

“Relación ente el ciclo de muda y la actividad de las enzimas digestivas y su efecto en la tasa de alimentación y crecimiento del juvenil *Penaeus vannamei*”

Eduardo Cadena¹ ; César Molina²

¹ Licd. Acuicultor 1999, Facultad de Marítima y Ciencias del Mar, Escuela Superior Politécnica del Litoral

² Director de Tesis, Químico-Farmacéutico, Universidad de Guayaquil, 1989, Maestria , Universidad de Gales, Profesor de ESPOL desde 1998

RESUMEN: En este estudio se encontró una sincronización de la muda con el ciclo lunar, encontrándose en cuarto menguante aproximadamente el 50% de la población de camarones mudados, alcanzando el pico máximo en luna nueva (80%).

Las mayores actividades específicas de amilasa y lipasa se encontró en los estadios Do y D2 y la menor en D3 durante el ciclo de muda. Mientras que para proteasas en los estadios B, C y Do se encontró la mayor actividad, coincidiendo con la etapa donde el camarón consume 18% más alimento. Después de 60 días de alimentación, no se encontró diferencias estadísticas ($P > 0,05$) en términos de biomasa ganada entre las 3 raciones alimenticias evaluadas a pesar de que los camarones alimentados en base a la tabla de alimentación crecieron 0,78 g significativamente ($P < 0,05$) más que los otros dos tratamientos. Una supervivencia del 7% mayor fue observado en los animales que fueron alimentados en raciones acordes al ciclo de muda. Así también las mejores tasas de conversión alimenticia y de eficiencia proteica fueron obtenidas por el grupo de camarones alimentados en función del estadio de muda.

PALABRAS CLAVES: camarón, ciclo de muda, actividad enzimática

INTRODUCCION

Actualmente la alimentación en las piscinas camaroneras está basada en cálculos de raciones a partir de tablas teóricas de crecimiento y supervivencia, las cuales no consideran la fisiología del camarón. Considerando que el costo del alimento balanceado puede llegar a representar hasta el 50%, del gasto de producción, dependiendo del sistema utilizado (extensivo, sin alimento o semi-intensivos con alimento) la especie, manejo, calidad de agua y tipo de alimento, es por lo tanto relevante encontrar nuevas alternativas que permitan disminuir los gastos generados por éste rubro (29) (3).

Para alcanzar éste objetivo es necesario estudiar al organismo en su capacidad de consumo de alimento, (factor importante en la supervivencia y crecimiento), en el cual la actividad enzimática cumple una acción de vital importancia (35) y los procesos fisiológicos por los cuales estos atraviesan, como es el caso del ciclo de muda.

Varias investigaciones se han realizado con el fin de determinar las enzimas digestivas endógenas presentes en el hepatopáncreas del camarón *P. vannamei*, es así que se han encontrado enzimas tales como, tripsina, quimotripsina, aminopeptidasas, lipasas, carbohidrasas, carbopeptidasas A y B (17) (26) (37) (38). La tripsina representa ella sola hasta el 60% de la actividad proteolítica y el 6% de la proteína soluble del hepatopáncreas (18); en tanto que la α -amilasa representa el 1% de la proteína soluble siendo una importante glucosidasa del *P. vannamei* (37) (39).

La importancia del proceso fisiológico del ciclo de muda en los crustáceos está relacionado con la mayoría de los sistemas que controlan los procesos metabólico y reproductivo del camarón, y si mencionamos que hay una reducción del consumo de alimento en los camarones en su preparación para la muda, es necesario determinar los estadios de muda para estimar el consumo de alimento y tener en consideración ésta variable para cálculos en la tabla de alimentación usada en las camaroneras (24) (30). La ración de alimento, y horarios de alimentación en función de la actividad de enzimas digestivas son tópicos de reciente investigación, seguidos con el fin de obtener una adecuada dosificación que permita reducir el costo de la producción y el factor de conversión alimenticia (15) (30).

Los diversos criterios sobre el comportamiento alimenticio de los camarones hacen que las técnicas de alimentación utilizadas discrepen entre productores, ocasionado en muchos casos elevadas tasas de conversión alimenticias y por ende una menor rentabilidad.

El objetivo principal de este trabajo está enfocado en encontrar una estrategia que permita optimizar la cantidad de alimento a suministrar en los cultivos de camarón. La introducción de ajustes en la tabla de alimentación, en función de la actividad enzimática y estadios del ciclo de muda, podría ayudar a reducir el gasto innecesario de alimento en las camaroneras.

1. MATERIALES Y METODOS

1.1. Tasa de ingestión

Cinco camarones en un mismo estadio de muda fueron colocados por acuario (60x30x36) de 50 l. Los animales con peso promedio $2,69 \pm 0,30$ g fueron alimentados con una dieta de 40% de proteína a las 08:00h y 15:00h suministrando el 10% de su biomasa en cada ocasión. El ensayo se realizó durante 3 ciclos de muda (un mes) utilizando 6 réplicas (acuarios). La observación e identificación del estadio de muda en el camarón se lo realizó en los urópodos, de acuerdo a lo descrito por (32) y (33) para el *P. Esculenteus*, *P. Setiferus* y *P. Stylirostris*. Durante este ensayo se estimo la duración del ciclo de muda y sus sub-estadios (postmuda temprana A, postmuda tardía B, intermuda C, premuda temprana Do y D1, premuda tardía D2 y D3)

La tasa de ingestión fue calculada por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de ingestión} = \frac{\text{Alimento suministrado} - (\text{Alimento no consumido} \times B)}{\text{Biomasa del acuario}} \times 100$$

$$B = \frac{\text{Alimento suministrado}}{\text{Alimento recuperado}}$$

1.2. Actividad enzimática

Camarones entre 3 y 5 g obtenidos de una granja camaronera fueron aclimatados a las condiciones del laboratorio y alimentados con una dieta de 40% de proteína. Después de dos semanas, diez camarones por estadio de muda fueron disectados para extraer sus hepatopáncreas, manteniendo estos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Quince horas previas a la selección de los animales, el alimento no consumido y las heces fueron sifoneados. El muestreo se llevo a cabo entre las 09h00-11h00, para evitar cualquier efecto del ritmo circadiano en la actividad de las enzimas digestivas y nutrientes a analizar (9) (27).

1.2.1. Preparación del suero enzimático

Un micro homogenizador de tejido (Wheaton®) fue utilizado para macerar el hepatopáncreas en 0,5 ml de agua desionizada y enrasado hasta 1,5 ml con la misma calidad de agua. Tubos de microensayos (eppendorf®) fueron usados para mantener el hepatopáncreas homogenizado y sumergido en hielo picado hasta su inmediata centrifugación a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C en una centrífuga (Kokusanâ 2000B). Alícuotas individuales del sobrenadante por cada análisis a realizar fueron transferidos a diferentes tubos y congeladas $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. La Tabla I resume los análisis realizados para la determinación de la actividad enzimática y nutrientes en el hepatopáncreas del camarón *P. vannamei*

Tabla I. Características de las metodologías empleadas en los análisis de las enzimas y nutrientes a temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

Enzima (Autor)	Substrato	Tampón y pH	Actividad específica	Longitud de onda (nm)
Glicógeno (15)	Glucosa 0,01%		mg de glucosa/ml	485
Proteína (6)	Dye Reagent (1:4)		mg de proteína / g hepatopáncreas	595
Amilasa (31)	Almidón soluble, 1%	Fosfato de Sodio, pH 6,9	(μg maltosa/min/mg proteína)	550
Lipasa (40)	β -Naftil caprilato 200 nM,	Tris-CIH 50 mM , pH 7,2	μM ácidos grasos /min/mg de proteína	540
Proteasas (20)	Azocaseína 2%	Tris-CIH 50 mM , pH 7,2	μM tyrosina/min/mg de proteína	440

Los camarones y hepatopáncreas respectivos se pesaron para estimar el índice hepatosomático (IHS).

$$\text{IHS} = \frac{\text{Peso del hepatopáncreas} \times 100}{\text{Peso del camarón}}$$

1.3. Ensayo de crecimiento

Camarones con peso promedio de $1,58 \pm 0,17$ g, fueron colocados en un número de ocho por acuarios (60x30x36 cm) de 50 litros. Tres métodos para estimar la ración de alimento fueron evaluados usando 8 acuarios (réplicas) por método (tratamiento). Los tratamientos A y B fueron alimentados, usando una tabla de alimentación comercial (1) y al 6% de la biomasa, más el 1,5% producto de la pérdida de alimento reportada en el blanco respectivamente.

En el tratamiento C los camarones se alimentaron en base a la regresión lineal obtenida del ensayo de tasa de ingestión. El porcentaje de alimento suministrado a cada acuario fue calculado usando los valores determinados en el ensayo de tasa de ingestión para cada estadio de muda, reemplazando éstos en la siguiente fórmula:

$$A-D3 = (Y_E / 100 \times NC_E) \times PP$$

Donde:

Y = porcentaje de la biomasa correspondiente a cada estadio

NC = número de camarones en determinado estadio de muda

PP = peso promedio de la población presente en el acuario

E = estadio de muda

Los juveniles fueron alimentados a las 08h00 y 16h00 con una dieta al 40% de proteína. Diariamente, antes de proceder a alimentar, el fondo de los acuarios fue sifoneado con la finalidad de eliminar desechos, heces, mudas y organismos muertos.

Los camarones se pesaron cada semana con una balanza de 0,01 g de precisión, para ajustar la ración de alimento a suministrar. En el tratamiento C cada dos días el 50% de la población y durante el día del pesaje a todos los animales se identificaba los estadios de muda de cada acuario. La tasa de recambio de agua fue 1200% diario, y el agua de mar fue previamente filtrada por arena y filtro de piola y tratada con UV.

El fotoperíodo fue 12h luz y 12h oscuridad (07h00-19h00). Los parámetros físicos del agua como temperatura y oxígeno disuelto fueron medidos semanalmente usando un oxigenómetro YSI 52 RS232®, pH con un pH meter 320 WTW® y la salinidad con refractómetro. El factor de conversión alimenticia fue calculado usando la siguiente formula (7).

$$F.C.A = \frac{\text{Alimento en base seca}}{Bf + 1/2 (Bo + Bf) \times \# \text{ animales muertos}}$$

Donde:

Bo: Biomasa inicial

Bf: Biomasa final

1.4. Análisis estadístico

La prueba de Anderson-Darling fue realizada para establecer la normalidad de los datos y la prueba de Bartle para homogeneidad de varianza. Los resultados obtenidos fueron evaluados por análisis de varianza (ANOVA). Los datos expresados como porcentaje fueron transformados por arcoseno previo ANOVA. Una vez que se verificaron diferencias significativas ($p < 0,05$) los datos fueron analizados por la prueba de mínima diferencia significativa (Least Significant Difference, LSD) para determinar cual tratamiento fue diferente de otro.

2. RESULTADOS

2.1. Ciclo de Muda

Durante el período de estudio se pudo observar que el ciclo de muda en los juveniles *P. vannamei* con peso promedio de $2,69 \pm 0,30$ g duró aproximadamente $11,03 \pm 1,13$ días. En el cual la fase de premuda representó el 50%, intermuda 33,33% y la postmuda 18,66% de todo el proceso de muda (Tabla II).

Tabla II. Duración del ciclo de muda en el juvenil *P. vannamei*. Valor promedio de 4 ciclos de muda (\pm error estándar)

Duración (días)	Estadios de Muda						
	A	B	C	Do	D1	D2	D3
	1	1	$4 \pm 0,19$	$1 \pm 0,24$	$2 \pm 0,29$	$2 \pm 0,29$	1

La figura 1 muestra la relación entre las fases lunares y el número de camarones mudados. En la luna nueva aproximadamente el 80% de camarones mudan en los primeros 5 días contados desde el inicio del aguaje (marea alta cuya duración es de 8 días), mientras que en luna llena solo mudaron alrededor del 30% de la población en el mismo período. Durante los primeros 5 días de quiebra (marea baja), en cuarto creciente un 30% de la población de camarones mudó, mientras que en cuarto menguante se incremento al 47% en el mismo lapso.

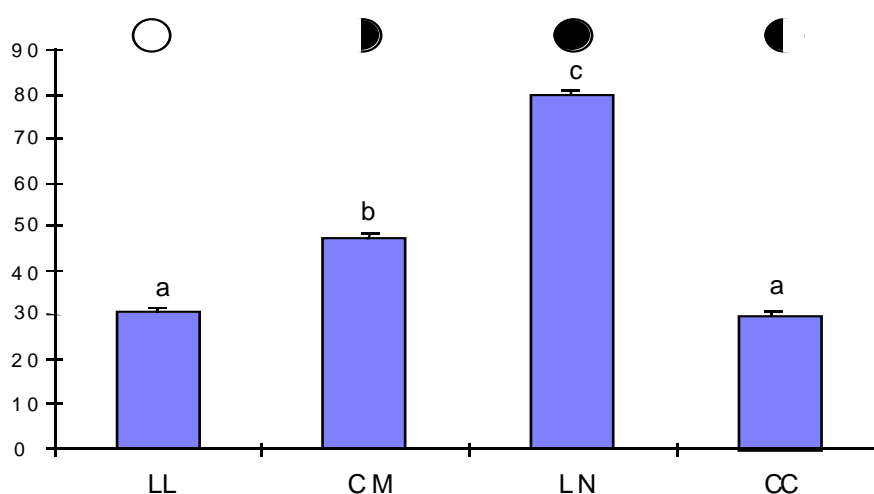


Figura 1. Camarones que mudan por fase de luna. Cuarto menguante (CM); Luna llena (LL); Cuarto creciente (CC); Luna nueva (LN).

2.2. Tasa de ingestión

La cantidad de alimento consumido en los estadios B, C y Do fue significativamente mayor ($P < 0,05$) que en los estadios A, D1, D2 y D3. No se encontró diferencias estadísticas ($P > 0,05$) entre B, C y Do ni entre A, D1, D2 y D3. La figura 2 muestra desde premuda D1 hasta postmuda A, un período de consumo de alimento inferior al 3% de la biomasa. Es a partir de postmuda tardía B hasta premuda temprana Do que los camarones aumentan en al menos 33% su ingestión de alimento alcanzando en intermuda (C) un consumo superior al 50% de lo observado durante premuda D1 a postmuda A.

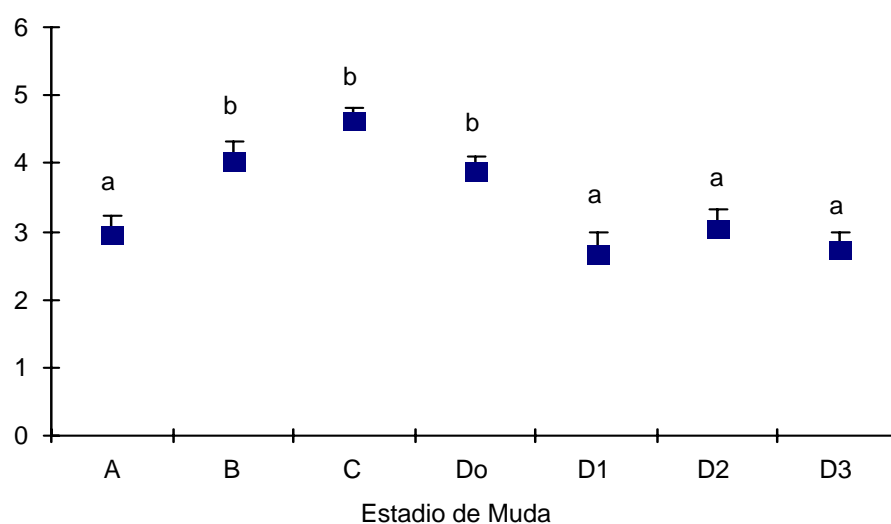


Figura 2. Tasa de ingestión del *P. vannamei* por estadio de muda después de un mes de alimentación. Las barras verticales indican el error estándar basado en 6 réplicas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

2.3. Índice hepatosomático y glicógeno

La figura 3 muestra que los camarones alcanzan un índice hepatosomático (3,7%) significativamente ($p < 0,05$) mayor en los estadios B, C y Do comparado con A, D1 y D3 aunque postmuda temprana A no es estadísticamente diferente ($P > 0,05$) de postmuda tardía B.

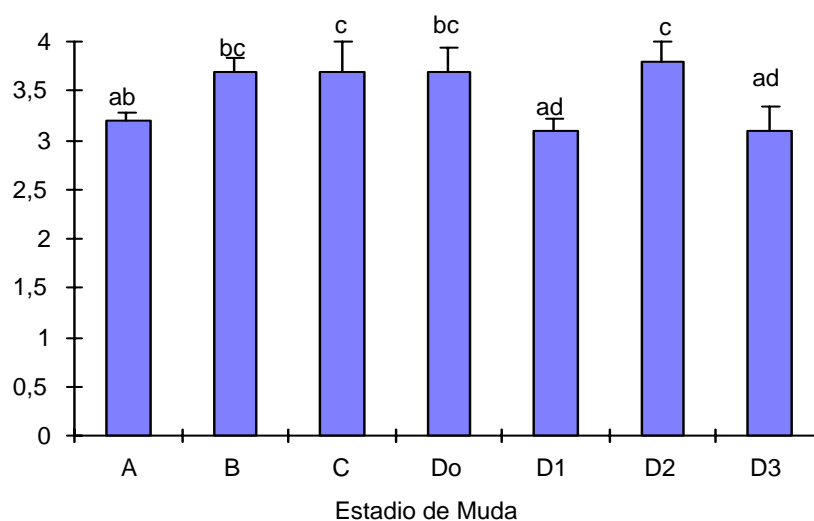


Figura 3. Índice hepatosomático por estadio de muda. Las barras verticales indican el error estándar. Letras iguales no son diferentes estadísticamente ($p > 0,05$).

En lo que respecta a la concentración de glicógeno en el hepatopáncreas del camarón, se encontró que existe una mayor cantidad de este nutriente en los estadios de postmuda A y premuda D1 y D3. Además se encontró que, entre los estadios A y B sí existen diferencias significativas (Fig. 4).

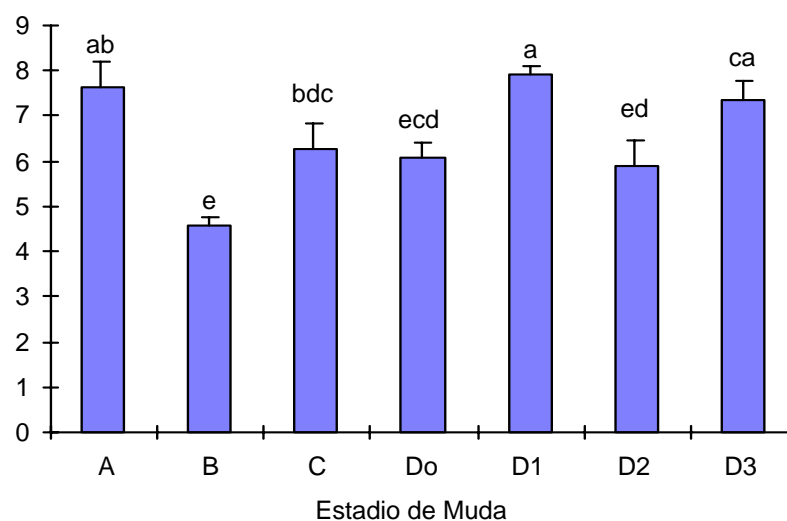


Figura 4. Concentración de glicógeno por estadio de muda. Las barras verticales indican el error estándar ($n=10$). Letras iguales no son diferentes estadísticamente ($p > 0,05$).

2.4. Actividad enzimática

El LSD mostró la mayor actividad de amilasa en los camarones en estadio Do el cual fue estadísticamente superior ($P < 0,05$) a D1, D3, A, B y C aunque no significativamente diferente ($p > 0,05$) a D2. No hubo diferencias significativas entre la actividad de amilasa en el estadio D2 y los registrado en B y C pero si fue diferente con respecto a D3 y A (Fig. 5).

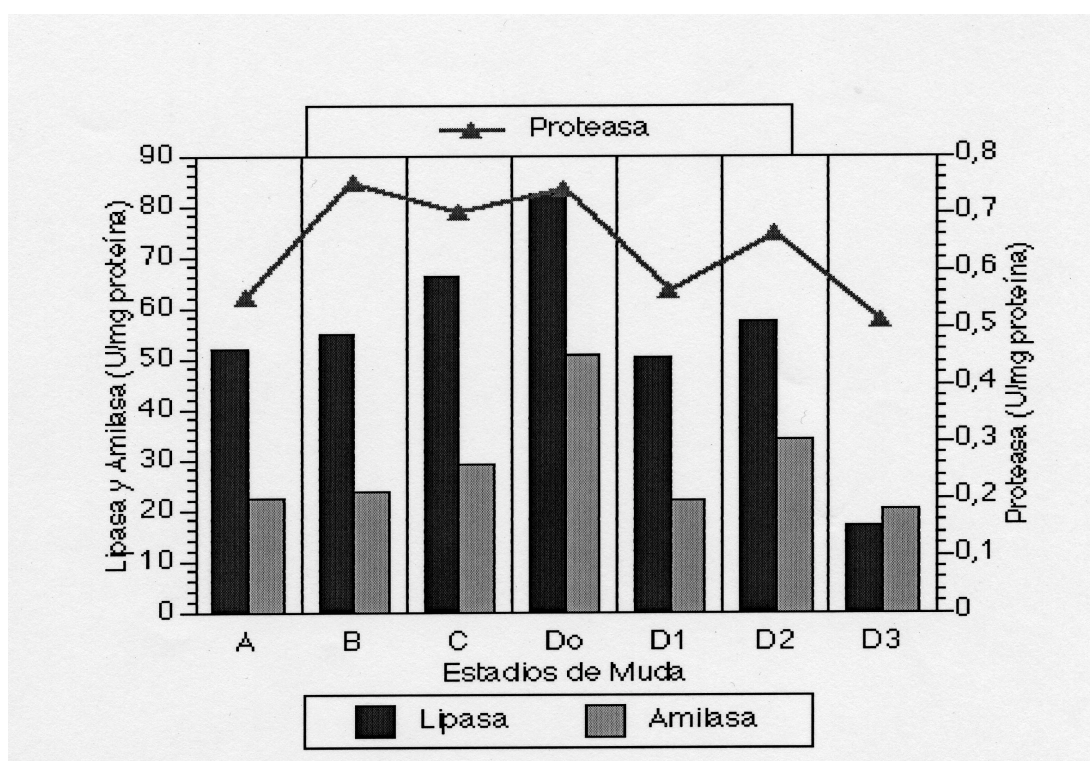


Figura 5. Actividades específicas de Lipasa, amilasa y proteasa por estadio de muda en el juvenil *P. vannamei*.

La actividad específica de las proteasas (Fig. 5) presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) menor en los estadios A, D1 y D3 con los estadios B, C, Do y D2. No se encontró diferencias estadísticas ($P > 0,05$) entre A, D1 y D3 ni entre B, C y Do. Un segundo pico de actividad fue registrado en D2 el cual no fue estadísticamente diferente ($P > 0,05$) de ninguno de los otros estadios a excepción de D3.

La actividad específica de lipasa fue significativamente ($p < 0,05$) menor en el estadio D3. La mayor actividad específica fue encontrada en el estadio Do siendo estadísticamente diferente ($p < 0,05$) a los demás estadios a excepción de C y D2. La actividad de lipasa en los estadios D2, D1, A, B y C no mostraron ser diferentes estadísticamente ($p > 0,05$) entre ellos (Fig. 5).

2.5. Ensayo de crecimiento

Después de 60 días de cultivo el análisis de ANOVA no reportó diferencias estadísticas ($p > 0,05$) entre las biomásas ganadas y crecimientos específicos de los camarones alimentados con las 3 raciones alimenticias (Tabla III). En tanto que si se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los pesos promedios finales. Los camarones alimentados en base a la tabla de alimentación crecieron 0,78 g significativamente ($p < 0,05$) más que los otros dos tratamientos B y C. Es importante resaltar que, a pesar de no encontrarse diferencias estadísticas ($P > 0,05$) entre supervivencias (Tabla III) los camarones alimentados en función de estadio de muda

presentaron una menor mortalidad y variabilidad de resultados entre sus réplicas en comparación con los otros tratamientos aún bajo el continuo muestreo semanal. El grupo de camarones alimentados en función del estadio presentó un factor de conversión alimenticia significativamente menor ($P < 0,05$) a los tratamientos A y B (Tabla III). No se encontró diferencia significativa ($P > 0,05$) entre estos dos últimos tratamientos. Así también la mejor tasa de eficiencia proteica fue presentada por el tratamiento C y la menor por el tratamiento A.

Tabla III. Valores promedio (\pm error estándar) obtenidos después de 8 semanas de alimentación a juveniles *P. vannamei*.

Determinaciones	Tratamiento A	Tratamiento B	Tratamiento C
Peso corporal inicial (g)	1,56 \pm 0,01	1,56 \pm 0,02	1,63 \pm 0,03
Peso corporal final (g)	5,75 \pm 0,25a	4,97 \pm 0,26b	4,97 \pm 0,18b
Incremento semanal (g)	0,53 \pm 0,06	0,43 \pm 0,07	0,42 \pm 0,06
Biomasa inicial (g)	12,48 \pm 0,24	12,46 \pm 0,13	13,08 \pm 0,11
Biomasa final (g)	34,06 \pm 2,00a	32,14 \pm 2,31a	32,98 \pm 1,62a
Factor de conversión alimenticia	2,120 \pm 0,12a	2,45 \pm 0,18a	1,18 \pm 0,10b
Supervivencia (%)	75 \pm 5,27a	81,25 \pm 5,27a	82,81 \pm 2,29a
Total alimento suministrado (g)	112,15 \pm 0,44a	76,97 \pm 0,37ba	77,66 \pm 0,37ba
Intensidad de luz (Lux)	114,38 \pm 20,95a	128,13 \pm 16,45a	123,13 \pm 29,12a
Total de proteína suministrada (g)	41,16 \pm 0,025a	30,74 \pm 0,23a	30,89 \pm 0,16a
Eficiencia proteínica (E.P)	0,82 \pm 0,02a	1,21 \pm 0,01b	1,66 \pm 0,04c
Tasa de crecimiento específico (%)	1,77 \pm 0,10a	1,66 \pm 0,14a	1,64 \pm 0,07a

Valores con letras iguales en una misma fila no son diferentes estadísticamente ($p > 0,05$).

3. CONCLUSION

3.1. Ciclo de muda

Es conocido que condiciones ambientales como las fases lunares ejercen influencia sobre la fisiología de los crustáceos originando respuestas diversas en éstos (12) (14) (22). Los resultados de esta investigación muestran una ritmicidad lunar con el ciclo de muda, encontrándose cerca de la mitad de la población de camarones mudada en cuarto menguante alcanzando la mayor proporción de animales mudados en luna nueva (80%). El conocimiento de una sincronización de la muda de los camarones en sistemas de cultivo comerciales y una probable correlación con el ciclo lunar, puede ayudar a simplificar el suministro de alimento, con el consiguiente ahorro que implica el no proporcionar nutrientes en etapas de menor consumo.

3.2. Tasa de ingestión

En este ensayo se observó un 18% más de consumo de alimento desde el estadio de postmuda tardía B hasta premuda temprana Do, aunque en término de duración, este período y el comprendido entre D1 y A sean iguales, de aproximadamente 6 días cada una. Esta disminución del consumo de alimento en los estadios previos a la muda también ha sido observado en el *P. esculentus* (13) y en *P. vannamei* (10) y ha sido recientemente relacionada en crustáceos con la presencia de receptores de ecdiesteroides en el esófago anterior los cuales lo dilatan afectando la ingestión de

alimento (21). Esta relación podría tener validez si consideramos que en *P. japonicus* y *M. rosenbergii* la concentración total de ecdiesteroides alcanzan su máximo nivel en premuda temprana D1^m y regresa a los valores basales en postmuda temprana A (5). Este último es justamente el período donde se observó una reducción del consumo de alimento en el presente trabajo.

3.3 Actividad enzimática

En el presente estudio, los estadios B, C y Do, fueron los que presentaron la mayor actividad específica de proteasa coincidieron con la etapa donde el camarón consume más alimento. El total de lípidos presente en el hepatopáncreas del camarón es mayormente utilizado como reserva de energía durante el ayuno y la muda (4). En otra investigación se reportó que el *P. japonicus* alcanzó la mayor concentración de lípidos en el hepatopáncreas en Do y en todo el animal en D2, (36) (2). Considerando que la enzima lipasa actúa sobre los lípidos, esto podría explicar por que en este estudio en el estadio Do se produjo la máxima actividad de lipasa en la etapa previa a la muda D3 la actividad más baja.

Las tres enzimas evaluadas muestran 2 picos de actividad enzimática, el primero es considerado como una respuesta al estímulo alimenticio, en este caso una determinada enzima digestiva se expresará en mayor o menor grado dependiendo de la cantidad y origen de los nutrientes (27) (28) En tanto que el segundo pico puede ser atribuido principalmente a una estimulación endocrina de la síntesis de enzimas digestivas, por la alta producción de ecdiesteroides observados en premuda D2 para la mayoría de especies crustáceos decápodos (5) 10) (34).

El nivel de glicógeno del hepatopáncreas estuvo alrededor de los 6 mg/g encontrado en *Metapenaeus* por (12). Una mayor acumulación de glicógeno se observó, a excepción de D2, desde el estadio D1 hasta postmuda temprana A en parte por el consumo del alimento y además probablemente por la reabsorción de la quitina presente en el viejo exoesqueleto. Esta última observación puede ser sustentada por el aumento de la actividad de la quitinasa en la fase de premuda tardía en *P. japonicus* (23). La menor concentración de glicógeno en el estadio D2 probablemente se debió por el aumento de la actividad de la amilasa o a una mayor concentración de la hormona crustácea hiperglicémica (cHH) mecanismos por los cuales se generaría una cantidad adicional de glucosa para cubrir su requerimiento energético o de síntesis de quitina.

3.4. Ensayo de crecimiento

De las tres raciones alimenticias evaluadas el mayor peso final fue observado en el tratamiento que seguía la tabla de alimentación, aunque no se encontró diferencias en términos de biomasa ganada entre las tres raciones. El factor de conversión alimenticia, fue menor en el tratamiento donde se utilizó la ecuación para alimentar a los camarones de acuerdo a los estadios de muda. La tasa de alimentación usada en los tratamientos no afectó de manera significativa el crecimiento de los camarones. Con estos resultados podemos concluir que se pueden obtener resultados positivos

cuando se aplica el alimento en cantidades óptimas para su crecimiento pero en las etapas donde el camarón lo pueda aprovechar al máximo y los requiera en mayor cantidad.

El establecer el momento del día en que el camarón se encuentra fisiológicamente preparado para aprovechar el alimento que se le esta suministrando es un importante aspecto que no siempre es considerado. Por lo tanto, una estrategia de alimentación adecuada a los hábitos naturales de alimentación de la especie en cultivo, y las etapas fisiológicas por la que atraviesan los organismos, permitirá maximizar la eficiencia de utilización del alimento, reducir los excesos de alimentos no consumidos, disminuir el tiempo de exposición del alimento al agua evitando así la consiguiente pérdida de nutrientes por lixiviación y estabilidad física del balanceado.

REFERENCIAS

1. AKIYAMA, D AND CHUANG, J. 1989. Shrimp feed requirement and feed management. in Proceedings of the SE Asia shrimp farm Management Akiyama, D.M. (ed.). American Soybean Association Singapore. pp: 75-82.
2. ANDO, T., KANASAWA, A., TESHIMA, S., 1977. Variation in the lipids of tissues during the molting cycle of prawn. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 43: 1445-1449.
3. BADOR, R. F. 1998. Uso de las charolas de alimentacion para el cultivo de camaron en sudamerica en IV simposium de nutricion acuicola. La Paz. b.s.c. México.
4. BARCLAY, M.C., DALL., AND SMITH, D. M., 1983. Changes in lipids and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn, *Penaeus esculentus* Haswell. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 68: 229-244.
5. BLAIS, C., SEFIANI, M., TOULLEC, J. Y., AND SOYEZ, D., 1994. In vitro production of ecdysteroids by Y-organs of *Penaeus vannamei* (Crustacea:Decapoda). Correlation with hemolymph titer. Invert. Reprod. Dev:26:3-12.
6. BRADFORD, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254
7. BRAND, C. AND COLVIN, L., 1979. Compounded diets for early postlarval *Penaeus californiensis* Journal World Mariculture Society., pp: 811-820.
8. CADENA, E. Relación entre el ciclo de muda y la actividad de las enzimas digestivas y su efecto en la tasa de alimentación y crecimiento del juvenil *P. vannamei*. Tesis, Facultad de Marítima, ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL, 1999
9. CUZON, G., HEW, M., COGNIE, D. AND SOLETECHNIK, P. 1982. Time lag effect of feeding on growth of juvenile shrimp, *Penaeus japonicus* Bate Aquaculture 29: 33-44.
10. CHAN, S. M., RANKIN, S. AND KEELEY, L. 1988. Characterization of the moult stages in *P. vannamei* : Setogenesis and Hemolymph levels of total protein, Ecdysteroids, and glucose. Bol. Bull 175: (185-192).
11. DALL, W. 1990. The Biology of the Penaidae. in Blaxter, J. and Southward, A (eds.). Advances in Marine Biology. Vol 27 Academic press, San Diego. pp: 21-29.
12. DALL, W., 1965. Studies on the physiology of a shrimp, *Metapenaeus* sp. (Crustacea: Decapoda: Penaeid) IV. Carbohydrate metabolism. Aust. J. Mar. Freshwater Res. 16, 163-180
13. DALL, W. 1986. Estimation of routine metabolic rate in a penaeid prawn, *Penaeus esculentus*. Haswell. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 96: 57-74

14. DeCOURSEY, P. J. 1983. Biological timing. in Verberg, F. and Verberg, W (eds.). The Biology of crustacea. Vol. 7 Academic press, New York, pp: 107-162.
15. DIAZ-GRANDA, E. 1997. Horario de alimentación del *Penaeus Schmitti* en condiciones de cultivo semi-intensivo., en Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Marinas, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba.
16. DUBOIS, M., GILLES, K. A., J. K. REBER, P. A. AND SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 28:350-356.
17. GALGANI, F. 1988. Etude comparative des protease digestives de cinq espèces de crevettes peneides. biochem. systematics and ecology. vol.16 no 5.pp: 497-504
18. GALGANI, F. AND BENYAMIN, Y. 1985. Radioimmunoassay of shrimp trypsin application to the larval development of *Penaeus japonicus* Bate. J. Experi. Marin. Biolog. and Ecolog. Vol. 87: 145 -151.
19. GALGANI, F. AND BENYAMIN, Y., AND VAN HORMHOUDT, A. 1985. Purification, Properties and immunoassay of trypsin from the shrimp *Penaeus japonicus* Bate. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 81B: 447 - 452.
20. GARCIA-CARREÑO, F. L., HAARD, N. F., 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (Pleurocondes Planipes) and Crayfish (*Pacifastacus Astacus*) extracts. J. Food Biochem. 17:97-113.
21. GUCKLER, R., HEINZEL, H. G., AND TOMASCHKO, K. H. 1999. Membrane-Associated ecdysteroid receptors in decapods crustaceans. Occurrence, Sensitivity and Neuronal Integration.
22. GRIFFITH, D. R. AND WIGGLESWORTH, J. M. 1993. Growth rhythms in the Shrimp *Penaeus vannamei* and *Penaeus schmitti*. Marine Biology 115: 295 299.
23. KONO, M., WILDER, M., MATSUI,T., FURUKAWA, K., KOGA, D. AND AIDA, K. 1995. Chitinolytic Enzymes activities in the hepatopancreas, Tail fan and Hemolymph of Kuruma Prawn *P. japonicus* during the Molt cycle. Fish. Sci. 61(4) 727- 728.
24. KUO, CHING-MING AND LIN, WEN-WEN. 1996. Changes In Morphological Characteristic And Ecdysteroids During The Molting Cycle Of Tiger Shrimp, *Penaeus Monodon* Fabricus, Zoological Studies 35(2): 118-127.
25. KLEIN, B., Le MOULLAC, G., SELLOS, D. AND VAN HORMHOUDT A. 1997. Molecular Cloning and Secuencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Use in assessing gene expression during the moult cycle. Int. J. Biochem. Cell Biol. Vol. 28 No 5 pp: (551-563).
26. Le BOULAY, C., HORMHOUDT A.V., AND SELLOS, D. 1996. Cloning and expression of cathepsin l-like proteinasa in the hepatopancreas of the shrimp *P. vannamei* during the intermolt cycle. J. Comp. Physiol. 166: 310-318.
27. Le MOULLAC, G., KLEIN, B., SELLOS, D. AND VAN HORMHOUDT A. 1997. Adaptation of trypsin, chymiotrypsin and α - amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) J. Experi. Marin. Biolog. and Ecolog. 208: 107 -125.
28. Le MOULLAC, G., VAN HORMHOUDT, 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 (crustaceo, decapoda). Aquatic Living Resource, 7: 203-210
29. LEE, P. AND LAWRENCE, A. 1996. Feeding strategies to optimize production efficiency on Prawn farms. Marine Biomedical Institute. University of Texas Branch.
30. NOLASCO, H. 1998. Actividad enzimatica digestiva, ritmos circadianos y su relación con la alimentación de camarón. IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Parte I.
31. RICK, W. AND STEGBAUER, H. 1974. α -amilasa en: Methods of enzymatic analysis. eds. Bergmeyer H. U. Academic Press Vol. 2. pp: 885-890

32. ROBERTSON, L., BRAY, W., LEUNG-TRUJILLO J. AND LAWRENCE, A. 1987. Practical Molt Staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus Stylirostris*. J. World Aquacult. Soc., 18(3): 180 - 185
33. SMITH, D. AND DALL, W. 1985. Molt staging the tiger prawn *Penaeus esculentus* . in Second Australian National Seminar. PC. Rothlisberg, Hill, B. and Staple, D. (eds) Cleveland. Australia. pp: 85-95.
34. SKINNER, D. M. 1985. MOLTING AND REGENERATION. In The Biology Of Crustacea, Vol 9 (Eds) Bliss, D. And Mantel, L. Academic Press pp:43-128.
35. SUGAI, J. K., ORENHA, C. E. AND LOPEZ, K. 1998. Variaciones circadianas de la actividad de la amilasa y maltasa en juveniles de camarón rosa *Penaeus paulensi* (Perez Farfante 1967) In IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Parte I. La Paz, B.S.C Mexico. abstract.
36. TESHIMA, K. AND OKAMOTO, H., 1977. Variation in lipids classes during the moulting cycle of the *Penaeus japonicus*, Mar. Biol. 39: 129-136.
37. VAN HORMHOUDT, A. AND SELLOS, D. 1996. Cloning and sequencing Analysis of three amylase cDNAs in the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) Evolutio. Aspect. J. Mol. Evol. 42: 543 - 551.
38. VAN HORMHOUDT, A., DANVAL, A. , PLAIRE-GOUX, S., LE MOULLAC, G AND SELLOS, D. 1995. Chymiotrypsin gene expression during the intermolt cycle in the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). Experientia. Vol. 51: 159 -163.
39. VAN HORMHOUDT, A., G. BOURREAU, AND LE MOULLAC. 1995. Amylase polymorfphism in (crustacea: Decapoda). Electroforetic And Immunological Studies. Biochemical Systematic And Ecology, VOL 23 (2) 139 -149.
40. VERSAW, W K., AND METZENBERG R. L. 1989 Activator independent gene expression in *Neurospora crassa*. Genetic. 142: 417-423.