults of bigclaw river shrimp *Macrobrachium carcinus*. Lat. Am. J. Aquat. Res., 46(3): 525-533.
- Maraux, S., Louvard, D., Baratti, J. (1973). The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. Biochim biophys. Acta 321: 282-295.
- Mathews, C.K., Van Holde, K.E. (1998). Bioquímica. 2^a ed. Mc Graw-Hill. España. Pp. 1283.
- McNamara, J.C., Moreira, G., Moreira, P. (1983). The effect of salinity on respiratory metabolism, survival and moulting in the first zoea of

- Macrobrachium amazonicum* (Heller) (Crustacea, Palaemonidae). *Hydrobiologia*, 101 (3): 239-242.
- Monaco, G. (1975). Laboratory rearing of larvae of the palaemonid shrimp *Macrobrachium americanum* (Bate). *Aquaculture*, 6 (4): 369-375.
- Mossolini, E., Bueno, S.L. (2003). Relative growth of the second pereopod in *Macrobrachium olfersi* (Wiegmann, 1836) (Decapoda: Palaemonidae). *Crustaceana*. 76: 363-376.
- Moyano, F.J. (2006). Bioquímica digestiva en especies acuicultivadas: Aplicaciones en Nutrición. En editores: Cruz, S.E., Ricque, M.R., Tapia, S.M., Nieto, L.M.G., Villareal, C.D.A., Puello, C.A.C., y García, O.A. Avances en Nutrición Acuícola VII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.
- Nolasco, H., Vega, F. (2000). Actividad enzimática digestiva, ritmos circadianos y su relación con la alimentación del camarón. pp 149-165. Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18. La Paz, Baja California Sur, México.
- Omondi, J.G., 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.
- Ortega, A.A., Arana, F.C. (2006). Survival of postlarval *Macrobrachium rosenbergii* at two temperatures. *North American journal of aquaculture*. (68) 1:34-35.
- Pavasovic, A., Anderson, A.J., Mather, P.B., Richardson, N.A. (2007). Effect of a variety of animal, plant and single cell-based feed ingredients on diet digestibility and digestive enzyme activity in redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Von Martens 1868). *Aquaculture*, 272: 564-572.
- Perales, N. (2009). Ontogenia enzimática de la mojarra tenguayaca *Petenia splendida*. Tesis de maestría. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México.

- Ponce, J., Arana, F., Cabanillas, H., Esparza, H. (2002). Bases biológicas y técnicas para el cultivo de los camarones de agua dulce nativos del Pacífico Americano *Macrobrachium tenellum* (Smith, 1871) y *M. americanum* (Bate, 1968). Congreso iberoamericano virtual acuicultura. 534-546. www.civa2002.org (consultado el 8 de agosto del 2018).
- Pongsetkul, J., Benjakul, S., Sumpavapol, P., Osako, K., Faithong, N. (2016). Characterization of endogenous protease and the changes in proteolytic activity of acetes vulgaris and *Macrobrachium lanchesteri* during kapi production. Journal of food biochemistry ISSN 1745–4514.
- Ramana, K.V., Surendranath, P. (1991). Effect of kelthane on pH dependency of lipase in tissue of the penaeid prawn, *Metapenaeus monoceros* (Fabricius) under sublethal exposure. Pesticide biochem. Physiol. 39: 205-209.
- Robyt, J., Whelan, J. (1968). Starch and its derivatives. J. A. Radley (ed.): 477-497. Academic press. Londres.
- Rojo, A. (2009). Evaluación de la factibilidad técnica y económica del policultivo de la tilapia roja *Oreochromis sp.* Con el langostino *Macrobrachium americanum* (Bate, 1868). Tesis de maestría. Instituto Politecnico Nacional. Guasave, Sinaloa.
- Román, R. (1979). Contribución al conocimiento de la biología y ecología de *Macrobrachium tenellum* (Smith, 1871) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). An. Inst. Cienc. Mar. Limnol., 6 (2): 137-160.
- Román, R. (1993). Probopyrus pacificensis, a new parasite species (Isopoda: Bopyridae) of *Macrobrachium tenellum* (Smith, 1871) (Decapoda: Palaemonidae) of the Pacific coast of Mexico. Proc. Biol. Soc. Washington, 106 (4): 689-697.
- Rosas, C., Cuzon, G., Taboada, G., Pascual, C., Gaxiola, G., 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.
- Ruiz, M., Peña, J., López, Y. (1996). Morfometría, época reproductiva y talla comercial de *Macrobrachium americanum* (Crustacea: Palaemonidae) en Guanacaste, Costa Rica. Rev. Biol. Trop., 44 (1): 127-132.
- Sacristán, H.J., Franco, L.M., López, L.S. (2013). Influencia de la alimentación sobre el ritmo circadiano de las enzimas digestivas en el cultivo de juveniles de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae). Lat. Am. J. Aquat. Res., 41(4): 753-761.
- Salvensen, G., Nagase, H. (1989). Inhibition of proteolytic enzymes. In: Beynon R., Bond, J.R. (Eds.). Proteolytic enzymes. IRL Press Oxford. UK. pp. 83-104.
- Sanchez, R., Álvarez, S. (2007). Cultivo de Camarón con carácter social. Fundación para el desarrollo de la ciencia y la tecnología del estado. Falcon/Ministerio de ciencia y tecnología de venezuela.
- Santos, R., Garcia, M., Vega, F., Cortes, E., Nolasco, H. (2017). Effect of photoperiod and temperature on growth and activity of digestive enzymes in juveniles of the long-arm river shrimp *Macrobrachium tenellum* (Smith, 1871) (Caridea: Palaemonidae). Journal of Crustacean Biology, Volume 37, Pages 445–452.
- Stauffer, C. (1989). Enzyme assays for food scientists. Van Nostand Reinhold/AVI, New York.
- Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L. (2003). Bioquímica. 5ª ed. México. P. 209.
- Toledo, F.J. (2013). Ontogenia y caracterización de las enzimas digestivas de *Cichlasoma trimaculatum* (mojarra tahuina). Tesis de maestría. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México.
- Toledo, P. (2012). El desafío de la proteína para la acuicultura. Infopesca internacional, N° 49.

- Tsai, I., Chuang, K., Chiang, J.L. (1986). Chymotripsins in digestive tracts of crustacean decapods (Shrimps). *Comp biochem. Physiol.*, vol 85B: 235-239.
- Van Wormhoudt, A. (1977). Activites enzymatiques digestives chez *Palaemon serratus*: Variations annuelles de l'acrophase des rythmes circadiens. *Biochemical systematics and ecology* 5: 301-307.
- Vega, F., Chong, O. (2006). El dicamarón, diccionario de camaronicultura. Universidad de Guadalajara. Universidad de La Habana. 2a. ed. Ed. Ediciones de la Noche. 123 p.
- Vega, F., Fernández, I., Preciado, R.M., Oliva, M., Tovar, D., Nolasco, H. (1999). The activity of digestive enzymes during the molting stages of the arched swimming *Callinectes arcuatus* Ordway, 1863. *Bulletin of marine science* 65: 1-10.
- Vega, F., Nolasco, H., Civera, R. (1995): The digestive enzymes of the pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*. II- Properties of protease activity in the whole digestive tract. *Comp. Biochem. Physiol.* 112 (1): 123129.
- Versaw, W., Cuppett, S.L., Winters, D.D., Williams, L.E. (1989). An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J. Food Sci.* 54: 232-254.
- Villalobos F.A. (1982). Decapoda. En: S. Hurlbert y A. Villalobos-Figueroa (Editors), *Aquatic Biota of Mexico, Central America and West Indies*. San Diego State University-Universidad Autónoma Metropolitana, México. 215-239 pp.
- Villalobos, J.L., Álvarez, F., Hernández, C., Lanza, G., González, I. (2010). Crustáceos decápodos de las cuencas Copalita, Zimatán y Coyula, en Oaxaca, México. *Rev. Mex. Biodivers.*, 81: 99-111.
- Vogt, G. (2002). Functional anatomy. Pp. 53-151. In: *Biology of freshwater crayfish*. (David, M. Holdich ed). Blackwell science. U.K.

Walter, H.E. (1984). Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In Bergmeyer HJ (ed) methods of enzymatic analysis, vol V. Verlag Chemie. Weinham pp. 270-277.

Wikins, J.F. (1976). Prawn biology and culture. En Barnes, H. (ED) Aberdeen University press. Oceanografic. Mar. Biol. Ann. Rev. 1: 435-507.