



# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS

EL SABER DE MIS HIJOS  
HARÁ MI GRANDEZA

**Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos**  
**Especialidad en Conservación y Procesamiento de Productos Marinos**

**Efecto del Contenido de Proteína en el Alimento de Camarón  
Azul (*Litopenaeus stylirostris*) Cultivado sobre la Actividad  
Proteolítica y Parámetros Calorimétricos y su Relación  
con la Pérdida de Textura Durante su  
Almacenamiento en Congelación**

**TESIS**

que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

Presenta:

***Martha Elisa Rivas Vega***

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
OBJETIVOS.....	xiii
ANTECEDENTES.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. DIGESTIÓN Y NUTRICIÓN DE CAMARÓN.....	2
2.1. Fisiología digestiva.....	2
2.2. Requerimientos nutricionales.....	7
III. CALIDAD Y DETERIORO POSTMORTEM DE CAMARÓN.....	12
3.1. Calidad postcaptura de camarón.....	13
3.2. Deterioro de la calidad postmortem en camarón.....	15
3.3. Índices químicos de deterioro en camarón.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
I. MANEJO DE LA MUESTRA.....	27
II. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DEL HEPATOPÁNCREAS (HP) Y MÚSCULO DEL CAMARÓN .....	27
2.1. Extracción de las proteasas del camarón.....	27

## CONTENIDO (Continuación)

2.2.	Ensayos de actividad proteolítica del hepatopáncreas.....	28
2.3.	Ensayos de actividad proteolítica del músculo de camarón.....	29
III.	COMPOSICIÓN PROXIMAL DEL MÚSCULO DE CAMARÓN.....	30
IV.	MEDICIONES FISICOQUÍMICAS EN EL MÚSCULO DE CAMARÓN.....	30
4.1.	Determinación de textura en el músculo de camarón.....	30
4.2.	Calorimetría diferencial de barrido.....	30
V.	HIDRÓLISIS DE EXTRACTO PROTEICO DEL MÚSCULO POR EL EXTRACTO ENZIMÁTICO CRUDO DEL HEPATOPÁNCREAS.....	31
5.1.	Extracto proteico del músculo de camarón.....	31
5.2.	Hidrólisis de proteínas miofibrilares.....	31
5.3.	Concentración de proteína soluble en extractos enzimáticos y proteicos.....	31
VI.	CAMBIOS EN TEXTURA Y PARÁMETROS CALORIMÉTRICOS EN EL MÚSCULO DURANTE SU ALMACENAMIENTO EN CONGELACIÓN.....	32
VII.	ANÁLISIS DE DATOS.....	32
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33

## CONTENIDO (Continuación)

I.	EFFECTO DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA EN LA DIETA SOBRE EL CRECIMIENTO, COMPOSICIÓN Y TEXTURA DE CAMARÓN AZUL.....	33
II.	EFFECTO DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA EN LA DIETA SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DEL HEPATOPÁNCREAS DE CAMARÓN.....	37
III.	EFFECTO DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA EN LA DIETA SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DEL MÚSCULO DE CAMARÓN.....	40
IV.	CARACTERÍSTICAS TÉRMICAS DE LAS PROTEÍNAS DEL MÚSCULO DE CAMARÓN.....	42
V.	HIDRÓLISIS <i>in vitro</i> DE PROTEÍNAS DEL MÚSCULO POR EL EXTRACTO ENZIMÁTICO DEL HEPATOPÁNCREAS DE CAMARÓN.....	45
VI.	COMPARACIÓN ENTRE CAMARÓN AZUL SILVESTRE Y CULTIVADO.....	49
VII.	COMPORTAMIENTO TÉRMICO Y CAMBIOS EN TEXTURA DEL MÚSCULO DE CAMARÓN DURANTE SU ALMACENAMIENTO EN CONGELACIÓN.....	51
	CONCLUSIONES.....	56
	RECOMENDACIONES.....	58
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

## LISTA DE TABLAS

TABLA	Página
1. Requerimientos protéicos de diferentes especies de camarón en su etapa adulta.....	8
2. Composición proximal de las dietas suministradas durante el cultivo del camarón azul ( <i>Litopenaeus stylirostris</i> ).....	26
3. Longitud, peso y textura de camarón azul ( <i>Litopenaeus stylirostris</i> ) silvestre y de cultivo alimentado con diferentes concentraciones de proteína.....	34
4. Composición proximal en base seca del músculo de camarón azul ( <i>Litopenaeus stylirostris</i> ) silvestre y de cultivo alimentado con diferentes concentraciones de proteína.....	36
5. Actividad proteolítica total, tripsina y quimotripsina del extracto crudo del hepatopáncreas de camarón azul ( <i>Litopenaeus stylirostris</i> ) silvestre y de cultivo alimentado con diferentes concentraciones de proteína.....	38
6. Actividad aminopeptidasa empleando diferentes sustratos sintéticos, del hepatopáncreas de camarón azul ( <i>Litopenaeus stylirostris</i> ) silvestre y de cultivo alimentado con diferentes concentraciones de proteína.....	41

## LISTA DE TABLAS (Continuación)

7. Actividad proteolítica total, tipo tripsina y tipo quimotripsina en músculo de camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) silvestre y de cultivo alimentado con diferentes concentraciones de proteína..... 43
8. Entalpías y temperaturas de transición del músculo de camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) silvestre y de cultivo alimentado con diferentes concentraciones de proteína..... 46

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1. Tracto digestivo de crustáceos.....	3
2. Degradación autolítica de nucleótidos en camarón.....	22
3. Termogramas en calorímetro de barrido diferencial (CBD) del músculo de camarón azul ( <i>Litopenaeus stylirostris</i> ) silvestre y de cultivo alimentado con diferente contenido de proteína.....	44
4. Hidrólisis <i>in vitro</i> de proteínas del músculo de camarón por extracto enzimático del hepatopáncreas de camarón azul ( <i>Litopenaeus stylirostris</i> ) silvestre y cultivado alimentado con diferente contenido de proteína. (a) 25°C; (b) 4°C; (c) 0°C.....	47
5. Termogramas de la miosina del músculo de camarón azul ( <i>Litopenaeus stylirostris</i> ) cultivado con diferente contenido de proteína en el alimento durante su almacenamiento en congelación. (a)25% proteína; (b) 35% proteína; (c) 40% proteína..	53
6. Cambios en entalpía de transición de la miosina y textura del músculo de camarón azul ( <i>Litopenaues stylirostris</i> ) silvestre y de cultivo alimentado con diferente contenido de proteína en la dieta. (a) 25% proteína; (b) 35% proteína (c) 40% proteína..	54



## RESUMEN

Se evaluó el efecto del contenido de proteína en el alimento (25, 35 y 40%) del camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) después de su cosecha sobre el peso, longitud y textura del músculo, así como en la actividad proteolítica con sustratos sintéticos del músculo y hepatopáncreas. Se realizó además una hidrólisis *in vitro* de las proteínas del músculo por las enzimas del hepatopáncreas, así como el monitoreo del comportamiento de textura y los parámetros térmicos medidos por Calorimetría de Barrido Diferencial (CBD) durante el almacenamiento en congelación del músculo. Así mismo se compararon, éstos parámetros con los de camarón azul silvestre. Se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre el camarón alimentado con 25 y 40% de proteína en longitud, peso, textura y actividad tripsina en el hepatopáncreas. Se observó una tendencia a aumentar a medida que se incrementa el contenido de proteína en el alimento. Así mismo se encontró una mayor hidrólisis de las proteínas nativas a 0, 4 y 25°C por las enzimas del hepatopáncreas del camarón alimentado con 40% de proteína.

Durante el almacenamiento en congelación por 3 meses se observó una pérdida de textura de 32, 40 y 48% en los camarones alimentados con 25, 35 y 40% de proteína respectivamente, así como una disminución en la entalpía de transición de la miosina. Al comparar con el camarón silvestre, se encontró que éste a pesar de que presentó una mayor actividad de tripsina en el hepatopáncreas y una menor textura al inicio, presentó una menor pérdida de textura durante su

almacenamiento en congelación. Se encontró una correlación de 0.99 entre la pérdida de textura y la entalpía de transición de la miosina y de 0.90 entre la pérdida de textura y la actividad de tripsina del hepatopáncreas de camarón cultivado.

Lo anterior nos indica que el nivel de proteína en el alimento afecta la actividad enzimática y las propiedades calorimétricas, que a reserva de realizar estudios más específicos contribuyen a una mayor pérdida de textura del músculo durante su almacenamiento en congelación.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la influencia del contenido de proteína en el alimento del camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) sobre la actividad proteolítica y parámetros calorimétricos, y relacionarlos con el ablandamiento del camarón durante el almacenamiento en congelación.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto del contenido de proteína en el alimento sobre el peso, longitud, composición y textura del músculo de camarón azul.
2. Determinar la influencia del contenido de proteína en el alimento del camarón azul sobre la actividad proteolítica total, tripsina, quimotripsina y aminopeptidasa del hepatopáncreas
3. Evaluar el efecto del contenido de proteína en el alimento sobre los cambios en firmeza y comportamiento térmico (Calorimetría de Barrido Diferencial), del músculo de camarón azul durante su almacenamiento en congelación.
4. Comparar la actividad proteolítica del hepatopáncreas, textura y parámetros calorimétricos entre el camarón azul silvestre y cultivado.

## ANTECEDENTES

### I. INTRODUCCIÓN

El camarón es un producto con alta demanda en el mercado mundial, lo que ha propiciado el incremento de su producción acuícola, y el interés de obtener productos de mayor calidad. En México, a pesar que durante los últimos 10 años la producción acuícola de camarón ha tendido más bien a la estacionalidad, los dos últimos años han sido importantes para su desarrollo, ya que la producción de camarón de acuicultura en 1999, presentó un aumento del 51.5% con respecto a 1997, siendo *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris* las dos especies principalmente cultivadas, (SEMARNAP, 2000).

Las investigaciones en cultivo de camarón se han enfocado a mejorar la producción a partir del conocimiento de su fisiología y requerimientos nutricionales, sin embargo se ha determinado que las condiciones de cultivo antes de la cosecha influyen en la calidad postcaptura de los organismos. Existen pocos estudios relacionados a los efectos de estas condiciones sobre la estabilidad durante el almacenamiento o procesamiento de estos productos (Haard, 1992a).

El lograr establecer las condiciones de cultivo que mejoren la estabilidad de los productos de acuicultura, aunado al mejoramiento de las condiciones de procesamiento de productos marinos, tendrá un importante impacto en la aceptación de estos productos por el consumidor.

## II. DIGESTIÓN Y NUTRICIÓN DEL CAMARÓN

Un factor importante en el cultivo del camarón es el alimento, y dentro de éste el tipo de proteína presente en la dieta, por lo que actualmente investigaciones relativas a estrategias de alimentación, donde se combina alimento natural con artificial, así como el porcentaje de inclusión de proteína artificial ha recibido mucha atención debido principalmente al alto costo del alimento artificial (Martínez-Córdova, 1998).

Con el desarrollo y expansión del mercado internacional del camarón de granja, el interés por la calidad de éstos productos durante su manejo postcaptura va en aumento, por lo que el productor de camarón necesita controlar las condiciones de cultivo y cosecha para asegurar esta calidad. Para poder conseguir lo anterior es necesario tener un amplio conocimiento de los procesos de nutrición y los requerimientos de las especies que se están manejando.

**2.1. Fisiología digestiva.** La fisiología digestiva de un animal puede afectar la disponibilidad de nutrientes, así como la digestibilidad de los alimentos. Se ha determinado en algunos estudios que diferentes especies de camarones, presentan diferencias significativas en actividad de enzimas digestivas, que se pueden atribuir a los diferentes hábitos alimenticios (Lee and Lawrence, 1997).

El aparato digestivo del camarón y de los crustáceos en general, se divide en tres partes, intestino anterior o estomodeo, intestino medio o mesenterón y el intestino posterior o proctodeo (Figura 1). Después de pasar por la boca, los alimentos

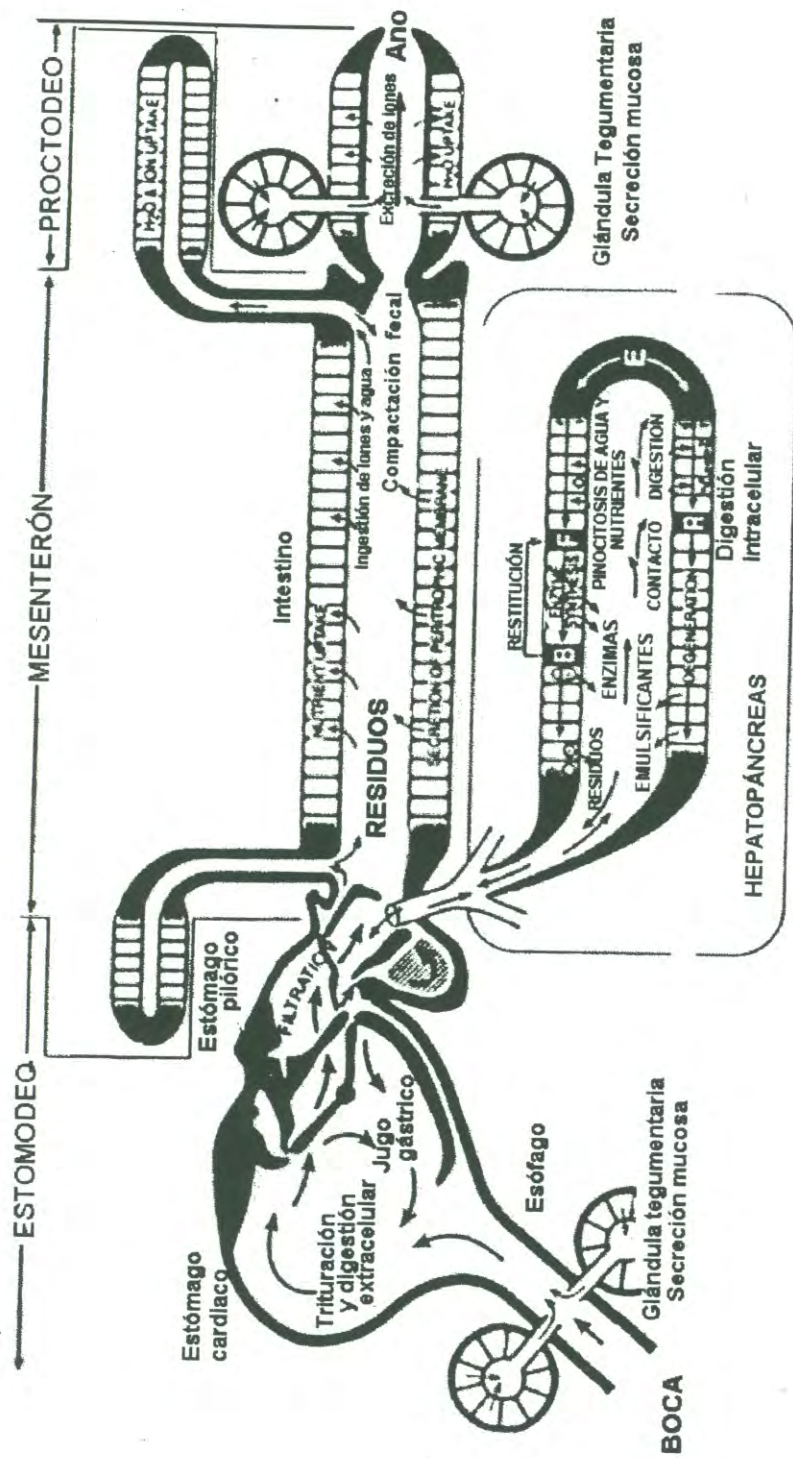


FIGURA 1. Tracto digestivo de crustáceos (Fuente: Concklin, 1995)

pasan por el esófago y luego al estómago, en donde se distinguen dos partes principales, el cardias y el 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-Suárez, 1994). En el hepatopáncreas o glándula digestiva, en ausencia de la digestión ácida como sucede con los vertebrados, se lleva a cabo la digestión enzimática. El hepatopáncreas tiene diversas funciones, tales como síntesis y secreción de enzimas digestivas, absorción de nutrientes y mantenimiento de reservas minerales y orgánicas (D'Abramo *et al.*, 1997).

**Hepatopáncreas.** El hepatopáncreas ocupa una gran parte del cefalotórax, está compuesto por un par de apéndices bien desarrollados, éstos están compuestos por hileras de túbulos ciegos que vierten su secreción al estómago, en estas estructuras se pueden distinguir cuatro tipos de células, conocidas como células F, E, R y B (Gibson, 1983). Las células B (del alemán blasenzellen) 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 (Cruz-Suárez, 1994). Vogt *et al.* (1985), observaron por microscopía electrónica la estructura de las células del hepatopáncreas de camarón alimentado con diferentes alimentos, encontrando que sólo la estructura de las células R son

sensibles a diferentes dietas, por lo que proponen a éstas células como monitor del valor nutricional de los alimentos.

Como ya se mencionó, en los crustáceos se lleva a cabo la digestión enzimática, en ausencia de la digestión ácida, por lo que en la glándula digestiva o hepatopáncreas se encuentra una gran cantidad de enzimas.

**Proteasas.** En el hepatopáncreas, el contenido de enzimas proteolíticas está constituido por endoproteasas que hidrolizan enlaces peptídicos en el interior de la cadena peptídica y por exoproteasas que cortan enlaces peptídicos aminoterminales, carboxiterminales y dipéptidos.

La mayoría de las enzimas proteolíticas identificadas en la glándula digestiva de camarones pertenecen a la familia de las serín proteasas tales como tripsina (Galgani *et al.*, 1984; Honjo *et al.*, 1990; Jiang *et al.*, 1991) quimotripsina (Tsai *et al.*, 1986; Tsai *et al.*, 1991, Van Wormhoudt *et al.*, 1992; Hernández-Cortés *et al.*, 1997), además de las enzimas aminopeptidasa (Jiang *et al.*, 1991; Lan and Pan, 1991) y carboxipeptidasas (Gates and Travis, 1973).

La actividad de tripsina representa aproximadamente el 60% de la actividad proteolítica del hepatopáncreas de algunas especies de camarones. Debido a la alta especificidad de esta enzima por los aminoácidos básicos lisina y arginina, esenciales en la nutrición del camarón, es importante la calidad de la proteína que se utilicen en su alimentación. Se ha detectado un inhibidor de tripsina en el hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei*, que se presume interviene en el mecanismo de regulación enzimática (García-Carreño *et al.*, 1998), pero aún los



mecanismos de regulación de síntesis y secreción de enzimas en el hepatopáncreas no son del todo claras.

Al parecer, la producción de enzimas en el hepatopáncreas es controlada por hormonas del pedúnculo ocular. La 20-OH ecdisona estimula la síntesis protéica y la síntesis de RNA en el hepatopáncreas (Carrillo y González, 1998). Van Wormhoudt *et al.* (1995) localizaron la síntesis de amilasa y quimotripsina en las células tipo F en camarón blanco la actividad y cantidad de mRNA de quimotripsina variaron con el ciclo de muda. Además se ha reportado cambio en la actividad enzimática digestiva por efecto del ayuno, edad, calidad y cantidad de proteína en el alimento (Lee *et al.*, 1984; Maugle *et al.*, 1984; Le Moullac *et al.*, 1994; Rodriguez *et al.*, 1994; Le Moullac *et al.*, 1996; Ezquerro *et al.*, 1997, Ezquerro *et al.*, 1999).

**Lipasas.** La digestión de lípidos se lleva a cabo por lipasas y esterases. En el hepatopáncreas de los crustáceos es necesaria la emulsificación de los lípidos para que puedan ser digeridos, aunque en camarones peneidos no se han identificado los emulsificantes presentes, en crustáceos al parecer actúan sustancias derivadas de la taurina, ácido cólico y desoxicólico (Dall, 1992; Cruz-Suárez, 1994).

En camarones peneidos no se han caracterizado lipasas, sólo se tienen reportes de actividad lipolítica en *P. vannamei*, *P. stylirostris*, *P. setiferus* (Lee and Lawrence, 1982) y en *P. monodon* (Deering *et al.*, 1996).

**Carbohidrasas.** Los crustáceos tienen una baja capacidad para utilizar los carbohidratos como fuente de energía, pero se ha detectado en el hepatopáncreas

actividad de amilasas, maltasas, quitinasas y algunas veces celulasas. Sólo se han realizado estudios de caracterización en *P. japonicus* y *P. monodon*, en el primero se han caracterizado una  $\alpha$ -amilasa (Maugle *et al.*, 1982), glucosidasa, manosidasa y galactosidasa; y en *P. monodon* manosidasa y fructosidasa (Chuang *et al.*, 1991; Chuang *et al.*, 1992).

**2.2. Requerimientos nutricionales.** El desarrollo de dietas comerciales para el cultivo de camarón, en su gran mayoría se han basado en procesos empíricos o intuitivos (Dall, 1992). Los estudios nutricionales para camarón se iniciaron a principios de los 70's, pero es necesario considerar que éstos requerimientos, varían dependiendo de la talla, especie, condiciones de cultivo, estado fisiológico, formulación y procesamiento del alimento (Akiyama *et al.*, 1993). Se cree que al igual que los peces y animales terrestres, los camarones requieren aproximadamente 40 nutrientes esenciales, a continuación se describen los más importantes.

**Proteínas.** Los requerimientos proteicos de los camarones se encuentran en un rango de 30-60%, variando por distintos factores tales como especie, tamaño, fuente de proteína, porcentaje de energía no protéica y manejo de la alimentación, entre otros (Lim and Akiyama, 1995). Debido a que la proteína es el ingrediente más costoso en la formulación de las dietas, la mayoría de las investigaciones se han enfocado a determinar los niveles protéicos óptimos. En la tabla 1 se

muestran los requerimientos proteicos recomendados para diferentes especies de camarón en su etapa adulta (Conklin, 1995; Lim and Akiyama, 1995).

Un nivel inadecuado de proteína en la dieta puede ocasionar un menor crecimiento de los organismos, ya que la proteína consumida es usada para mantener las funciones vitales, y solo una parte es usada para la síntesis de nuevo tejido, esto se debe a que con un nivel adecuado de proteína, como se observó en *Penaeus esculentus*, presentó un 93.1% de proteína retenida para el crecimiento, comparada con un 54.5 y 48.5% en niveles fuera de los óptimos (Hewitt, 1992).

Los aminoácidos que se consideran esenciales para camarones son metionina, arginina, treonina, triptófano, histidina, isoleucina, leucina, lisina, valina y fenilalanina. En el camarón, como en otros organismos, existe una relación dietética entre lisina y arginina, conocida como antagonismo lisina-arginina, este fenómeno se da cuando existen cantidades excesivas de cualquiera de estos aminoácidos y se recomienda una relación 1:1 a 1:1.1 para camarón (Akiyama *et al.*, 1993).

**Lípidos.** Los lípidos son necesarios en la dieta de los camarones no sólo por su valor energético, sino por ser una fuente de ácidos grasos esenciales, fosfolípidos y vitaminas liposolubles (Lim and Akiyama, 1995). Los niveles recomendados de lípidos en la dieta de los camarones varía entre 6 y 7.5%, se ha visto que niveles por arriba del 10% ocasionan un menor crecimiento y una alta mortalidad de los organismos (Akiyama *et al.*, 1993).

**TABLA 1.** Requerimientos proteicos de diferentes especies de camarón en su etapa adulta.

ESPECIE	NIVEL DE PROTEÍNA (%)
<i>Penaeus japonicus</i>	55-60
<i>P. monodon</i>	35-46
<i>P. vannamei</i>	25-36
<i>P. stylirostris</i>	25-40
<i>P. aztecus</i>	23-40
<i>P. dourarum</i>	40
<i>P. semisulcatus</i>	40
<i>P. plebejus</i>	40
<i>P. indicus</i>	43
<i>P. setiferus</i>	28-32
<i>P. californiensis</i>	31
<i>P. merguensis</i>	34-50
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	25-40

Fuente: Cruz-Súarez, 1994

Los ácidos grasos poliinsaturados como el linoléico, linolénico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico son esenciales en la dieta de los camarones, lo mismo que los fosfolípidos, ya que se requieren para el transporte del colesterol y triglicéridos. El colesterol también se considera esencial en la dieta de los camarones, ya que son incapaces de sintetizar el anillo esteroideo, y éste es utilizado por el organismo para la síntesis de hormonas de la muda, sexuales, ácidos biliares y vitamina D (Akiyama *et al.*, 1993).

**Carbohidratos.** La utilización de carbohidratos por los crustáceos en general, como fuente de energía es limitada, pero su inclusión en la dieta permite que parte de la proteína ingerida sea utilizada para el crecimiento (Cruz-Suárez, 1994).

Además de ser una fuente de energía también pueden ser utilizados por el camarón en la síntesis de metabolitos intermediarios importantes tales como aminoácidos no esenciales, ácidos nucleicos y quitina (Akiyama *et al.*, 1993). A pesar de que el valor nutricional real de muchas fuentes de carbohidratos no es aún muy clara, se ha establecido que los camarones peneidos son capaces de utilizar carbohidratos complejos, tales como el almidón, más eficientemente que los monosacáridos, como la glucosa, debido al parecer, a una rápida absorción de la glucosa a la hemolinfa (D'Abramo *et al.*, 1997).

**Vitaminas.** Las vitaminas son compuestos orgánicos complejos necesarios para el crecimiento, metabolismo y reproducción de los camarones. Los requerimientos vitamínicos de los camarones no son del todo bien conocidos, pero se sabe que

son afectados por la talla, edad, tasa de crecimiento, condiciones ambientales e interacciones entre nutrientes (Cruz-Suárez, 1994).

Se ha establecido que tres vitaminas liposolubles (A, D y K) y diez hidrosolubles (tiamina, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, biotina, ácido fólico, vitamina B<sub>12</sub>, inositol, colina y vitamina C) son esenciales para el crecimiento del camarón (Lim and Akiyama, 1995).

Generalmente los alimentos para camarón están sobrefortificados por diversas razones, entre ellas, que se desconoce con exactitud sus requerimientos, por otro lado, los camarones son comedores lentos y el alimento puede permanecer por horas en el agua, lo que ocasiona que algunas vitaminas, principalmente las hidrosolubles, presenten lixiviación, y por último, debido a la poca estabilidad de las vitaminas a los procesos de elaboración de los alimentos. Por lo anterior la sobrefortificación de vitaminas "garantiza" que los niveles de vitaminas necesarios permanezcan en el alimento (Akiyama *et al.*, 1993).

**Minerales.** Los minerales tienen diversas funciones en el organismo de los camarones, entre ellas, son requeridos para los procesos de regulación osmótica, balance ácido-base, como coenzimas y además forman parte del exoesqueleto.

El camarón como la mayoría de los organismos acuáticos es capaz de absorber o excretar los minerales contenidos en el agua a través de las branquias, por lo que los requerimientos de minerales dependerán grandemente de la concentración de éstos en el medio ambiente acuático (Akiyama *et al.*, 1993).

El calcio no es esencial en la dieta de los camarones, pero es suplementado en el alimento para mantener la relación calcio:fósforo, que se ha visto es benéfica para

el crecimiento de los organismos y varía según la especie, para *Penaeus vannamei* se ha reportado una relación 1-2:1 y para *Penaeus californiensis* de 2.1-2.4:1 (Lim and Akiyama, 1995). Ya que el fósforo no puede ser aprovechado del medio ambiente acuático, sus requerimientos son elevados, de alrededor del 1.5% de la dieta.

El suministro de magnesio y potasio tienen efectos benéficos en el crecimiento, al contrario que el hierro, el cual se ha visto que tiene un efecto depresivo en el crecimiento (Cruz-Suárez, 1994).

### **III. CALIDAD Y DETERIORO POSTCAPTURA DE CAMARÓN**

La aceptación de los productos marinos por el consumidor depende de varios atributos de calidad, principalmente color, sabor, olor y textura, además de su calidad sanitaria y nutricional (Haard, 1992a).

En camarón como en el resto de los productos marinos, la calidad se ve influenciada tanto por las condiciones de crecimiento como por el manejo postcaptura. Además, es importante destacar que el ablandamiento postmortem del músculo de estos productos es una de sus características más desfavorables, en contraste con la carne de mamíferos, debido principalmente a su alta actividad enzimática endógena y al bajo contenido de colágeno en su estructura muscular (Dunajski, 1979; Tsuchiya *et al.*, 1992).

### 3.1. Calidad postcaptura de camarón

**Color.** El color es una característica importante en los crustáceos en general, el color de la piel y exoesqueleto de los camarones durante su manejo postmortem está dado por la astaxantina y otros carotenoides. Depende directamente de los carotenoides ingeridos durante su crecimiento, ya que son incapaces de sintetizarlo. Algunas especies de camarones de agua dulce son capaces de convertir el  $\beta$ -caroteno en astaxantina y almacenarla en forma de carotenoproteínas (Haard, 1992a). Por otro lado, se ha visto, que los carotenoides de salmón y camarón son particularmente sensibles a la oxidación, por lo que bajo condiciones de congelación, la pérdida de color de estos productos es debida a la oxidación de los enlaces insaturados de la astaxantina (Haard, 1992b).

Otro importante cambio en el color de los camarones durante su manejo postmortem, y que disminuye considerablemente su valor comercial es la llamada melanosis o "blackspot". Esta es causada por la oxidación de los compuestos fenólicos a o-quinonas por la acción de la enzima endógena feniloxidasas, que es activa en condiciones de refrigeración y enhielado, además mantiene su actividad después del descongelado. La melanosis consiste en una coloración oscura en el exoesqueleto, generalmente alrededor del cefalotórax y los pleópodos (Haard, 1992b; Otwell *et al.*, 1992).

Anteriormente se utilizaban sulfitos como inhibidores de la feniloxidasas, pero debido a las reacciones secundarias que ocasiona su consumo, se han probado otros productos como inhibidores de su actividad, tales como 4-hexilresorcinol



(Otwell *et al.*, 1992), ácido kójico (Chen *et al.*, 1991), ácido láctico (Benner *et al.*, 1994) y atmósferas modificadas (Chen *et al.*, 1993).

**Sabor.** Los compuestos responsables del sabor en los productos marinos son aminoácidos libres, péptidos, ácidos orgánicos, bases cuaternarias de amonio y minerales (Haard, 1992a). La concentración de aminoácidos libres en los camarones es el doble de la concentración que generalmente se encuentra en los vertebrados, y se les ha atribuido que son responsables del sabor, especialmente la glicina, que contribuye al sabor dulce del camarón, además del ácido glutámico, leucina y prolina (Finne, 1985).

Por otro lado, algunos aminoácidos son osmolitos importantes en los camarones, por lo que las condiciones medio ambientales de salinidad afectarán las características de sabor de estos productos. McCoid *et al.* (1984) al trabajar con *Penaeus vannamei* encontraron que al disminuir la salinidad del medio disminuye la concentración de aminoácidos libres, principalmente de glicina, prolina, arginina, serina/treonina y alanina, que representan de un 93 a un 96% del total de aminoácidos libres en el músculo.

Debido a que la solubilidad de los aminoácidos libres en agua es alta, se ha visto que durante el manejo en hielo del camarón, el goteo o exudación del músculo arrastra muchos de estos compuestos, ocasionando pérdida del sabor de la porción comestible y hasta el desarrollo de un sabor amargo (Cobb *et al.*, 1974; McCoid *et al.*, 1984). Cobb *et al.* (1974) encontraron que después de cierto tiempo de almacenado en hielo el contenido de glicina y prolina disminuye un 64 y 81% respectivamente.

**Textura.** La textura del músculo de camarón es un factor importante en su calidad, ésta se ve afectada por diversos factores intrínsecos y extrínsecos, por ejemplo la especie, edad, factores antemortem, tales como temperatura, alimentación, condiciones de estrés, así como la composición química y el manejo postcaptura (Dunajki, 1979).

El pronunciado ablandamiento postmortem del músculo de camarón es probablemente una de sus características más desfavorables, en comparación con la carne de mamíferos, debido a su alta actividad enzimática endógena, y a la mayor susceptibilidad a la hidrólisis del colágeno presente en la estructura muscular (Kimura and Tanaka, 1986; Sivakumar *et al.*, 1997; Tsuchiya *et al.*, 1992).

La textura en el músculo de camarón y de los productos marinos en general, es evaluada sensorialmente presionando con los dedos en músculo crudo y por la sensación al morder el músculo cocido. Se han desarrollado pocos métodos instrumentales en contraste con la carne de mamíferos. Luzuriaga *et al.* (1997), desarrollaron un método instrumental para medir los cambios de textura en camarón basado en medir la elasticidad y compararon los resultados obtenidos con los del Instron, y lo proponen como un índice de calidad para camarón.

### **3.2. Deterioro de la calidad postmortem en camarón**

Después de la muerte del camarón y de los organismos marinos en general, sobrevienen cambios químicos, microbiológicos y enzimáticos importantes, que de no ser controlados provocan el deterioro del producto.

El mejor método más utilizado para mantener la calidad de los productos marinos por mayor tiempo, es el uso de bajas temperaturas, sin embargo, aún en estas condiciones el camarón presenta un deterioro importante en su textura, ocasionada principalmente por la acción enzimática y los cambios físicos en su estructura muscular, a continuación se describen más detalladamente estas dos causas de deterioro.

**Deterioro de textura por actividad proteolítica.** Las enzimas catalizan reacciones que pueden tener un impacto positivo o negativo en los índices de calidad en los alimentos, *i.e.*, sabor, olor, color, consistencia, nutricio o seguridad (Haard, 1994). En algunos trabajos se ha establecido que los cambios bioquímicos post-cosecha causados por enzimas endógenas es la primera causa de la pérdida de calidad en crustáceos como el krill al almacenarse en hielo (Kawamura *et al.*, 1981; Baranoski *et al.*, 1984).

Ha sido ampliamente reconocido que las enzimas proteolíticas juegan un papel importante en el ablandamiento del músculo, durante el almacenamiento postmortem de camarón (Haard, 1994). Se ha detectado que esta degradación es más pronunciada en la región adyacente a la glándula digestiva, debido probablemente a que existe una migración de las enzimas digestivas hacia el músculo (Lightner, 1973; Nip *et al.*, 1985). La destrucción de la integridad normal de la célula, generalmente ocurre durante el procesamiento de los alimentos, liberando las enzimas de los compartimentos naturales de la célula. Las enzimas digestivas pueden liberarse dentro del músculo y disminuir así la vida media del camarón (Jiang *et al.*, 1991; Yan *et al.*, 1994).

Existen pocas investigaciones en cuanto a las enzimas proteolíticas del tipo digestivo en el músculo del camarón, Doke and Ninjoor (1987), reportaron la presencia de una proteasa alcalina con actividad tipo-tripsina en el músculo de camarón *Penaeus indicus* con actividad óptima a pH 8 y 60°C.

Ya que la cantidad de enzimas endógenas presentes en el tejido pueden ser drásticamente influenciadas por factores específicos como la edad biológica, la dieta, la salinidad del agua, el ejercicio, y la presión hidrostática (Haard, 1992a; Haard, 1994). Así mismo como el origen de las proteasas del tipo digestivo en el tejido, responsables del ablandamiento del músculo no está completamente entendido, es necesario el desarrollo de estudios más específicos donde se relacione el manejo durante el cultivo con la actividad enzimática.

**Pérdida de textura durante el congelado.** La congelación de productos marinos es actualmente muy usada, la ventaja de este proceso es que se detiene por completo la acción microbiana y se retardan las reacciones enzimáticas endógenas, manteniéndose así una calidad aceptable del producto por un período de tiempo relativamente largo.

Por otro lado, el deterioro físico del producto es inevitable durante el congelado, a pesar de que se han optimizado procesos y ampliado el uso de crioprotectores. Este daño físico, que ocasiona la pérdida de textura, se da debido principalmente a que las proteínas del músculo de productos marinos son más frágiles en estructura y son mucho más susceptibles a los factores desnaturalizantes tales como almacenamiento a baja temperatura, calentamiento y degradación enzimática, que las proteínas de mamíferos (Matsumoto, 1980).

Uno de los factores que más afectan la textura del músculo es la velocidad de congelación, ya que cuando se da una congelación lenta se forman grandes cristales de hielo primero en el espacio extracelular. Esto al parecer es porque el agua aquí contenida tiene un punto más alto de congelación, por su menor contenido de sales. Además la presión de vapor del hielo es más baja, el agua que se encuentra interaccionando con las proteínas intracelularmente, tiende a migrar hacia el exterior, formando cristales más grandes. Debido a esa diferencia en la concentración de sales y al cambio en el pH del medio, las proteínas miofibrilares sufren una desnaturalización y por lo tanto una agregación al aumentar las interacciones proteína-proteína (Matsumoto, 1980; Fennema, 1996).

Además de la formación de cristales, se ha propuesto que durante el almacenamiento en congelación, se dan otros acontecimientos que contribuyen a la desnaturalización de las proteínas miofibrilares, ocasionando el deterioro de la textura, tales como: 1. El efecto de la concentración de sales inorgánicas en la fase líquida del sistema congelado, en donde posiblemente algunos cationes divalentes forman enlaces cruzados al reaccionar con los grupos ácidos ionizados de las cadenas laterales de las proteínas miofibrilares (Sikorski, 1990); 2. La reacción de las proteínas con lípidos y sus productos de oxidación, que forman enlaces covalentes con los grupos reactivos de las proteínas; 3. La reacción con formaldehído derivado de la trimetilamina, 4. La autooxidación de lípidos; y el posible efecto de otras proteínas solubles en agua, tales como proteasas. Como consecuencia de lo anterior, la molécula de miosina sufre una agregación, formando enlaces cruzados, causando una menor interacción de las proteínas

con las moléculas de agua, perdiendo irreversiblemente la capacidad de retención de agua, ya que existe una mayor afinidad por los enlaces proteína-proteína que por las interacciones proteína-agua (Fennema, 1996).

El decremento en la actomiosina soluble se correlaciona con la evaluación sensorial, se ha propuesto que la desnaturalización de la actomiosina es la principal causa de la pérdida de calidad del pescado almacenado en congelación (Matsumoto, 1980). Estudios con Calorimetría de Barrido Diferencial (CBD), han mostrado que la miosina del músculo de pescado, es la que se ve afectada principalmente por el congelamiento, disminuyendo su entalpía de transición al sufrir una desnaturalización (Poulter *et al.*, 1985; Dondonero *et al.*, 1996).

Existen muy pocos estudios en el efecto del congelamiento en la textura de crustáceos. Reddy *et al.* (1981) evaluaron los cambios en ácidos grasos durante el almacenamiento en congelación de *Macrobrachium rosenbergii*, observaron que después de 6 meses el contenido lipídico disminuyó un 11%, y a pesar de que no se encontró correlación entre la evaluación sensorial y la oxidación de lípidos, suponen que la pérdida de textura del músculo se da por la interacción de los ácidos grasos libres y los productos de la oxidación con las proteínas miofibrilares.

**3.3. Índices químicos de deterioro en camarón.** Existen un gran número de investigaciones que han evaluado el comportamiento postmortem del camarón usando diferentes índices químicos o fisicoquímicos, para tratar de establecer objetivamente el estado del producto, sin tener hasta ahora uno que por sí solo lo

indique, como sucede con el pescado. A continuación se hace una descripción de los índices químicos que más se han usado en camarón.

**Indol.** El indol es un producto de la degradación del triptófano, es generalmente usado por FDA para validar la evaluación sensorial de camarón. Las categorías usadas para esta evaluación son: clase 1, en la que no se detecta olor a descomposición; clase 2, es la primera etapa en que se empieza a desarrollar un ligero olor a descomposición; y la clase 3, es en la que se percibe un fuerte olor a descomposición. La relación con el contenido de indol es para la clase 1 menos de 25  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , y para la clase 2 y 3 mayor o igual a 25  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  (Chang *et al.*, 1983).

El contenido de indol ha sido propuesto como indicador de la descomposición de camarón y ostión desde 1940. Se ha establecido que la producción de indol en camarón es por acción bacteriana, por lo que se relaciona con el abuso de temperatura del producto antes de su proceso (Cobb, 1973).

El triptófano es un aminoácido esencial en la dieta de los camarones peneidos, se ha determinado un contenido de triptófano de 1-425  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  en diferentes especies (Finne, 1985).

Estudios realizados por Chang *et al.*(1983), con *P. setiferus* y *P. dourarum* almacenados a diferente temperatura, demostraron que este factor es el que principalmente afecta la acumulación de indol en camarón durante su almacenamiento, debido a la acción de bacterias mesófilas. Además se observó

que no existe una correlación entre la descomposición y el contenido de indol (Chang *et al.*, 1983).

**Trimetilamina.** Los productos de la descomposición del óxido de trimetilamina (TMAO), importante osmolito en camarones, han sido relacionados con la descomposición de productos marinos, por ser originados por acción bacteriana. Existen dos reacciones de degradación del TMAO en el músculo post-mortem, y ambas contribuyen al deterioro de la calidad (Finne, 1985)

El TMAO es degradado enzimáticamente a Trimetilamina (TMA) por microorganismos TMAO-reductasa positivos durante el almacenamiento en refrigeración o en hielo. TMA es una amina volátil con olor y sabor característicos similar a la amonía, por lo que se ha relacionado con el crecimiento bacteriano y descomposición (Finne, 1985).

La segunda reacción de descomposición del TMAO en músculo post-mortem es la formación de Dimetilamina (DMA) y formaldehído, y se lleva a cabo tanto enzimática como no enzimáticamente en el músculo post-mortem congelado. El formaldehído producido interacciona con los grupos amino libres de la proteína miofibrilar contribuyendo al deterioro de las proteínas y la posterior pérdida de textura (Finne, 1985).

**Degradación de nucleotidos.** La degradación post-mortem de Adenosina Trifosfato ha sido ampliamente estudiada como índice de frescura en productos marinos (Botta, 1994). Arai (1966) observó que los nucleótidos de adenina en camarón *Pandalus hypsinotus* pueden ser degradados por dos reacciones diferentes como se muestra en la figura 2. Esta degradación es por acción



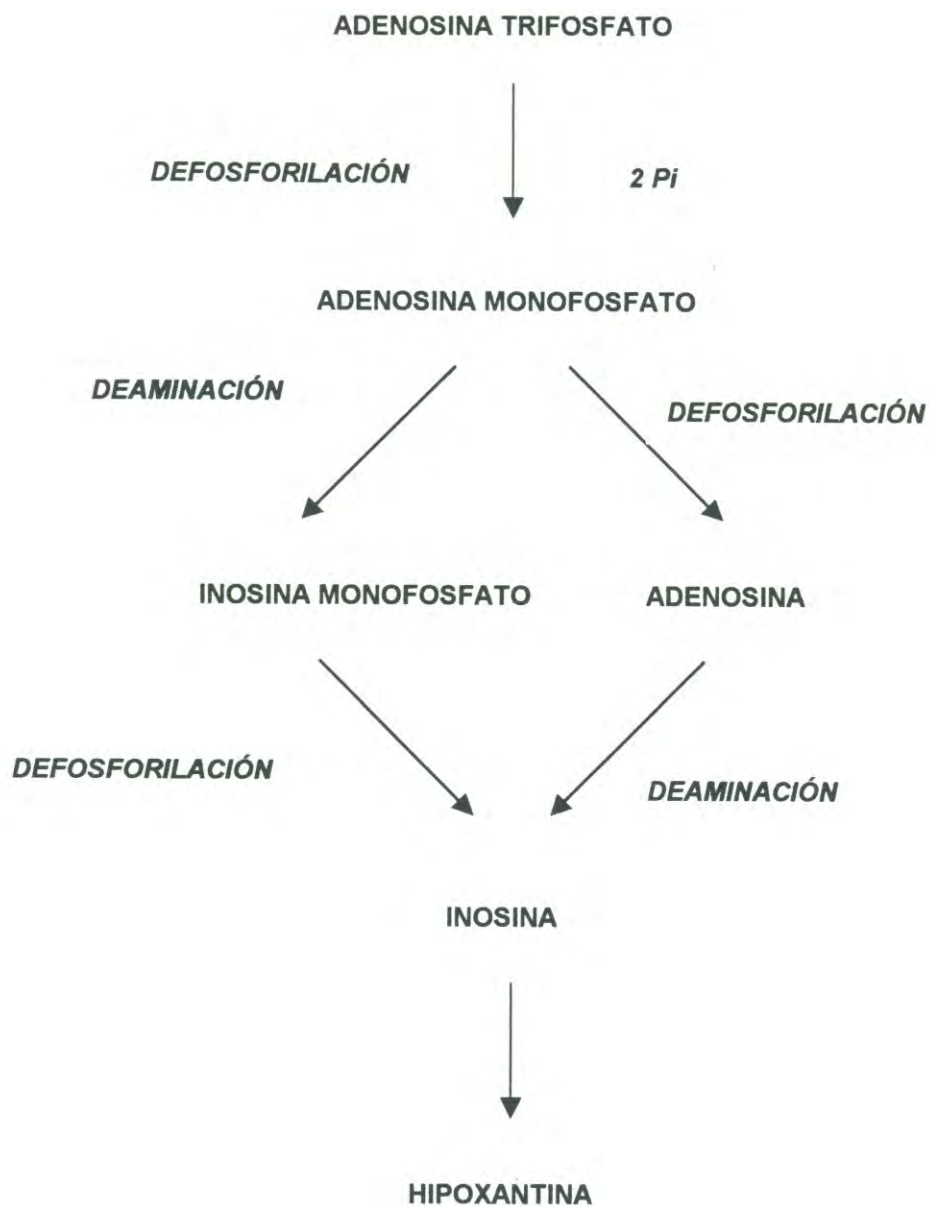


FIGURA 2. Degradación autolítica de nucleótidos en camarón.

enzimática endógena; a excepción de la hipoxantina, la cual resulta de la acción enzimática tanto endógena como bacteriana a partir de inosina (Stone, 1971).

En crustáceos vivos predomina la concentración de Adenosina Trifosfato (ATP), Adenosina Difosfato (ADP) y Adenosina Monofosfato (AMP) el balance entre estos metabolitos es un importante factor en la regulación del metabolismo celular que puede ser descrito o representado por la "carga energética de adenilatos" ( $AEC = \frac{[ATP] + 1/2[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$ ). En organismos vivos en condiciones fisiológicas normales no se encuentra IMP, puesto que no tiene función metabólica importante, se ha determinado la acumulación de IMP se lleva a cabo en el camarón con vida durante condiciones de elevado estrés, contaminación o después de su muerte, al activarse la enzima AMP deaminasa (Paterson, 1993).

Diversos estudios sugieren el uso del contenido de IMP e hipoxantina como índices de calidad en camarón (Fatima *et al.*, 1981; Onnen and Zebe, 1983; Stone, 1971). Es importante señalar que dependiendo de la especie, origen y estrés durante la captura de camarón, el contenido de IMP varía considerablemente, por lo que no es posible generalizar para camarones, que estas dos mediciones puedan ser utilizadas como índices de calidad (Paterson, 1993; Paterson *et al.*, 1995).

Cheuk (1979) determinó la actividad y estabilidad de las enzimas adenosina deaminasa y adenosina monofosfato deaminasa, que catalizan las reacciones de deaminación de adenina y de AMP a inosina e IMP, respectivamente, proponiendo ésta determinación como índice de calidad o frescura para camarón. Cheuk (1979)

observó una mayor actividad y estabilidad de la enzima adenosina deaminasa que de adenosina monofosfato deaminasa tanto en *P. dourarum* como en *P. aztecus*.

**Nitrógeno volátil total (TVN)/ aminoácidos libres (AAN).** La producción de nitrógeno volátil post-mortem en camarón se debe a la acción enzimática bacteriana y endógena en el músculo, involucrando en las reacciones a los aminoácidos libres, bases púricas y pirimidinas (Cobb *et al.*, 1971).

Yeh *et al.* (1978) reportaron la actividad de tres enzimas nativas del músculo de camarón *P. setiferus* productoras de amoníaco durante el almacenamiento post-mortem: arginasa, adenosina deaminasa y AMP deaminasa. Las más activas son las dos últimas, además la enzima arginasa no produce amoníaco directamente, en su reacción cataliza la producción de urea, que posteriormente es degradada a amoníaco por bacterias urea-positivas. Yeh *et al.* también determinaron que estas enzimas son dependientes de temperatura y pH, alcanzando una actividad máxima a 37°C y pH 8.5.

La concentración de aminoácidos libres en la mayoría de los crustáceos es el doble que la concentración que se encuentra normalmente en vertebrados, la pérdida de aminoácidos libres durante el almacenamiento en refrigeración, se da por dos motivos, por la degradación bacteriana y por la pérdida de aminoácidos por goteo del músculo (Cobb, 1974).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### REACTIVOS

Los reactivos utilizados en el presente trabajo fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. Substratos: Azocaseína, Benzoil-Arg-*p*-nitroanilida (BAPNA), Succinil-Ala-*p*-nitroanilida (SAPNA), Leucina-*p*-nitroanilida (Leu-*p*-NA), Glicina -*p*-nitroanilida (Gli-*p*-NA), Lisina-*p*-nitroanilida(Lis-*p*-NA), Prolina-*p*-nitroanilida (Pro-*p*-NA). Buffer: Fosfato de sodio y Tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS). Ácido tricloroacético (TCA), Ácido acético, Dimetil sulfóxido (DMSO), Reactivo fenólico de Folin y Ciocalteu, y Albúmina de bovino como estándar.

### MATERIA PRIMA

**Camarón cultivado.** Las muestras de camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) cultivado fueron proporcionados por el laboratorio experimental DICTUS-UNISON Unidad Kino. Los cuales de acuerdo a la bitácora de control fueron alimentados de la siguiente manera: Tratamiento 1: 25% de proteína en la dieta, Tratamiento 2: 35% de proteína y Tratamiento 3: 40% de proteína en la dieta. En la tabla 2 se presenta la composición de las dietas que se les proporcionó durante su crecimiento.

**Camarón silvestre.** El camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) silvestre, fue capturado en la Bahía de Guaymas en el mes de Enero del 2000.

**TABLA 2.** Composición proximal de las dietas suministradas durante el cultivo del camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*).

COMPONENTE (%)	TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3
HUMEDAD <sup>1</sup>	12.0	12.0	12.0
PROTEÍNA <sup>2</sup>	25.0	35.0	40.0
GRASA <sup>2</sup>	8.5	8.0	8.0
FIBRA CRUDA <sup>1</sup>	5.0	5.0	4.0
CENIZAS <sup>1</sup>	10.5	10.0	10
CALCIO <sup>2</sup>	1.0	1.4	1.5
FOSFORO <sup>2</sup>	0.7	0.90	1.0
E.L.N.	41.0	30.0	26

FUENTE: PURINA S.A. DE C.V.

<sup>1</sup> Contenido máximo; <sup>2</sup> Contenido mínimo; E.L.N.= Energía Libre de Nitrógeno.

## I. MANEJO DE LA MUESTRA

Las muestras se almacenaron en hielo inmediatamente después de su captura y se trasladaron al Laboratorio de Productos Marinos del DIPA-UNISON, donde se realizaron mediciones de longitud y peso a 12 organismos al azar por cada tratamiento. Posteriormente los camarones se decapitaron manualmente, se pesó el músculo y se congelaron por separado las cabezas y colas a  $-25^{\circ}\text{C}$ , las cuales se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para realizarle los análisis que se describen más adelante.

## II. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DEL HEPATOPÁNCREAS (HP) Y MÚSCULO DEL CAMARÓN.

### 2.1. Extracción de las proteasas del camarón.

**Hepatopáncreas.** Se removió el hepatopáncreas de cinco organismos y se homogeneizó en un volumen de agua (p/v) con un bio-homogeneizador Modelo M133/1281-0 (Biospec Products, Inc. Bartlesville, OK.) a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente el homogeneizado se centrifugó a  $11,300 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos. El sobrenadante se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis (García-Carreño and Haard, 1993).

**Músculo.** Se homogeneizó el músculo de dos organismos con 10 volúmenes (p/v) de buffer de fosfato de sodio 0.01M pH 7.6 durante aproximadamente 2 minutos, con un biohomogeneizador Modelo M133/1281-0 (Biospec Products, Inc. Bartlesville, OK.), se dejó en reposo por 1 hora, y posteriormente se centrifugó a

12,100 x g por 30 minutos a 4°C en una centrifuga Eppendorf (Centrifuga 5810 R, Brinkmann instrument, Inc. Westbury, N.Y.), de acuerdo a Yan *et al.* (1994).

Todas las operaciones antes descritas se efectuaron a una temperatura entre 0-4°C, usando baño de hielo, el sobrenadante obtenido fue utilizado como extracto crudo de enzimas del músculo de camarón.

## **2.2. Ensayos de actividad proteolítica del hepatopáncreas**

**Hidrólisis de azocaseína.** La actividad proteolítica se determinó en tubo usando como sustrato azocaseína al 1% en Buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5. Se mezcló 0.5 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 con 0.5 ml de Azocaseína al 1%, corriendo un control a la vez. La reacción se inició al agregar 10 µl del extracto y se detuvo a los 10 minutos agregando 0.5 ml de TCA 20%. Al control se le agregó TCA antes que el sustrato. Después de incubar a 4°C por 1 hora, se centrifugó a 16,500 x g por 5 minutos, y se leyó la absorbancia a 366 nm. La actividad es reportada como (Abs<sub>366</sub>/min)/mg de proteína (Erlanger *et al.*, 1961).

**Actividad de tripsina.** Se utilizó como sustrato benzoil-Arg-*p*-nitroanilina (BAPNA), se disolvió en 1 ml de DMSO para hacer 1 mM, y se aforó a 100 ml con buffer TRIS 50 mM pH 7.5, conteniendo 20 mM CaCl<sub>2</sub>. A 1.25 ml de la solución de sustrato se agregó 10 µl del extracto enzimático, después de 10 minutos se detuvo la reacción con 0.25 ml de ácido acético 30%, y se leyó absorbancia a 410 nm. La actividad de tripsina es reportada como unidades de actividad (Abs<sub>410</sub>/min)/mg de proteína (Erlanger *et al.*, 1961).

**Actividad de quimotripsina.** La actividad tipo quimotripsina se midió usando succinyl-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Phe-*p*-nitroanilida (SAPNA) como sustrato, 20  $\mu$ l de la preparación enzimática se agregaron a una solución conteniendo 50  $\mu$ l de sustrato (0.02 mM SAPNA) y 590  $\mu$ l de una solución amortiguadora TRIS-HCl a un pH 7.8 conteniendo CaCl<sub>2</sub> 0.01M, después de 5 minutos la reacción se detuvo agregando 0.25 ml de ácido acético al 30%, la reacción se llevó a cabo a 37°C. La absorbancia se leyó a 410 nm. Una unidad de actividad tipo quimotripsina se reporta como unidades de actividad (Abs<sub>410</sub>/min)/mg de proteína (García-Carreño *et al.*, 1994).

**Actividad aminopeptidasa.** La actividad aminopeptidasa se evaluó usando como sustratos Leucina *p*-nitroanilida (Leu-*p*-NA), Glicina *p*-nitroanilida (Gli-*p*-NA), Prolina *p*-nitroanilida (Pro-*p*-NA) y Lisina *p*-nitroanilida (Lis-*p*-NA). A 0.95 ml de sustrato se le agregó 50  $\mu$ l del extracto enzimático, la reacción se llevó a cabo a 37°C. Después de 15 minutos la reacción se detuvo agregando 0.25 ml de ácido acético 30% y la absorbancia se midió a 410 nm. Una unidad de actividad se define como unidades de actividad (Abs<sub>410</sub>/min)/ mg de proteína (Pfeiderer, 1970).

### **2.3 Ensayos de actividad proteolítica del músculo de camarón**

En el músculo de camarón se evaluó la actividad sobre azocaseína, tipo tripsina y tipo quimotripsina como se describió para el hepatopáncreas.



### **III. COMPOSICIÓN PROXIMAL DEL MÚSCULO DE CAMARÓN**

Se tomaron al azar los músculos de tres organismos por cada tratamiento, se homogeneizaron y se determinó el contenido de proteína, humedad, lípidos y cenizas de acuerdo a la metodología descrita por la A.O.A.C. (1990). Los análisis se realizaron por triplicado.

### **IV. MEDICIONES FISICOQUÍMICAS EN EL MÚSCULO DE CAMARÓN**

**4.1. Determinación de textura en el músculo de camarón.** Al momento de tener los camarones en el laboratorio, se tomaron 12 organismos al azar por cada tratamiento y se les retiró manualmente la cabeza y el exoesqueleto para medir la textura del músculo, empleando para ello un penetrómetro digital (Chatillón modelo DFI 50) con un punzón cilíndrico con punta "v" de 0.6 cm de diámetro. Esta medición se realizó en dos puntos del cuerpo del camarón, en el segundo y cuarto segmento del cuerpo, a temperatura ambiente. La textura se reporta como las libras requeridas para romper el tejido.

**4.2. Calorimetría diferencial de barrido.** Se utilizó un Calorímetro Diferencial de Barrido (Perkin-Elmer DSC-7). Se tomó un organismo al azar por cada tratamiento y se obtuvo una muestra del músculo entero. Las muestras (40 a 60 mg) se colocaron en cápsulas de acero inoxidable, cuidando que exista un buen contacto con el fondo de la cápsula. Se utilizó una velocidad de barrido de 10°C/min en un rango de temperatura de 26 a 124 °C, usando aire como referencia. Se obtuvieron los termogramas de cada tratamiento, con las entalpías

(J/g) y temperaturas (°C) máximas de las transiciones que se presentan en el músculo (Beas *et al.*, 1990).

## **V. HIDRÓLISIS DE EXTRACTO PROTEICO DEL MÚSCULO POR EL EXTRACTO ENZIMÁTICO CRUDO DEL HEPATOPÁNCREAS**

**5.1. Extracto proteico del músculo de camarón.** Se obtuvieron extractos proteicos del músculo de camarón siguiendo la metodología de Yan *et al.* (1994). Se homogeneizó el músculo de dos organismos con 5 volúmenes (p/v) de buffer de fosfato de sodio 0.01 M con 0.1 M NaCl pH 7.6 a 4°C, por aproximadamente 2 minutos, el homogeneizado se centrifugó a 10,000 x g por 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se usó como extracto proteico del músculo.

**5.2. Hidrólisis de proteínas miofibrilares.** Para determinar la capacidad hidrolítica de los extractos enzimáticos del hepatopáncreas de camarón sobre el músculo del mismo se incubaron a 4 y 25 °C, 500 µl de buffer Tris-HCl 50 µM pH 7.5, 500 µl de extracto proteico del músculo y 10 µl de extracto enzimático crudo del hepatopáncreas, la reacción se detuvo con 500 µl de TCA al 20% por diferentes intervalos de tiempo. El grado de hidrólisis se midió cuantificando la proteína soluble en TCA por el método de Lowry modificado por Hartree (1972).

**5.3. Concentración de proteína soluble en extractos enzimáticos y protéicos.** Para determinar la concentración de proteína soluble, se utilizó el método de Lowry modificado por Hartree (1972) leyéndose la absorbancia a 650 nm.

## **VI. CAMBIOS EN TEXTURA Y PARÁMETROS CALORIMÉTRICOS EN EL MÚSCULO DURANTE SU ALMACENAMIENTO EN CONGELACIÓN**

Los músculos de los camarones cultivados y silvestres se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 meses, realizándose mediciones de textura y parámetros calorimétricos en intervalos de 30 días, siguiendo la metodología descrita anteriormente, para establecer así el efecto del almacenamiento en congelación sobre estos parámetros.

## **VII. ANÁLISIS DE DATOS**

Se aplicó un diseño completamente al azar para establecer el efecto de los diferentes porcentajes de proteína en la dieta sobre la actividad proteolítica del músculo y hepatopáncreas, así como en el peso y textura del músculo de camarón.

Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza y una posterior comparación de medias por la prueba de Tukey cuando existió una diferencia significativa entre las medias. Se realizó un análisis de correlación entre las variables. El nivel de significancia usado fue de 5%. El análisis de resultados se llevó a cabo usando el programa estadístico SAS 6.08 para Windows (SAS, 1994).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### I. EFECTO DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA EN LA DIETA SOBRE EL CRECIMIENTO, COMPOSICIÓN Y TEXTURA DE CAMARÓN AZUL

En el presente estudio se encontró un efecto significativo del contenido de proteína en la dieta sobre el crecimiento del camarón azul, observándose que a mayor contenido de proteína en la dieta es mayor el peso y la longitud final de los camarones (Tabla 3). Como para el camarón azul en su etapa adulta se recomienda de un 25 a 40% de proteína en la dieta (Cruz-Suárez, 1994), el presente estudio se realizó dentro de los niveles recomendados para esta especie. Los resultados obtenidos coinciden con los reportados con otras especies de camarón en los cuales se observa una tendencia a aumentar de peso a medida que aumenta el contenido de proteína dentro de los límites óptimos, con niveles mayores o menores la tendencia es a perder peso (Venkataramiah *et al.*, 1975; Hewitt, 1992; Cousin *et al.*, 1991; Koshio *et al.*, 1993).

Hewitt (1992) explicó este comportamiento al evaluar 3 niveles de proteína en la dieta de *Penaeus esculentus* (30, 40 y 50% de proteína), encontrando que los organismos alimentados con 40% de proteína presentaron una mayor retención proteica en el músculo, puesto que la velocidad de síntesis fue mucho mayor que la velocidad de degradación de proteína, en comparación con los organismos alimentados con 30 y 50% de proteína, lo que ocasionó una mayor ganancia de peso. Lo anterior indica que probablemente en el caso de *Litopenaeus stylirostris*

**TABLA 3.** Longitud, peso y textura de camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) silvestre y de cultivo alimentado con diferentes concentraciones de proteína.

TRATAMIENTOS	LONGITUD (cm)	PESO (ENTERO) (g)	PESO (COLA) (g)	TEXTURA (Lb-f)
T1 (25%PROTEÍNA)	12.68±0.63 <sup>a</sup>	12.94±1.40 <sup>a</sup>	6.65±0.34 <sup>a</sup>	1.20±0.13 <sup>b</sup>
T2(35%PROTEÍNA)	13.00±0.40 <sup>a</sup>	14.15±1.1 <sup>b</sup>	7.32±0.07 <sup>ab</sup>	1.33±0.12 <sup>bc</sup>
T3(40%PROTEÍNA)	13.50±0.52 <sup>b</sup>	15.45±1.28 <sup>c</sup>	7.73±0.53 <sup>b</sup>	1.34±0.04 <sup>c</sup>
SILVESTRE	-----	-----	16.48±1.19 <sup>c</sup>	0.82±0.05 <sup>a</sup>

Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las medias de los tratamientos

alimentado con un 40% de proteína, la mayor parte de la proteína sintetizada es retenida en el músculo, lo que se manifiesta en un mayor crecimiento.

Uno de los factores que afectan la composición del músculo es el alimento que recibe el organismo durante el crecimiento, lo que a su vez afecta la calidad durante el manejo postmortem (Haard, 1992a). Shikata *et al.* (1993) evaluaron el efecto de diferente porcentaje de alimento durante el cultivo de carpa (*Cyprinus carpio*), encontrando que sólo el contenido de lípidos en el músculo se ve aumentado significativamente como respuesta al aumento del alimento. En el presente estudio, como se muestra en la tabla 4, se encontraron diferencias significativas en el contenido de humedad y cenizas entre los músculos de los camarones alimentados con 40% de proteína y los alimentados con 25 y 35% de proteína. La diferencia en el contenido de cenizas se atribuye al peso de los organismos, ya que se encontró una correlación significativa ( $r^2=0.90$ ) entre estos dos parámetros.

En el caso del contenido de lípidos, a pesar de que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se observa una tendencia a aumentar a medida que aumenta el contenido de proteína en la dieta, lo que probablemente influyó en la diferencia de textura del músculo, que aumentó de 1.20 a 1.34 lb-f en los camarones alimentados con 25 y 40% de proteína respectivamente, ya que las interacciones lípido-proteína contribuyen a la estructura del músculo, y por lo tanto a la textura del mismo (Xiong *et al.*, 1999).

**TABLA 4.** Composición proximal en base seca del músculo de camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) silvestre y de cultivo alimentado con diferentes concentraciones de proteína.

TRATAMIENTO	HUMEDAD (%)	PROTEÍNAS (%)	LÍPIDOS (%)	CENIZAS (%)
T1(25% PROTEÍNA)	75.82±0.17 <sup>a</sup>	88.00±2.04 <sup>a</sup>	8.42±0.10 <sup>a</sup>	6.46±0.05 <sup>b</sup>
T2(35%PROTEÍNA)	75.64±0.24 <sup>a</sup>	86.47±0.35 <sup>a</sup>	9.33±0.30 <sup>a</sup>	6.40±0.20 <sup>b</sup>
T3(40%PROTEÍNA)	74.80±0.18 <sup>b</sup>	87.48±1.40 <sup>a</sup>	9.79±2.90 <sup>a</sup>	5.98±0.05 <sup>a</sup>
SILVESTRE	75.74±0.28 <sup>a</sup>	87.792.10 <sup>a</sup>	7.49±0.15 <sup>a</sup>	7.91±0.35 <sup>c</sup>

Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las medias de los tratamientos

## II. EFECTO DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA EN LA DIETA SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DEL HEPATOPÁNCREAS DE CAMARÓN

Al evaluar la actividad proteolítica del hepatopáncreas usando sustratos sintéticos, se detectó actividad de proteasas totales, tripsina, quimotripsina y algunas aminopeptidasas. Se encontró diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en actividad de proteasas totales y tripsina entre los tratamientos con 25 y 40% de proteína. Se observó en ambos casos que la actividad aumenta a medida que aumenta el contenido de proteína en la dieta (Tabla 5). Anteriormente se ha establecido esto mismo en otras especies de crustáceos decápodos tales como *Penaeus vannamei* (Lee *et al.*, 1984; Le Moullac *et al.*, 1994, Le Moullac *et al.*, 1996), *Palaemon serratus* (Van Wormhoudt *et al.*, 1980) en los que al aumentar el contenido de proteína en la dieta se induce un aumento de la actividad tripsina del hepatopáncreas. Esto tal vez es debido a que la concentración de aminoácidos libres en la hemolinfa como producto final de la proteólisis, actúa como un factor de regulación de la síntesis de tripsina. Lee *et al.* (1984) reportan una influencia del peso en la actividad tripsina del hepatopáncreas de *Penaeus vannamei*. Sin embargo, bajo las condiciones de este estudio, no se encontró correlación significativa ( $p > 0.05$ ) entre el peso y la actividad tripsina del hepatopáncreas.



**TABLA 5.** Actividad proteolítica total, tripsina y quimotripsina del extracto crudo del hepatopáncreas de camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) silvestre y de cultivo alimentado con diferentes concentraciones de proteína.

TRATAMIENTOS	PROTEÍNA SOLUBLE (mg/ml)	PROTEASAS TOTALES (unidades <sup>1</sup> /mg proteína)	TRIPSINA (unidades <sup>2</sup> /mg proteína)	QUIMOTRIPSINA (unidades <sup>3</sup> /mg proteína)
T1(25%PROTEÍNA)	17.77±1.88 <sup>a</sup>	0.83±0.09 <sup>a</sup>	0.88±0.15 <sup>a</sup>	0.13±0.01 <sup>a</sup>
T2(35%PROTEÍNA)	18.54±1.28 <sup>a</sup>	0.96±0.09 <sup>ab</sup>	1.06±0.20 <sup>ab</sup>	0.11±0.01 <sup>a</sup>
T3(40%PROTEÍNA)	16.21±2.61 <sup>a</sup>	1.06±0.11 <sup>b</sup>	1.11±0.13 <sup>bc</sup>	0.14±0.011 <sup>a</sup>
SILVESTRE	18.19±0.53 <sup>a</sup>	0.85±0.08 <sup>a</sup>	1.25±0.11 <sup>c</sup>	0.17±0.02 <sup>b</sup>

Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las medias de los tratamientos

<sup>1</sup> unidades = Absorbancia a 366 nm/minuto; Azocaseína, 37°C;

<sup>2</sup> unidades = Absorbancia a 410 nm/minuto; BAPNA, 37°C;

<sup>3</sup> unidades = Absorbancia a 410 nm/minuto; SAPNA, 37°C.

La actividad de quimotripsina en el hepatopáncreas del camarón cultivado no se vió afectada significativamente por el contenido de proteína en la dieta, coincidiendo con los resultados reportados por Le Moullac *et al.* (1994) y Le Moullac *et al.* (1996) con *Penaeus vannamei*. Estos autores observaron que la actividad de quimotripsina no se vió afectada por la cantidad de proteína en la dieta, pero si por la fuente de proteína, lo cual indica que probablemente existen mecanismos de inducción enzimática diferentes para tripsina y quimotripsina, haciendo hincapié en que es necesario realizar investigaciones que ayuden a entender dichos mecanismos, y así lograr un mayor conocimiento sobre los procesos fisiológicos de estos organismos. Por otro lado, no se encontró correlación entre la actividad de tripsina y quimotripsina como se ha reportado en mamíferos, esto debido a la activación de los zimógenos de quimotripsina por la enzima tripsina.

Al igual que las endoproteasas como tripsina y quimotripsina, las exopeptidasas son enzimas importantes en el proceso digestivo de los camarones, ya que son requeridas en las etapas terminales de degradación proteica para la liberación de aminoácidos libres, que finalmente son absorbidos por el organismo (Dall, 1992). A pesar de que las exopeptidasas no han sido tan ampliamente estudiadas como las endoproteasas, se ha detectado la actividad de algunas carboxipeptidasas (Gates and Travis, 1973; Galgani *et al.*, 1984; Yan *et al.*, 1994) y aminopeptidasas (Galgani *et al.*, 1984; Lan and Pan, 1991; Ezquerro *et al.*, 1999) en el hepatopáncreas de diferentes especies de camarón, así como en otros crustáceos y moluscos (García-Carreño and Haard, 1993; García-Carreño and Haard, 1994;

Raksakulthai and Haard, 1999). Coincidiendo con estos reportes, se detectó actividad aminopeptídica del tipo lisina, glicina, prolina y leucina aminopeptidasa en el hepatopáncreas de camarón azul (Tabla 6). Se encontró una mayor actividad al usar como sustrato lisina-*p*-nitroanilida en el caso de los tres tratamientos. Como efecto del contenido de proteína en la dieta se encontró diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) solo en la actividad de prolina aminopeptidasa entre los camarones alimentados con 25 % de proteína (0.094 unidades/mg proteína) y los camarones alimentados con 35 y 40% (0.010 y 0.012 unidades/mg proteína respectivamente). Es importante señalar que en camarón solo se ha reportado la influencia de la fuente de proteína sobre la actividad aminopeptídica (Ezquerria *et al.*, 1999), pero debido a la importancia de estas enzimas en la fisiología digestiva del camarón, es necesario el desarrollar más estudios encaminados a conocer los mecanismos de inducción de la síntesis o secreción de aminopeptidasas en estos organismos.

### III. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DEL MÚSCULO DE CAMARÓN

Se encontró actividad proteolítica total, tipo tripsina y tipo quimotripsina en el músculo de camarón cultivado, encontrándose diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en la actividad tipo tripsina del camarón alimentado con 25% de proteína. Además diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en la actividad tipo quimotripsina del camarón cultivado con diferentes porcentajes de proteína. A pesar de que Doke and

**TABLA 6.** Actividad aminopeptidasa empleando diferentes substratos sintéticos de extracto del hepatopáncreas de camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) silvestre y de cultivo alimentado con diferentes concentraciones de proteína.

TRATAMIENTOS	GLICINA		LISINA		LEUCINA		PROLINA	
	AMINOPEPTIDASA (unidades <sup>1</sup> /mg proteína)	AMINOPEPTIDASA (unidades <sup>1</sup> /mg proteína)	AMINOPEPTIDASA (unidades <sup>1</sup> /mg proteína)	AMINOPEPTIDASA (unidades <sup>1</sup> /mg proteína)	AMINOPEPTIDASA (unidades <sup>1</sup> /mg proteína)	AMINOPEPTIDASA (unidades <sup>1</sup> /mg proteína)	AMINOPEPTIDASA (unidades <sup>1</sup> /mg proteína)	AMINOPEPTIDASA (unidades <sup>1</sup> /mg proteína)
T1(25% PROTEÍNA)	0.003±0.0004 <sup>a</sup>	0.17±0.004 <sup>a</sup>	0.06±0.0003 <sup>a</sup>	0.094±0.0004 <sup>a</sup>				
T2 (35%PROTEÍNA)	0.004±0.0023 <sup>a</sup>	0.17±0.020 <sup>a</sup>	0.06±0.0010 <sup>a</sup>	0.010±0.0019 <sup>b</sup>				
T3 (40%PROTEÍNA)	0.005±0.0012 <sup>a</sup>	0.14±0.025 <sup>a</sup>	0.05±0.0020 <sup>a</sup>	0.012±0.0015 <sup>b</sup>				
SILVESTRE	0.157±0.0064 <sup>b</sup>	0.18±0.015 <sup>a</sup>	0.10±0.0022 <sup>b</sup>	0.127±0.0039 <sup>a</sup>				

Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las medias de los tratamientos  
<sup>1</sup> unidades = Absorbancia a 410 nm/minuto a 37°C.



Ninjoor (1987), semipurificaron una proteasa alcalina del músculo de camarón *Penaeus indicus* con actividad tipo tripsina, en la actualidad no se tiene bien establecido el origen de estas enzimas del tipo digestivo en el músculo de camarón. Se cree que existe una migración de las enzimas presentes en el hepatopáncreas hacia el músculo del camarón, ocasionando autólisis y por lo tanto pérdida de textura del músculo (Lightner, 1973; Nip *et al.*, 1985, Ellingsen y Mohr, 1987; Linder *et al.*, 1989).

Por otra parte es importante enfatizar que no se trabajó con tejido estéril, por lo que no se puede descartar la influencia de actividad enzimática de origen bacteriano, es por eso importante señalar que los datos presentados en la tabla 7, son bajo las condiciones de este estudio.

#### **IV. CARACTERÍSTICAS TÉRMICAS DE LAS PROTEÍNAS DEL MÚSCULO DE CAMARÓN**

La figura 3 muestra los termogramas de Calorimetría Diferencial de Barrido (CBD) del músculo de camarón azul cultivado y silvestre inmediatamente después de su congelación, éste último será discutido mas adelante. Los termogramas presentan un perfil similar con tres picos que representan las tres transiciones importantes que se han reportado en el músculo de algunos pescados y mamíferos (Wright *et al.*, 1971; Quin *et al.*, 1980; Poulter *et al.*, 1985; Wagner y Añón, 1985; Beas *et al.*, 1990). El pico I corresponde a la transición de la miosina, la cual ocurre a temperaturas mas bajas (alrededor de los 52°C) que las reportadas para la miosina del músculo de conejo y bovino, que ocurren alrededor de los 56°C (Wright *et al.*, 1977; Wagner y Añón, 1985).

**TABLA 7.** Actividad proteolítica total, tipo tripsina y tipo quimotripsina en músculo de camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) silvestre y de cultivo alimentado con diferentes concentraciones de proteína.

TRATAMIENTOS	PROTEÍNA SOLUBLE (mg/ml)	PROTEASAS TOTALES (unidades <sup>1</sup> /mg proteína)	TIPO TRIPSINA (unidades <sup>2</sup> /mg proteína)	TIPO QUIMOTRIPSINA (unidades <sup>3</sup> /mg proteína)
T1(25% PROTEÍNA)	6.93±0.78 <sup>a</sup>	0.0079±0.001 <sup>bc</sup>	0.056±0.002 <sup>a</sup>	0.24±0.015 <sup>a</sup>
T2(35% PROTEÍNA)	7.80±0.01 <sup>a</sup>	0.0115±0.003 <sup>b</sup>	0.023±0.003 <sup>b</sup>	0.02±0.005 <sup>c</sup>
T3(40% PROTEÍNA)	9.50±1.90 <sup>a</sup>	0.006±0.001 <sup>c</sup>	0.020±0.007 <sup>b</sup>	0.071±0.014 <sup>b</sup>
SILVESTRE	8.40±0.84 <sup>a</sup>	0.0535±0.018 <sup>a</sup>	0.019±0.003 <sup>b</sup>	0.02±0.003 <sup>c</sup>

Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las medias de los tratamientos

<sup>1</sup> unidades = Absorbancia a 366 nm/minuto; Azocaseína, 37°C;

<sup>2</sup> unidades = Absorbancia a 410 nm/minuto; BAPNA, 37°C;

<sup>3</sup> unidades = Absorbancia a 410 nm/minuto; SAPNA, 37°C.

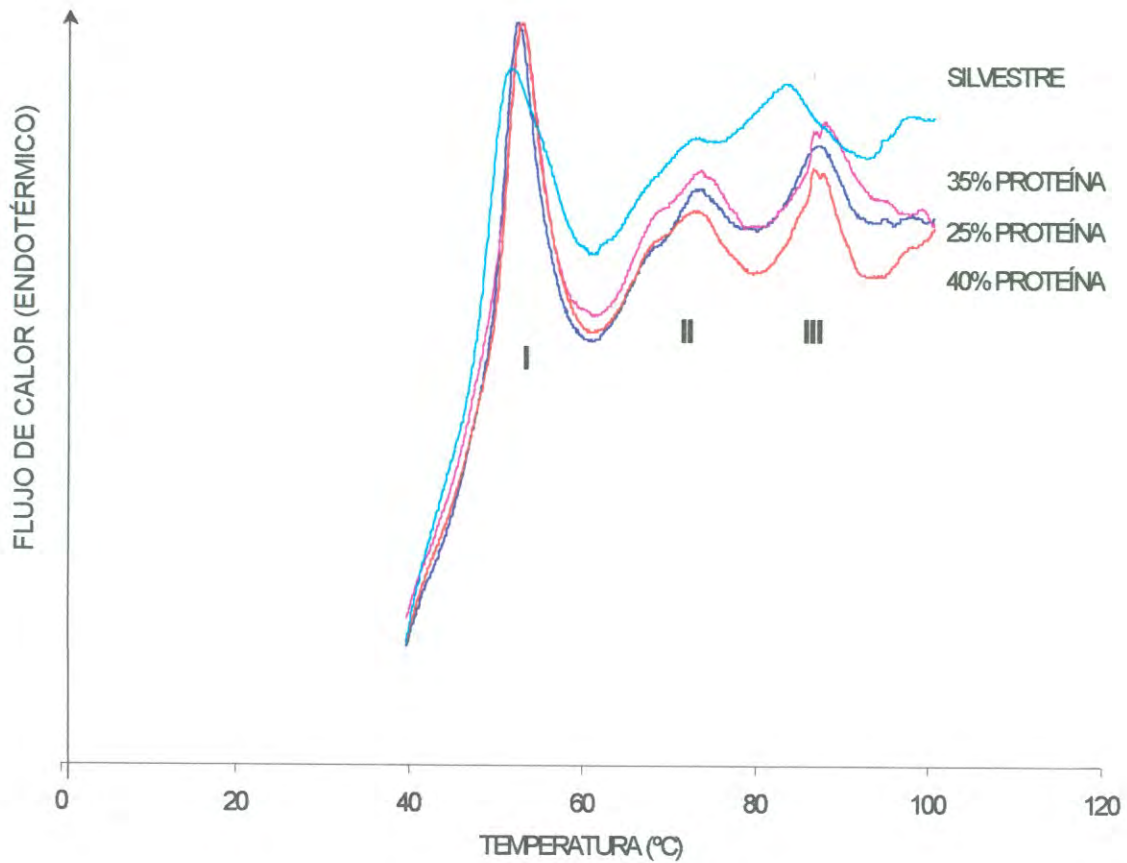


FIGURA 3. Termogramas en Calorímetro de Barrido Diferencial (CBD) del músculo recién congelado de camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) silvestre y de cultivo alimentado con diferente contenido de proteína.

El pico II representa la transición de las proteínas sarcoplásmicas y el pico III a la transición de la actina.

Por otro lado, solo se observó diferencia en la entalpía de transición de la miosina (Tabla 8) del músculo de los camarones alimentados con diferente contenido de proteína. La entalpía disminuyó a medida que aumenta la proteína en la dieta, de 1.77 J/g en el camarón alimentado con 25 % de proteína a 1.52 en el camarón alimentado con 40% de proteína. Estos valores nos indican que bajo las condiciones de este estudio, la miosina del músculo de los camarones alimentados con un 25 % de proteína requieren mayor energía para su desnaturalización. Estas diferencias pueden ser atribuidas a la composición del músculo y a las interacciones que se presentan entre estos componentes. Hamada *et al.* (1982) reportaron que los fosfolípidos en el músculo, interactúan con la actinmiosina y la estabilizan, en nuestro caso, a pesar de que no se cuantificó la naturaleza de los lípidos presentes en el músculo, se observó que existe una relación inversa, ya que al aumentar el contenido de lípidos en el músculo la entalpía de transición de la miosina es menor.

## **V. HIDRÓLISIS *in vitro* DE PROTEÍNAS DEL MÚSCULO POR EL EXTRACTO ENZIMÁTICO DEL HEPATOPÁNCREAS DE CAMARÓN**

Al evaluar la hidrólisis *in vitro* de las enzimas presentes en el hepatopáncreas de los camarones sobre las proteínas nativas del músculo, se encontró actividad a 0, 4 y 25°C después de 36 horas de incubación (Figura 4). Estos resultados tienen



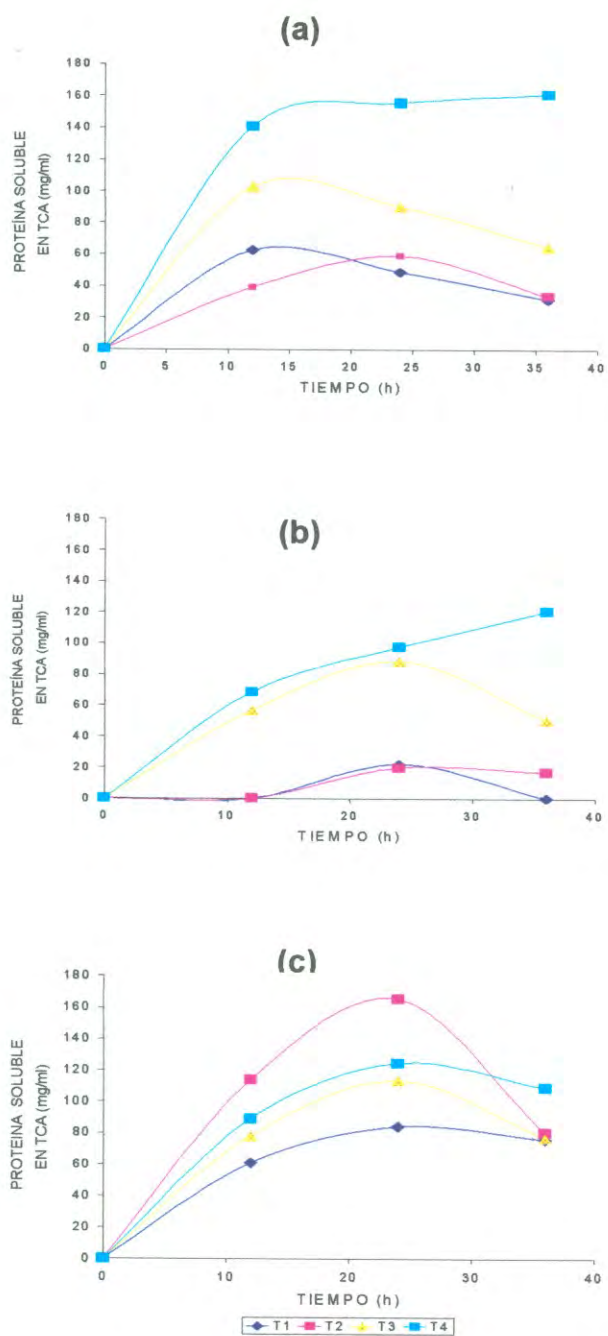


FIGURA 4. Hidrólisis *in vitro* de proteínas del músculo de camarón por extracto enzimático del hepatopáncreas de camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) silvestre y de cultivo alimentado con diferente contenido de proteína. (a) 25°C; (b) 4°C; (C) 0°C.

una gran implicación tecnológica, ya que se ha establecido que existe una migración de las enzimas digestivas del hepatopáncreas hacia el músculo, donde ejercen su acción catalítica actuando en detrimento de la calidad del producto (Lightner, 1973; Nip *et al.*, 1985, Ellingsen y Mohr, 1987; Linder *et al.*, 1988). El hecho de que esta actividad se mantenga después de 36 horas aún a 0 y 4°C, indica que durante el manejo en refrigeración y enhielado del producto, la actividad proteolítica no se detiene por completo, si no que su estructura sufre cierto rearrreglo o adaptación a las condiciones de su entorno continuando con su actividad (Simpson and Haard, 1987). Es por ello importante el desarrollar estudios bajo estas condiciones, y aún a temperatura de congelación, para determinar la posible implicación de estas enzimas en la desnaturalización que sufre el músculo durante la congelación. Por otro lado, se estableció que la cantidad de proteína suministrada en la dieta de los camarones, afecta la capacidad de hidrólisis las enzimas sobre las proteínas del músculo de camarón, ya que las enzimas de los camarones alimentados con 40% de proteína en la dieta presentaron una mayor hidrólisis, aún a 4°C. Las enzimas de camarones alimentados con 25 y 35% de proteína en la dieta, no presentaron actividad hasta las 12 horas de incubación.

Con esta prueba se confirma que las enzimas digestivas son capaces de hidrolizar las proteínas nativas del músculo y que esta actividad se ve influenciada por las condiciones de cultivo, como en este caso por el porcentaje de proteína en la dieta.

## VI. COMPARACIÓN ENTRE CAMARÓN AZUL SILVESTRE Y CULTIVADO

Es conocido que existen diferencias en las propiedades sensoriales entre los peces silvestres y los cultivados, lo que influye en la aceptación por el consumidor. En el caso del camarón los reportes son escasos, y es por esto que en el presente estudio se realizó la comparación entre camarón silvestre y camarón cultivado de la misma especie.

Existen estudios con peces en los que se reporta la influencia de diferentes condiciones de crecimiento sobre la textura del músculo (Jahncke *et al.*, 1988; Tachibana *et al.*, 1988; Hatae *et al.*, 1989; Aoki *et al.*, 1991). En general, en estos reportes se ha encontrado una mejor textura del músculo de pescado silvestre que del cultivado, sin embargo, en el presente trabajo se encontró una textura significativamente más baja en el músculo de camarón silvestre que en el cultivado. Este comportamiento se atribuye principalmente a la diferencia en peso, que como se muestra en la tabla 3, es más alto para el camarón silvestre. Se encontró una correlación significativa negativa ( $r^2=-0.89$ ) entre el peso y textura de los camarones cultivados y silvestres. Es importante señalar que no se puede descartar la influencia de las diferentes condiciones de crecimiento de estos organismos, tales como temperatura, salinidad, oxígeno y alimentación (Haard, 1992a).

Por otro lado, se encontró diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en la actividad de tripsina y quimotripsina del camarón silvestre y cultivado. Esta diferencia en actividad es atribuida en el caso de quimotripsina únicamente a la fuente de proteína en el alimento

(Ezquerria *et al.*, 1997) mas no por la cantidad (Le Moullac *et al.*, 1994). Considerando que la calidad de proteína ingerida por el camarón silvestre es diferente a la consumida por el cultivado, se atribuye a esto el aumento en la actividad de quimotripsina. En el caso de tripsina se ha reportado que su actividad se ve afectada tanto por la fuente como por la cantidad de proteína ingerida, en diferentes especies de camarón (Lee *et al.*, 1984; Maugle *et al.*, 1984; Le Moullac *et al.*, 1994; Rodriguez *et al.*, 1994; Le Moullac *et al.*, 1996; Ezquerria *et al.*, 1997).

En el caso de la actividad aminopeptídica, a excepción de la actividad de lisina aminopeptidasa, se encontró una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre la actividad del camarón azul silvestre y el cultivado, ésta se atribuye, lo mismo que en el caso de las endoproteasas, a la fuente de proteína en el alimento de estos organismos, lo que concuerda con lo reportado por Ezquerria *et al.* (1999), en donde la actividad aminopeptidasa del hepatopáncreas de camarón blanco *Penaeus vannamei* se ve afectada por el tipo de proteína en la dieta.

En estudios de Poulter *et al.* (1985) se reportó diferencias en el comportamiento térmico del músculo de diferentes especies de pescados, sin embargo no se han realizado estudios comparativos entre organismos de la misma especie cultivados y silvestres, que debido a las diferentes condiciones de crecimiento, principalmente temperatura, salinidad y alimentación pueden afectar los parámetros calorimétricos de las proteínas del músculo.

El termograma del músculo del camarón silvestre presenta un desplazamiento de los picos hacia la izquierda (Figura 3), debido a que las temperaturas de transición son

menores que las del músculo de los camarones cultivados. Estas diferencias se atribuyen principalmente a la diferencia en salinidad del medio en que estos organismos se desarrollaron, ya que probablemente estas condiciones ocasionan un mayor o menor contenido de aminoácidos libres usados por el organismo como osmorreguladores, y los que a su vez, determinan en gran parte el medio ambiente iónico de músculo.

Se ha reportado que las temperatura de desarrollo de los organismos afecta los parámetros calorimétricos del músculo de pescado (Poulter *et al.*, 1985), disminuyendo las temperatura de transición principalmente de la miosina en peces de aguas templadas. Posiblemente esto se deba a una adaptación de las proteínas a la temperatura del medio, es por esto que en este estudio se le atribuyen los cambios en la temperatura de transición también a las diferencias en temperatura de crecimiento de los camarones.

## **VII. COMPORTAMIENTO TÉRMICO Y CAMBIOS EN TEXTURA DEL MÚSCULO DE CAMARÓN DURANTE SU ALMACENAMIENTO EN CONGELACIÓN**

Para conocer el comportamiento del músculo de camarón cultivado y del silvestre durante su almacenamiento en congelación, se le dio seguimiento a los cambios en textura y parámetros térmicos durante 3 meses. Se determinó que después de este tiempo de almacenamiento en congelación, el camarón azul cultivado con 25, 35 y 40% de proteína en la dieta pierde un 32, 40 y 48% de su textura inicial. Considerando las entalpías iniciales de transición de la miosina de estos organismos, se encontró una correlación significativa entre estos dos parámetros ( $r^2 = 0.99$ ), lo que indica que

realmente los parámetros térmicos del músculo proporcionan una información importante, para predecir de alguna manera los cambios en textura del músculo de camarones peneidos y que estos son influenciados por el contenido de proteína en la dieta.

Poulter *et al.* (1985) y Dondonero *et al.* (1996) encontraron cambios en la entalpía de transición de la miosina durante el almacenamiento en congelación del músculo y actinmiosina de pescado respectivamente. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente trabajo (Figura 5), ya que después de tres meses de almacenamiento en congelación, se observó una tendencia a disminuir en la entalpía de transición de la miosina del músculo de camarón cultivado alimentado con diferente contenido de proteína en la dieta y de camarón silvestre a medida que disminuye la textura del músculo de estos organismos (Figura 6).

Debido a que uno de los objetivos del presente trabajo fue determinar la relación entre la actividad proteolítica de tripsina con los cambios en textura del músculo de camarón cultivado con diferentes porcentajes de proteína en la dieta, se compararon éstos parámetros. En el caso de actividad del tipo tripsina en el músculo, a pesar de que no se encontró correlación significativa con los parámetros calorimétricos y la pérdida de textura durante el almacenamiento en congelación sería interesante el purificar éstas enzimas y determinar la relación con la pérdida de textura del músculo.

La actividad de tripsina del hepatopánceas presentó una correlación de 0.90 con la pérdida de textura del músculo durante su almacenamiento en congelación. Estos resultados sientan una base importante para estudios posteriores en donde se

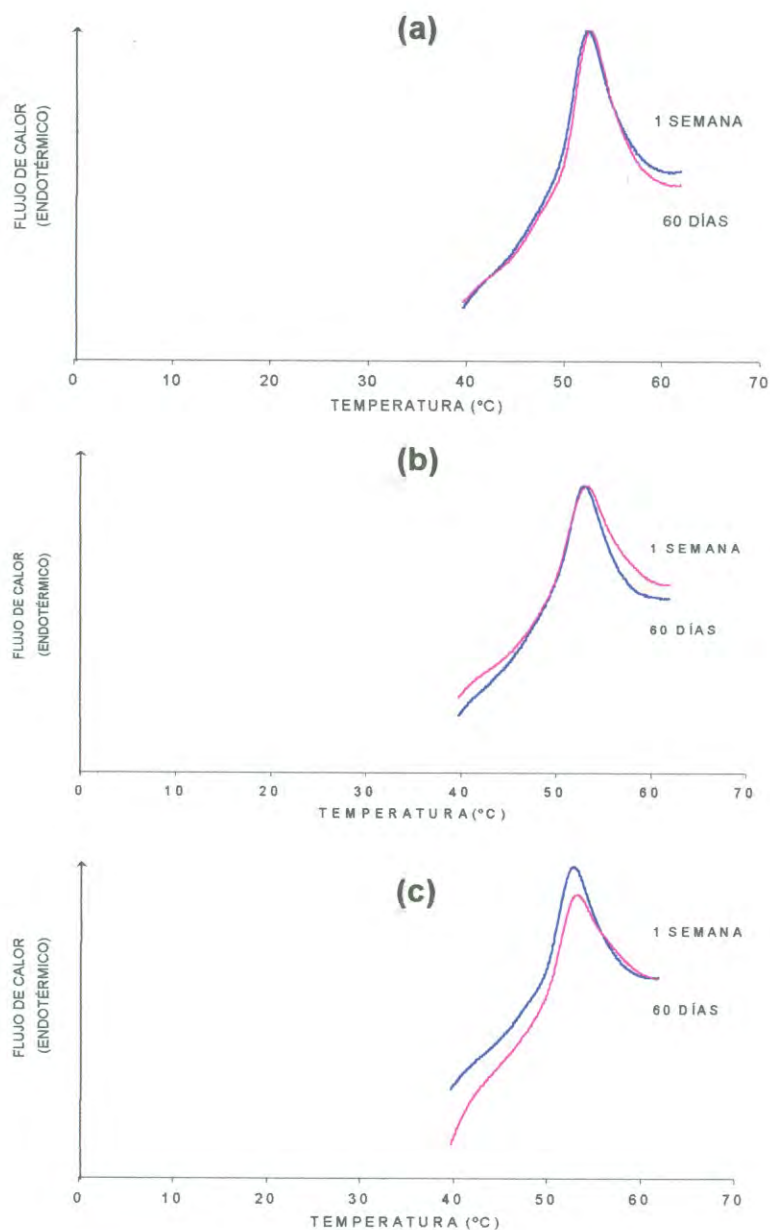


FIGURA 5. Termogramas de la miosina del músculo de camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) de cultivo alimentado con diferente contenido de proteína en la dieta, durante su almacenamiento en congelación. (a) 25% proteína; (b) 35% proteína; (c) 40% proteína.

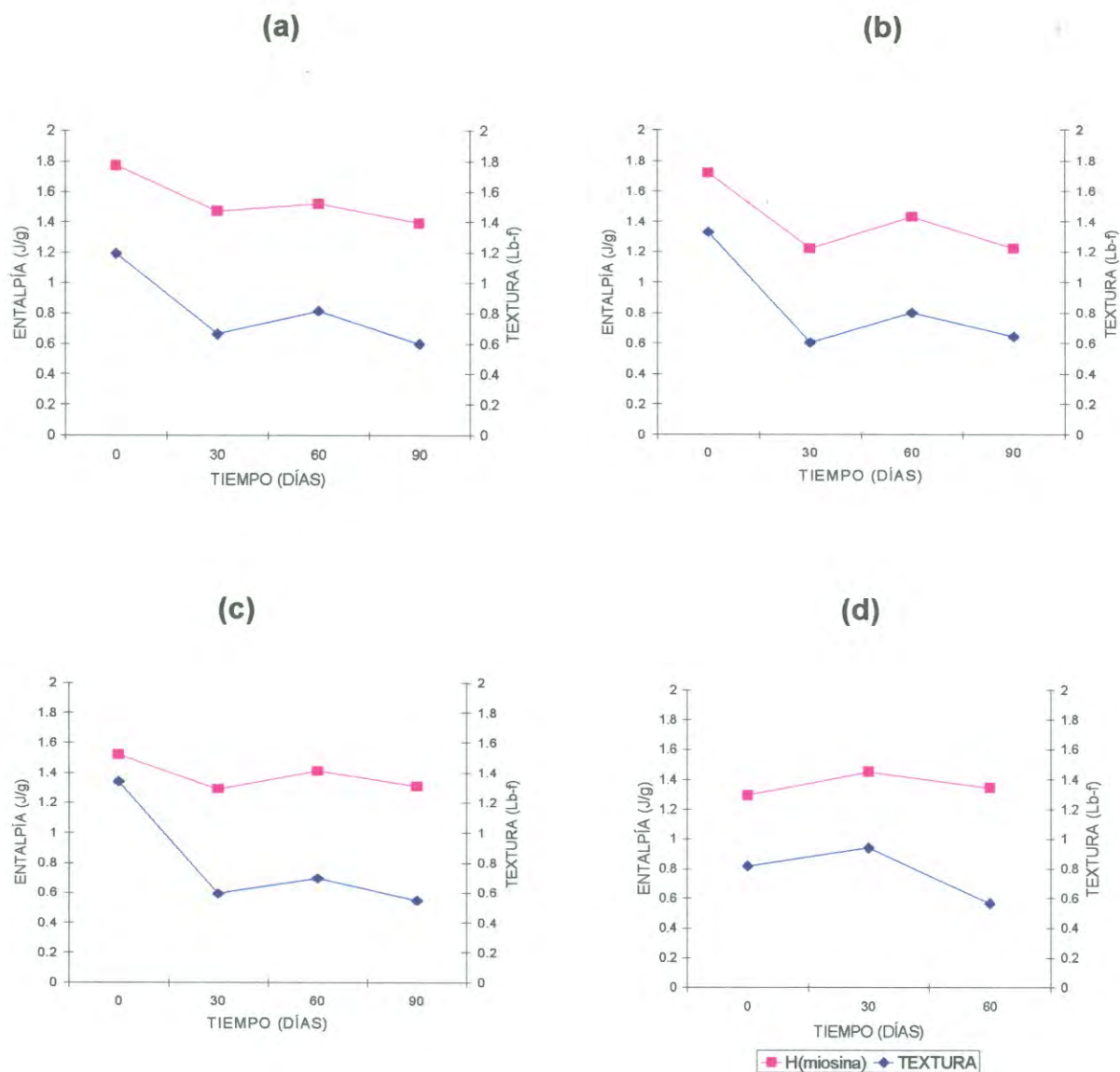


FIGURA 6. Cambios en entalpía de transición de la miosina y textura del músculo de camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) silvestre y de cultivo alimentado con diferente contenido de proteína en la dieta. (a) 25% proteína; (b) 35% proteína; (c) 40% proteína; (d) camarón silvestre.



establezca el posible mecanismo de acción de la tripsina sobre las proteínas miofibrilares del músculo bajo temperaturas de congelación.

Los resultados obtenidos en el presente estudio constituyen un antecedente importante de cómo al controlar ciertas condiciones de cultivo que influyen en la estabilidad del producto durante su almacenamiento, se pueden obtener productos de mayor calidad en el mercado.

## CONCLUSIONES

Se encontró que efectivamente el contenido de proteína en el alimento del camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) influye en el peso y longitud de los organismos, así como en la textura del músculo, incrementando a medida que aumenta el contenido de proteína, sin afectar significativamente el contenido de proteínas y lípidos del músculo.

Así mismo la actividad de tripsina del hepatopáncreas aumentó significativamente con el aumento de proteína en el alimento. Al evaluar la hidrólisis de las proteínas del músculo por las enzimas del hepatopáncreas, se encontró que ésta se lleva a cabo aún a 4 y 0°C, y que también se ve aumentada por el nivel de proteína en el alimento.

Por otro lado, se encontró diferencia en la entalpía de transición de la miosina del músculo de los camarones alimentados con diferente contenido de proteína. Además se encontró una buena correlación de éste parámetro con la pérdida de textura durante el almacenamiento en congelación, lo que indica que este parámetro calorimétrico puede ser un indicador útil de la estabilidad de las proteínas durante su almacenamiento o procesado térmico.

Se observó que el contenido de proteína en la dieta tiene un efecto significativo sobre la pérdida de textura del músculo de camarón durante su almacenamiento en congelación, ya que los camarones alimentados con 40% de proteína presentaron una mayor pérdida de textura que aquellos alimentados con 35 y 25% de proteína en la dieta. Este comportamiento presentó una buena correlación

con la actividad de tripsina en el hepatopáncreas, por lo que no se descarta la posible influencia de la actividad enzimática en la hidrólisis de las proteínas del músculo, contribuyendo a una mayor pérdida de textura. Por lo anterior es necesario realizar trabajos más específicos con respecto a la posible adaptación de estas enzimas a las temperaturas de congelación, y a los mecanismos por los que se lleva a cabo.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, sientan una base importante de cómo es posible mejorar la calidad de los productos de acuicultura, manipulando condiciones de cultivo tan importantes como lo es la alimentación.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda desarrollar estudios encaminados a conocer los mecanismos de inducción de síntesis y secreción de enzimas proteolíticas de importancia fisiológica como quimotripsina, carboxipeptidasas y aminopeptidasas del hepatopáncreas de camarón. Así como de enzimas proteolíticas presentes en el músculo, tales como colagenasas, que tienen un gran impacto en la pérdida de textura postmortem del músculo.

Es también importante desarrollar trabajos mas específicos sobre la posible adaptación de las enzimas proteolíticas a bajas temperaturas de almacenamiento, para poder establecer su efecto en el ablandamiento del músculo.

Y por último realizar un ensayo a nivel comercial en el que se evalúe el 25% de proteína en el alimento de camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*), y establecer si los volúmenes de producción son redituables económicamente en comparación con los niveles de proteína que se utilizan convencionalmente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arai, K. 1966. Acid-soluble nucleotides in muscle of marine invertebrates. Degradation of adenylic acid in the muscle of prawn, carp and calf. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 2: 99-102.
- Akiyama, D.M., Dominy, W.C., y Lawrence, A.L. 1993. Nutrición de camarones peneidos para la industria de alimentos comerciales. Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura. Monterrey, N.L. México. 43-79 pp.
- AOAC International. 1990. Official methods of analysis. 15<sup>th</sup>. Ed. Association of Official Analytical Chemist. Washington, D.C. 1094 pp.
- Aoki, T., Takada, K. and Kunisaki, N. 1991. On the study of proximate composition, mineral, fatty acid, free aminoacid, muscle hardness, and color difference of six species of wild and cultured fishes. Nippon Suisan Gakkaishi, 57, 192-194.
- Baranowski E.S. 1984. Partial characterization of a crude enzyme extract from the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. J. Food Sci. 49:1494-1495.
- Beas, V., Wagner, J., Crupkin, M., and Anon, M. 1990. Thermal denaturation of Hake (*Merluccius hubbsi*) myofibrillar proteins. A diferencial scanning calorimetric and electrophoretic study. J. Food Sci. 55:683-687.
- Benner, R.A., Miget, R., Finne, G., and Acuff, G.R. 1994. Lactic acid/melanosis inhibitor to improve shelf life of brown shrimp (*Penaeus aztecus*). J.Food Sci. 59:242-245.

- Botta, J.R. 1994. Freshness quality of seafood: A review. In: Shahidi, F. and Botta, J.R. Seafoods chemistry, processing technology and quality. Blackie Academic and Professional. 342 pp.
- Carrillo, O. y Gonzalez, R. 1998. Control de la digestión en camarones. En: IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Parte I. La Paz, B.C.S. México 1-15 pp
- Chang, O., Cheuk, W. L., Nickelson, R., Martin, R., and Finne, G. 1983. Indole in shrimp: effect of fresh storage temperature, freezing and boiling. J. Food Sci. 48:813-816
- Chen, J.S., Wei, C., Rolle, R.S., Otwell, S.W., Balaban, M.O., and Marshall, M.R. 1991. Inhibitor effect of kojic acid on some plant and crustacean polyphenol oxidases. J. Agric. Food Chem. 39:1396-1401.
- Chen, J. S., Balaban M. O., Wei, C.I., Gleeson, R.A., and Marshall, M.R. 1993. Effect of carbon dioxide on the inactivation of florida spiny lobster polyphenol oxidase. J. Sci. Food Agric. 61:253-259.
- Cheuk, W.L., Finne, G., and Nickelson R. 1979. Stability of adenosine deaminase and adenosine monophosphate deaminase during ice storage of pink and brown shrimp from the gulf of Mexico. J.Food Sci. 11:1625-1628.
- Chuang, N. N., and Yang, B. C. 1991. Purification and properties of a B-mannosidase from the shrimp (*Penaeus japonicus*) hepatopancreas. Comp. Biochem. Physiol. 4:627-630.

- Chuang, N. N., Lin, K.S., and Yang, B. C. 1992. Purification and characterization of an  $\alpha$ -glucosidase from the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus monodon* (Crustacea:Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 2:273-277.
- Cobb III, B.F., Vanderzant, C., and Kamuluddin, H. 1971. Effect of ice storage upon the free amino acid contents of tails of white shrimp (*Penaeus setiferus*). *J. Agr. Food Chem.* 22:1052-1057.
- Cobb III, B.F., Vanderzant, C., Thompson, A., and Custer, C. 1973. Chemical characteristics, bacterial counts, and potential shelf life of shrimp from various locations on the Northwestern Gulf of Mexico. *J. Milk Food Technol.* 36:463-468.
- Conklin, D.E. 1995. Digestive physiology and nutrition. In: *Biology of the lobster. Factor* (ed). 441-463 pp.
- Cousin M., Cuzon G., Blanchete E., Ruelle F., and AQUACOP. 1991. Protein requirements following an optimum dietary energy to protein ratio for *Penaeus vannamei* juveniles. *Fish Nutrition in Practice.* 599-606.
- Cruz-Suárez, L.E. 1994. Nutrición del camarón. En: *Diccionario de nutrición animal.* Ediciones PLM, S.A. de C.V. México. pp. 209-216.
- D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., and Akiyama, D. Editores. 1997. *Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture.* World Aquaculture Society. (6):566 pp.
- Dall, W. 1992. Feeding, digestion and assimilation in penaeidae. In: G.L. Allan and W. Dall. Editors. *Proc. Aquaculture Nutrition Workshop.* Salamander Bay. pp. 57-63.
- Deering, M.J., Hewitt, D.R. and Brock, I. 1996. Triacylglycerol digestion by the leafer prawn *Penaeus monodon*. *J. World Aquacult. Soc.* 27:359-361.

- Doke, S.N. and Ninjoor, V. 1987. Characteristics of an alkaline proteinase and exopeptidase from shrimp (*Penaeus indicus*) muscle. J. Food Sci. (52):1203-1208.
- Dondonero, M., Araya, M., and Curotto, E. 1996. Prevention of protein denaturation of jack mackerel actomyosin (*Trachurus murphyi*) during frozen storage. Food Sci. Technol. Int. 2: 79-86.
- Dunajski, E. 1979. Texture of fish muscle. J. Texture Studies. 10:301-318.
- Ellinseng, T., and Mohr, V. 1987. Biochemistry of the autolytic processes in antarctic krill postmortem. Biochem. J. 246: 295-305.
- Erlanger, B., Kokowsky, N., and Cohen, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrate of trypsin. Arch. Biochem. Biophys. 95:271-278.
- Ezquerria, M., García-Carreño, F. L., and Haard, N.F. 1998. Effects of feed diets on digestive proteases from the hepatopancreas of white shrimp (*Penaeus vannamei*). J. Food Biochem.(21):401-419.
- Ezquerria, M., García-Carreño, F.L., Arteaga, G., and Haard, N.F. 1999. Aminopeptidase activity from the hepatopancreas of white shrimp (*Penaeus vannamei*) fed with different diets. J. Food Biochem. (23): 59-74.
- Fatima, R., Bilquis, F., and Qadri, R. 1981. Inosine monophosphate and hipoxantina as indices of quality of shrimp (*Penaeus merguensis*). J. Food Sci. 46:1124-1131.
- Fennema, O.R. (Ed). 1996. Food Chemistry. 3ª Edición. Marcel Dekker, Inc. 1069 pp.
- Finne, G. 1985. Non-protein nitrogen compounds in fish and shellfish. Director of research and technical services. Texas Inc. 201 East Holleman. 1-12 pp.



- Galgani, F. G., Benyamin, Y., and Ceccaldi, J. 1984. Identification of digestive proteinases of *Penaeus kerathurus*: A comparison with *Penaeus japonicus* Bate. *Comp. Biochem. Physiol.* 78B:355-361.
- García-Carreño, F.L. and Haard, N.F. 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *J. Food Biochem.* 17:97-113.
- García-Carreño, F.L., Hernández-Cortés, M.P., and Haard, N.F. 1994. Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and marine decapod. *J. Agric. Food Chem.* 42:1456-1461.
- García-Carreño, F.L., and Haard, N.F. 1994. Preparation of an exopeptidase enriched fraction from the hepatopancreas of decapod. *Proc. Biochem.* 29:663-670.
- García-Carreño, F.L., Carrillo, O., and Navarrete del Toro, M.A. 1998. Control of digestive functions in shrimp. I. An inhibitor of trypsin activity in the hepatopancreas. *Proceedings of the Fourth International Crustacean Congress, Amsterdam, The Netherlands.* 915-922.
- Gates, B. J., and Travis, J. 1973. Purification and characterization of carboxypeptidases A and B from the white shrimp (*Penaeus setiferus*). *Biochemistry.* (12):1867-1874.
- Gibson, R. 1983. Feeding and digestion in decapod crustacean. In: "Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition". 59-70 pp. Louisiana State University, Baton Rouge.

- Haard, N.F. 1992a. Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Res. Int.* 25: 289-307.
- Haard, N.F. 1992b. Biochemistry of color and color change in seafoods. In *Seafood Biochemistry: Composition and Quality*. De. R. Martin, R. Ory and G. Flick. pp. 305.
- Haard, N.F. 1994. Protein hydrolysis. Cap. 3. En *Seafood: Chemistry, Processing Technology and Quality*. F. Sashidi y J.R. Botta (Ed.), Blackie Academic & Professional. pp. 10-33.
- Hamada, I., Yabuno, F., Furumatsu, K., and Niwa, E. 1982. The effect of lipid on the heat denaturation of actomyosin. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* 48: 189-193.
- Hartree, E.F. 1972. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48:422-427.
- Hatae, K., Lee, K. H., Tsuchiya, T. and Shimada, A. 1989. Textural properties of cultured and wild fish meat. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, 363-368.
- Hernández-Cortés, P., Whitaker, J., and García-Carreño, F.L. 1997. Purification and characterization of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *J. Food Biochem.* 21:497-514.
- Hewitt, D.R., 1992. Effect of dietary protein level on protein turnover in the brown tiger prawn, *Penaeus esculentus*. *Proc. Aquaculture Nutrition*. 77-81.
- Honjo, L., Kimura, S., and Nonaka, M. 1990. Purification and characterization of trypsin-like enzyme from shrimp (*Penaeus indicus*). *Nippon Suisan Gakkaishi*. 56: 1627-1634.

- Jahncke, M., Hale, M.B., Gooch, J.A. and Hopkins, J.S. 1988. Comparison of ponds-raised and wild red drum (*Sciaenops ocellatus*) with respect to proximate composition, fatty acid profiles and sensory evaluation. *J. Food Sci.* 53, 286.
- Jiang, S.T., Moody, W., and Chen. 1991. Purification and characterization of proteases from digestive tract of grass shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Food Sci.* 56:322-326.
- Kawamura, Y., Nishimura, K., Igrashi, S., Doi, E., and Yonezawa, D. 1981. Characteristics of autolysis of Antarctic krill. *Agric. Biol. Chem.* 45:93-100.
- Kimura, S., and Tanaka, H. 1986. Partial characterization of muscle collagens from prawns and lobster. *J. Food Sci.* 51: 330-339.
- Koshio, K., Teshima, S., Kanazawa, A., and Watase, T. 1993. The effect of dietary protein content on growth, digestion efficiency and nitrogen excretion of juvenile kuruma prawns, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture.* 113: 101-114.
- Lan, C.C., and Pan, B.S. 1991. Effect of substrate on proteolytic activities of midgut gland of grass shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Chinese Agric. Chem. Soc.* 29(1):33-42.
- Lee, P., and Lawrence, A.L. 1982. A quantitative analysis of digestive enzymes in penaeid shrimp; influences of diet, age and species. *Physiologist.* 25: 241-245.
- Lee, P., Smith, L., and Lawrence, A. 1984. Digestive proteases of *Penaeus vannamei* Boone: Relationship between enzyme activity, size and diet. *Aquaculture.* 42: 226-239.

- Lee, P.G. and Lawrence, A. L. 1997. Digestibility. En: Crustacean nutrition, Advances in world aquaculture, Conklin, D.E., y Akiyama, D.M. (Eds.). World Aquaculture Society. Louisiana. pp. 194-260.
- Le Moullac, G., Van Wormhoudt, A., and AQUACOP. 1994. Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fibre levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapoda). Aquat. Living Resour. 7:203-210.
- Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D., and Van Wormhoudt. 1996. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and  $\alpha$ -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 208:107-125.
- Lightner, D. 1973. Normal postmortem changes in the brown shrimp, *Penaeus aztecus*. Fish. Bull. 72:223-236.
- Lim, C., and Akiyama, D. M. 1995. Nutrient requirements of penaeid shrimp. In: Nutrition and utilization technology in aquaculture. C.E. Lim and D.J. Sessa (ed) AOAC Press. Champaign, Ill. 60-73 pp.
- Linder, P., Angel, S., Weinberg, Z. G., and Granit, R. 1988. Factors inducing mushiness in stored prawns. Food Chem. 29: 119-132.
- Linder, P., Angel, S., Weinberg, Z. G., and Granit, R. 1989. Study of the proteolytic activity of the hepatopancreas of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and its role in inducing mushiness in muscle tissue during postmortem storage. Food Chem. 32: 19-29.

- Luzuriaga, D.A., Balaban, M.O., Hasan, R., and Teixeira, A.A. 1997. A new device for measuring texture changes in raw white shrimp stored on ice. *J. Aquatic Food Product Technology*. 6:5-27.
- Martínez-Córdova, L.R. 1998. *Ecología de los sistemas acuícolas*. AGT Editor, S. A. 227 pp.
- Matsumoto, J.J. 1980. Chemical deterioration of muscle proteins during frozen storage. American Chemical Society. 95-124 pp.
- Maugle, P., Deshimaru, O., Katayama, T., and Simpson, K. 1982. Characteristics of amylase and protease of the shrimp *Penaeus japonicus*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 48: 1753-1757.
- Maugle, P., Deshimaru, O., Katayama, T., and Simpson, K. 1982. Effect of short necked clam diets on shrimp growth and digestive enzyme activities. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 48: 1759-1764.
- McCoid, V., Miget, R., and Finne G. 1984. Effect of environmental salinity on the free aminoacid composition and concentration in penaeid shrimp. *J. Food Sci.* 49:327-355.
- Nip, W.K., Lan, C.Y., and Moy, J.H. 1985. Partial characterization of a collagenolytic enzyme fraction from the hepatopancreas of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenburgii*. *J. Food Sci.* 50:1187-1188.
- Onnen, T., and Zebe, E. 1983. Energy metabolism in the tail muscle of the shrimp *Crangon crangon* during work and subsequent recovery. *Comp. Biochem. Physiol.* 74:833-838.

- Otwell, W.S., Iyengar, R., and McEvily, A.J. 1992. Inhibition of shrimp melanosis by 4-Hexyresorcinol. *J. Aquatic Food Prod. Technol.* 1:53-65.
- Paterson, B.D. 1993. The rise in inosine monophosphate and L-lactate concentrations in muscle of live penaeid prawns (*Penaeus japonicus*, *Penaeus monodon*) stressed by storage out of water. *Comp. Biochem. Physiol.* 106:395-400.
- Paterson, B.D., Goodrick, B., and Grauf, S. 1995. Inosine monophosphate (IMP) concentration in shrimp flesh cannot be used as an index of "freshness" when comparing shrimp that have been harvested in different ways. *J. Aquatic Food Product. Technol.* 4:59-74.
- Pfeiderer, G. 1970. Particle bound peptidase from pig kidney. En: *Methods in Enzymology*, Vol. XIX, p. 514-521. Academic Press, New York.
- Poulter, R.G., Ledwards, D.A., Godber, S., Hall, G., and Rowlands. 1985. Heat stability of fish muscle proteins. *J. Food Technol.* 20: 203-217.
- Quinn, J.R., Raymond, D.P., and Harwalker, V.R. 1980. Differential scanning calorimetry of meat proteins as affected by processing treatment. *J. Food Sci.* 45:1146-1149.
- Raksakulthai, R., and Haard, N.F. 1999. Purification and characterization of aminopeptidase fractions from squid (*Illex illecebrosus*) hepatopancreas. *J. Food Biochem.* 2:123-144.
- Reddy, S.K., Nip, W.K., and Tang, C.S. 1981. Changes in fatty acids and sensory quality of fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) stored under frozen conditions. *J. Food Sci.* 46: 353-356.

- Rodriguez, A., Le Vay, L., Mourente, G., and Jones, D.A. 1994. Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. *Marine Biology*. 118:45-51.
- SAS Institute, Inc. 1994. *SAS / STAT User's Guide*. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- SEMARNAP, 2000. Anuario estadístico de pesca 1998. <<http://semarnap.gob.mx/sspesca/anua98/anua98.htm>>
- Simpson, B., and Haard, N.F. 1987. Cold-adapted enzymes from fish. In: D. Knorr, Editor. *Food Biotechnology*. Marcel Dekker, Inc. pp. 495-527.
- Sikorski, Z.E. 1990. *Seafood: Resources, nutritional, composition and preservation*. CRC Press, Inc. 248 pp.
- Sivakumar, P., Suguna, L., and Chandrakasan, G. 1997. Purification and partial characterization of a type V like collagen from the muscle of marine prawn, *Penaeus indicus*. *J. Biosci.* 22:131-141.
- Shikata, T., Kheyyali, D., and Shimeno, S. 1993. Effect of feeding rates on hepatopancreatic enzymes and body composition in common carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 5:835-839.
- Snook, J.T. and Meyer J.H. 1964. Effect of diet and digestive processes on proteolytic enzymes. *J. Nutr.* 83:94-102.
- Stauffer, C. 1989. *Enzyme assay for Food Scientist*. p. 61-76, Chapman & Hall, New York.
- Stone, F. 1971. Inosine monophosphate and hypoxanthine formation in three species of shrimp held on ice. *J. Milk Food Technol.* 34:354-356.

- Tachibana, K., Doi, T., Tsuchimoto, M., Misimi, T., Ogura M., Matsukiyo, K. and Yasuda, M. 1988. The effect of swimming exercise on flesh texture of cultured red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54, 677-681.
- Tsai, I., Lu, P., and Chuang, J. 1991. The midgut chymotrypsins of shrimp (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus penicillatus*). *Biochemica et Biophysica Acta*. 1080:59-67.
- Tsai, I., Liu, H., and Chuang, K. 1986. Properties of two chymotrypsins from the digestive gland of prawn *Penaeus monodon*. *FEBS*. 203: 257-261.
- Tsuchiya, H., Kita, S., and Seki, N. 1992. Postmortem changes in  $\alpha$ -actinin and connectin in carp and rainbow trout muscles. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 58:793-798.
- Van Wormhoudt, A., Ceccaldi, H.J., et Bernard, M. 1980. Adaptation de la teneur en enzymes digestives de l'hépatopáncreas de *Palaemon serratus* (Crustacea, Decapoda), a la composition d'aliments experimentaux. *Aquaculture*. 21, 63-78.
- Van Wormhoudt, A., Chevalier, P., and Sellos, D. 1992. Purification, biochemical characterization and N-terminal sequence of a serine-protease with chymotrypsic and collagenolytic activities in a tropical shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 103B:675-680.
- Van Wormhoudt, A., Sellos, D., Donval, A., Plaire-Goux, S., and Le Moullac, G. 1995. Chymotrypsin gene expression during the intermolt cycle in the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Experientia*. 51: 159-163.



- Venkataramiah, A., Lakshmi, G.J. and Gunter, G. 1975. Effect of protein level and vegetable matter on growth and food conversion efficiency of brown shrimp. *Aquaculture*. 6: 115-125.
- Vogt, G., Storch, V., Quinito, E.T., and Felicitas, P. 1985. Midgut gland as monitor organ for the nutritional value of diets in *Penaeus monodon* (Decapoda). *Aquaculture*. 48:1-12
- Wagner, J.R., and Añon, M.C. 1985. Denaturation kinetics of miofibrillar proteins in bovine muscle. *J. Food Sci.* 50: 1547-1550.
- Wright, D.J., Leach, I.B., and Wilding, P. 1977. Differential scanning calorimetric studies of muscle and its constituent proteins. *J. Sci. Fd. Agric.* 28:557-564.
- Xiong, Y. L., Ho, C., and Shahidi F. 1999. Quality characteristics of muscle foods. In: Xiong, Y.L, Ho, C., and Shahidi, F., Editores. 1999. Quality attributes of muscle foods. 1-9.
- Yeh, C.P., Nickelson, R., and Finne, G. 1978. Ammonia producing enzymes in white shrimp tails. *J. Food Sci.* 43: 1400-1404.
- Yan, T., Lee, C., and Lee, J. 1994. Studies on proteolytic enzymes of red-tail shrimp (*Penaeus penicillatus*). *J. Chinese Agricultural Chemical Society.* 32: 25-32.