



**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y
BIOLÓGICAS**

**CARRERA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

**“EFECTO DE DOS TEMPERATURAS DE CULTIVO SOBRE LA
ACTIVIDAD DE PROTEASA TOTAL DEL CAMARÓN BLANCO
(*Penaeus vannamei*)”**

Tesis para optar el título profesional de:

Médico Veterinario Zootecnista

Presentado por:

Benjamín Esteban Castro Nole (0000-0002-0243-6145)

Asesor:

Connie Gallardo Vela (0000-0002-8070-8767)

Lima – Perú

2020

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Lima, 07 de octubre del 2020.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Mg. SERGIO PAOLO BARAHONA PADILLA
Miembro: Mg. GIOVANNA JANET GÓMEZ OQUENDO
Miembro: Blgo. PAUL MARTIN BALTAZAR GUERRERO

Se reúnen para evaluar la tesis titulada:

“EFECTO DE DOS TEMPERATURAS DE CULTIVO SOBRE LA ACTIVIDAD DE PROTEASA TOTAL DEL CAMARÓN BLANCO (*Penaeus vannamei*)”

Presentada por el bachiller:

BENJAMIN ESTEBAN CASTRO NOLE

Para optar el Título Profesional de **Médico Veterinario y Zootecnista**

Asesorada por: **Dra. CONNIE GALLARDO VELA**

Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño de la Bachiller de la carrera de **Medicina Veterinaria y Zootecnia** en la sustentación, concluyen de manera unánime (---) por mayoría simple (x) calificar a:

Tesis: BENJAMIN ESTEBAN CASTRO NOLE			Nota (en letras): Dieciocho	
Aprobado ()	Aprobado - Muy buena (x)	Aprobado - Sobresaliente ()	Desaprobado ()	

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.


Mg. SERGIO PAOLO BARAHONA PADILLA
Presidente


Dra. CONNIE GALLARDO VELA
Asesora


Mg. GIOVANNA JANET GÓMEZ OQUENDO
Miembro 1


Blgo. PAUL MARTIN BALTAZAR GUERRERO
Miembro 2

**Efecto de dos temperaturas de cultivo sobre la actividad de proteasa total del
camarón blanco (*Penaeus vannamei*)**

Castro Nole B^{a,b}., Espinoza Pardo C^b., Gallardo Vela C^a.,

^aFacultad de Ciencias Biológicas y Veterinarias. Universidad Científica del Sur, Lima 12,

Lima, Perú.

^bÁrea de Feed Technology de VITAPRO S.A. (Perú), Lima 18, Lima, Perú.

Título referencial: Proteasa en *Penaeus vannamei*

Autor correspondiente: bcastron@vitapro.com.pe

Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de dos temperaturas de cultivo sobre la actividad de proteasa total en el camarón blanco. Para el estudio se emplearon 500 camarones adultos con peso promedio de 20.5 ± 0.15 g, expuestos por 18 días a dos tratamientos experimentales (27 °C y 31 °C), considerando 50 camarones/repetición y 5 repeticiones/tratamiento. Después de 18 días de cultivo se extrajeron los hepatopáncreas para calcular el índice hepatosomático (iHS) y determinar tanto la actividad de proteasa total específica (APTE) como la actividad simulada de proteasa total específica (ASPTE). Se encontró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) en el iHS, APTE (U/mg de proteína a una temperatura de reacción de 35°C) y ASPTE (U/mg de proteína a temperaturas de reacción 27 y 31°C). Los camarones cultivados a 27°C mostraron un mayor iHS y APTE a comparación de los cultivados a 31°C. Sin embargo, ASPTE fue significativamente mayor ($p < 0.01$) a una temperatura de reacción de 31°C en comparación con aquellos cultivados a 27°C, indicando una eficiente actividad proteasa a dicha temperatura. Nuestros resultados sugieren que los camarones cultivados a 27°C incrementan ligeramente el tamaño del hepatopáncreas e incrementan significativamente la producción de proteasas a modo de un posible mecanismo de compensación fisiológica digestiva ante la disminución de la temperatura óptima de cultivo.

Palabras clave: camarón blanco, enzimas, proteasa, temperatura

Abreviaciones: iHS, APTE y ASPTE.

1. Introducción

De acuerdo con FAO (2019b) en el año 2017 la producción del camarón blanco (*Penaeus vannamei*) representó el 5.6 % en volumen y 11.3 % en valor (dólares) de la producción acuícola global lo que corresponde a un 7.3 % (volumen) y 8.1 % (valor) más respecto al 2016. Además, la producción de camarón blanco representó el 49 % de la producción mundial de camarón en el año 2018 (3.86 millones de toneladas) (FAO, 2019a). Esto muestra la importancia productiva y económica del camarón blanco en la acuicultura general y camaronicultura.

De acuerdo con Hill y Wyse (2006) en animales poiquilotermos, las variaciones en la temperatura de cultivo implican cambios de la velocidad de las reacciones bioquímicas, generando una ralentización o aceleración del metabolismo. En efecto, la temperatura del agua es uno de los parámetros fisicoquímicos de mayor importancia para el desarrollo y el crecimiento en peneidos (Staples y Heales, 1991; O'Brien, 1994).

Existe una asociación entre el peso de camarón blanco y las temperaturas de cultivo sobre las tasas de crecimiento. Díaz et al. (2001) y Ponce et al. (1997), al cultivar juveniles de camarones blancos con pesos de 0.02 g y 3.20 g, respectivamente, encontraron un mayor crecimiento a temperaturas de 27°C y 35°C comparados con aquellos cultivados a 20 y 25°C. Walker et al. (2011) al cultivar camarones blancos de 12.5 g a diferentes temperaturas, encontraron que los camarones cultivados a 28 y 32°C presentaron mayor crecimiento en comparación con aquellos criados a 20 y 24°C.

Wyban et al. (1995) evaluaron el efecto de tres temperaturas (23, 27 y 30 °C) de cultivo sobre el crecimiento y la conversión alimenticia de camarones blancos con pesos de 3.9, 10.8 y 16.0 g. Los autores mencionaron que el crecimiento y la conversión

alimenticia aumentaron en relación con las temperaturas de cultivo. En los tres tamaños de camarón la temperatura de 23°C resulta no ser óptima para el crecimiento de los camarones y que valores entre 27 a 30°C permiten las mejores tasas de crecimiento para camarones de 10.8 g (27°C), 3.9 g y 16 g (30°C).

El órgano encargado realizar la digestión y asimilación de nutrientes en los camarones es el hepatopáncreas (Tsai et al., 1991; Cuartas et al., 2002; Cuartas, 2003). Este órgano secreta proteasas que hidrolizan las proteínas del alimento en péptidos. Una de estas proteasas es la tripsina que también se encarga de activar otras proteasas como la quimotripsina (Cohen et al. 1981).

La actividad enzimática de todas estas proteasas se denomina actividad de proteasa total específica (APTE). Esta actividad se calcula midiendo la aparición de productos como aminoácidos y pigmentos por espectrofotometría (Casillas-Hernández, 2006).

Dado que una alta secreción de proteasas puede asegurar una buena asimilación nutricional y por tanto un alto índice de conversión (Casillas-Hernández, 2006), se evaluó el efecto de dos temperaturas de cultivo (27°C y 31°C) sobre la actividad de proteasa total específica (APTE, hidrólisis de azocaseína por extracto enzimático a 35°C, forma indirecta para comparar cantidad de proteasa) (Casillas-Hernández, 2006) y la actividad de la proteasa total específica simulada (ASPTE, hidrólisis de azocaseína por extracto enzimático a 27/31°C, metodología modificada de Casillas-Hernández, 2006), para determinar la actividad de las proteasas en el extracto enzimático simulando las condiciones de cultivo. Adicionalmente se midió el peso del hepatopáncreas con respecto al peso total del camarón para determinar el índice hepatosomático (iHS).

2. Materiales y métodos

2.1. Sistema acuícola

El experimento fue desarrollado en el Centro Experimental Acuícola de VITAPRO sede CIENTIFICA, ubicado en el distrito de Villa el Salvador (Lima, Perú; coordenadas geográficas decimales: -12.223772, -76.977291). Se sembraron 500 camarones (*Penaeus vannamei*) proporcionados por el CEA-CIENTÍFICA con un peso promedio de 20.5 ± 0.15 g en 10 tanques circulares con un volumen de 1800 L de agua marina. Los tanques se mantuvieron conectados a sistemas de recirculación acuícola equipados con filtros mecánicos, biofiltro, esterilizador de lámpara UV, calentadores y sistema de aireación. Cada tanque contaba con comederos de malla de nylon.

2.2. Alimentación

Se utilizó un alimento comercial peletizado de 2.0 mm cuya composición proximal se detalla en la tabla 1, la cual es formulada para camarones adultos con pesos aproximados de 20 g (Siccardi et al., 2006). El alimento fue entregado dos veces al día (a las 09:00 y 15:00 horas). La tasa de alimentación fue del 4 % de la biomasa.

Tabla 1. Composición nutricional del alimento comercial balanceado Katal® (Nicovita) 2.0mm empleado en el estudio

Nutrientes	Porcentaje (%)
Humedad	9.94
Grasa	8.99
Ceniza	8.79
Proteína	35.89
Carbohidratos	34.73
Fibra	1.66

*Análisis realizados en el Laboratorio central de VITAPRO S.A. en la planta de alimento balanceado de Trujillo.

**Fórmula cualitativa (ingredientes): Harina de pescado y otros de origen marino, aceite de pescado, harina de semillas oleaginosas, cereales y subproductos, lecitina de soya, fosfato de sodio/potasio, carbonato de calcio, cloruro de sodio, preservante, premezcla de minerales y vitaminas, aminoácidos sintéticos (metionina y lisina).

2.3 Diseño experimental y manejo

Para el estudio se acondicionaron 500 camarones adultos con peso promedio de 20.5 ± 0.15 g durante 3 días desde una temperatura de 29°C , la cual fue modificada incrementando o reduciendo hasta 31°C o 27°C (temperatura de los tratamientos experimentales) respectivamente a una tasa de 0.1°C cada 4 horas. Luego, se mantuvieron durante 18 días, en dos tratamientos experimentales (27°C y 31°C), 250 individuos para cada tratamiento (5 repeticiones por tratamiento y 50 individuos por repetición). El cultivo experimental consideró una densidad de 25 camarones/ m^2 .

Durante todo el experimento los parámetros de calidad de agua se mantuvieron dentro de los rangos recomendados de oxígeno (> 4.0 mg/L), pH (8.0 ± 0.1), alcalinidad (> 120 mg/L), NH_3 (< 0.2 mg/L) (Lin y Chen 2001) y NO_2 (< 3.17 mg/L) (Lin y Chen 2003). Diariamente y dos veces al día se monitoreó la temperatura de los tanques (Tanques 27°C : $27 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ y tanque 31°C : $31^{\circ}\text{C} \pm 0.3^{\circ}\text{C}$).

2.4 Obtención de muestras

Al término del día 17 de cultivo se sifonearon los tanques de cultivo extrayendo heces, restos de comida y muda, para someter a los camarones a un ayuno de 24 horas.

Al día 18 de cultivo, se muestrearon individuos a un ritmo de 24 camarones en intermuda (según característica de urópodos) (De Oliveira, et al., 2016) cada 3 horas por un periodo de 24 horas. Se pesaron a los camarones usando una balanza electrónica con precisión de 0.01 g (Ohaus SPX 621). Posteriormente, los camarones fueron sacrificados con baño de agua a 5 °C (Gamboa-Delgado et al., 2003), disectados para obtener sus hepatopáncreas y almacenados a -20 °C.

2.5 Procesamiento de muestras y cuantificación de la actividad proteasa

Los hepatopáncreas fueron pesados en una balanza analítica con precisión de 0.01 g (Kern® ABS 220-4N) y se calculó el índice hepatosomático (iHS) mediante la siguiente fórmula:

$$iHS = \frac{\text{Peso de hepatopáncreas}(g)}{\text{peso de camarón}(g)} * 100$$

Luego del pesaje, los hepatopáncreas fueron colocados en tubos centrífuga de 15 ml y homogenizados en solución Tris-HCl 50 mM con pH 8.0 (1:2 p/v) usando una varilla de vidrio (Casillas-Hernández, 2006). Este homogenizado fue centrifugado a 3305 de FCR (Fuerza centrífuga relativa) durante 40 minutos a 5 °C. El sobrenadante, considerado como extracto enzimático, fue recuperado y almacenado a -20 °C

La actividad de proteasa total específica (APTE) se determinó usando la metodología de Casillas-Hernández (2006). Para esto, se incubó 20 µl de extracto enzimático con 230 µl de buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8) y 500 µl de sustrato cromogénico azocaseína 0.5% durante 30 minutos a una temperatura de reacción de 35 °C. Luego de la incubación se agregó 500µl de ácido tricloroacético (ATC) 20% (p/v) y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente con el fin de detener la reacción. Finalmente, se

centrifugó a 6866 FCR durante 10 minutos a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante en tubos microcentrífuga de 1.5 ml.

Se midió por triplicado la absorbancia de los sobrenadantes a una longitud de onda de 440 nm utilizando un espectrofotómetro calibrado Spectronic® Genesys 20 (Thermo Scientific Inc, Rochester, NY, USA). La actividad de proteasa total (APTE) se expresó como U/mg proteína, donde la unidad de actividad de proteasa (U) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para incrementar la absorbancia en 0.01 unidades a 440nm por minuto. La concentración de proteína de los extractos enzimáticos se cuantificó usando el método de proteínas totales de Biuret (Gornall, 1949).

Para determinar la actividad simulada de proteasas total específica (ASPTE) de los sobrenadantes se cambió la temperatura de reacción del extracto enzimático con la azocaseína de 35 °C a 27 °C y 31 °C (dependiendo del tratamiento de origen de los extractos enzimáticos).

2.6 Análisis estadístico

Se utilizó el Software R (v. 3.1.0). Se evaluó la normalidad de los datos utilizando Shapiro-Wilk y homogeneidad de varianzas los cuales presentaron una distribución normal y homogénea. Se utilizó la prueba de T-Student para comparar las medias de los tratamientos considerando un nivel de significancia de 5 %.

3. Resultados

Luego de los 18 días de tratamiento no se observaron diferencias significativas entre los pesos finales de los camarones cultivados a 31 y 27 °C. No obstante, si las hubo en el peso de hepatopáncreas e iHS. El peso de hepatopáncreas e iHS en camarones

cultivados a 27 °C fueron un 4.8 % y 5.8 % mayores que en los camarones cultivados a 31°C (Tabla 2).

Tabla 2. Pruebas t-student para la comparación de medias de las tres variables relacionadas al peso obtenidos en las dos temperaturas experimentales

Variable	Tratamiento	Media	N	DE	EEM	p-valor
Peso final luego de 18 días de tratamiento (g)	27°C	23.01	250	0.79	0.095	0.2410
	31°C	23.23	250	0.92		
Peso del hepatopáncreas (g)	27°C	0.673	250	0.04	0.010	0.0022*
	31°C	0.642	250	0.04		
Índice hepatosomático (iHS)	27°C	2.925	250	0.15	0.020	<0.001*
	31°C	2.765	250	0.16		

Leyenda: N: número de individuos por tratamiento, DE: Desviación estándar, EEM: Error estándar de la media, (*) indica diferencia significativa ($p < 0.05$) según la Prueba de t-Student

La temperatura de cultivo tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$): a 27°C se obtuvo un mayor APTE respecto a 31°C. Por otro lado, la ASPTE fue significativamente mayor a 31°C que a 27°C ($p < 0.05$) (Tabla 3, Figura 1).

Tabla 3. Pruebas t-student para la comparación de medias de las dos variables respuesta (actividades proteasa) en las dos temperaturas experimentales

Variable	Tratamiento	Media	N	DE	EEM	p-valor
APTE	27°C	35.97	250	1.42	0.320	<0.001*
	31°C	26.72	250	1.65		
ASPTE	27°C	21.76	250	1.24	0.112	<0.001*
	31°C	23.95	250	1.43		

Leyenda: N: número de individuos por tratamiento, DE: Desviación estándar, EEM: Error estándar de la media, (*) indica diferencia significativa ($p < 0.05$) según la Prueba de t-Student

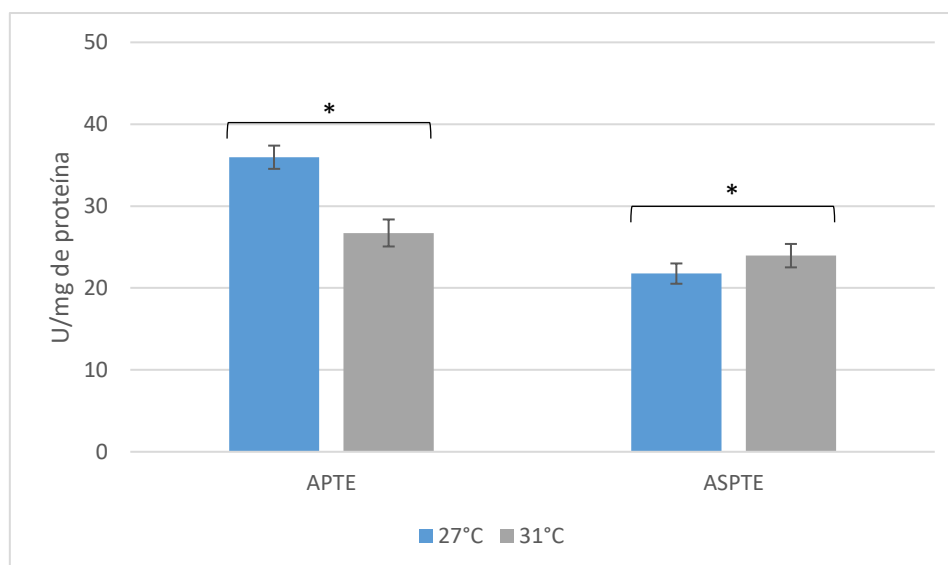


Figura 1. Comparación de Apte y ASpte después de un periodo de exposición de 18 días a ambas temperaturas experimentales (27°C y 31°C). Leyenda: (*) indica diferencia significativa ($p < 0.05$) según la Prueba de t-Student

4. Discusión

Se ha descrito que las variaciones de temperatura influyen la tasa metabólica, el crecimiento (Wyban et al., 1995; Spees et al., 2002), la ingesta y la digestión de nutrientes de los camarones (Croll y Watts, 2004). Al ser poiquiloterms, la temperatura corporal de los camarones varía según las fluctuaciones de temperatura del agua y a su vez puede afectar su desarrollo. Sin embargo, estudios previos sugieren que los camarones pueden adaptarse a los cambios ambientales por autorregulación en cierto grado, y es posible que los camarones de mayor tamaño puedan adaptarse a los cambios de temperatura sin afectar su crecimiento (Wyban, 1995; Zhu et al., 2019).

Wyban et al. (1995) encontraron diferencias significativas en el crecimiento de los camarones a 23°C, 27°C y 30°C en *P. vannamei* de talla pequeña (3.8 g) y mediana (10.8 g). No obstante, en camarones de talla grande (16.0 g) no encontraron diferencias

significativas de crecimiento entre 27°C y 30°C después de 21 días de exposición. Los autores sugirieron un mecanismo de adaptación fisiológica en camarones mayores de talla grande (16 g) cultivados a 27°C y 30°C, lo cual concuerda con los pesos finales obtenidos en este estudio.

El hepatopáncreas del camarón se conoce como una fuente de diferentes enzimas, especialmente proteasas (Sriket et al., 2012). Los resultados de este estudio determinó la existencia de un incremento en el peso del hepatopáncreas y el índice hepatosomático en los camarones cultivados a 27°C. A temperaturas menores el camarón blanco aumenta el tamaño de su hepatopáncreas probablemente como una respuesta a una temperatura que le resulta estresante, con el fin de compensar sus funciones digestivas.

Comoglio, et al. (2004) indicó una posible correlación positiva entre el tamaño del hepatopáncreas y la producción de proteasas en camarones blancos. En este estudio, al no encontrarse diferencias significativas en el peso final de los camarones se puede atribuir la mayor de APTE a 27°C, no por una mayor eficiencia enzimática, sino a una mayor cantidad de proteasas secretadas producto por del ligero incremento de tamaño del hepatopáncreas.

Aragón-Axomulco et al. (2012) determinaron el efecto de las variaciones de temperaturas causado por el cambio estacional y el ciclo de muda sobre la actividad de tripsina (enzima que representa entre el 40 y 60% de la actividad de la proteasa total en peneidos según Galgani et al., 1984) en el camarón *Farfantepenaeus duorarum*, así los camarones en intermuda mantenidos en temperatura de agua de 26.8°C presentaron

mayor actividad de tripsina (mU/mg de hepatopáncreas, temperatura de reacción: 30°C) en comparación con aquellos criados a temperaturas de 28.2°C y 30.7°C.

Por otra parte, Ocampo y Ezquerria (2002) cuantificaron el efecto de la temperatura de cultivo sobre la actividad de proteasa total específica (U/mg de proteína, temperatura de reacción: 25°C) del camarón *Farfantepenaeus californiensis* obteniendo mayor actividad en camarones cultivados a 23°C comparado con aquellos cultivados a 27°C. Además, una tercera temperatura de cultivo menor (19°C) obtuvo menor APTE con respecto a las demás (23°C y 27°C). Ocampo y Ezquerria (2002) atribuye esta respuesta a una posible compensación fisiológica digestiva de los camarones el cual estimula la producción de proteasas a temperaturas bajas (23°C). No obstante, este mecanismo puede fallar a una temperatura crítica o limitante, en este caso fue de 19°C. Estos resultados están de acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, el cual muestra una mayor APTE, por una mayor cantidad de proteasa secretada a 27°C comparado con 31°C.

Galgani (1985) obtuvo el extracto enzimático del hepatopáncreas de *Penaeus japonicus* cultivado a 29°C y 17°C y cuantificó la actividad de tripsina a diferentes temperaturas de reacción. Con una temperatura de reacción de 35°C los extractos enzimáticos de camarones cultivados a 29°C mostraron una actividad de tripsina (cantidad) significativamente menor comparado con camarones cultivados a 17°C evidenciando una menor cantidad de tripsina a esta temperatura (29°C). Sin embargo, en cuanto a la actividad de tripsina con una temperatura de reacción igual a la de cultivo (similar a metodología ASPTE), Galgani (1985) obtuvo mayor actividad de tripsina en extractos enzimáticos de camarones cultivados a 29°C comparado con 17°C. Estos

resultados están de acuerdo con los encontrados en el presente estudio el cual obtuvo mayor actividad simulada de proteasa específica (Temperatura de reacción igual a la del cultivo) a 31°C comparado con 27°C. Cabe mencionar que no solo la actividad de proteasa está inmiscuida la fisiología digestiva del camarón blanco, sino también la actividad de amilasas y otras similares (Van et al., 1999) las cuales no fueron cuantificadas en este estudio y si han mostrado mecanismos de adaptación con respecto a la composición de la dieta.

5. Conclusiones

Este estudio encontró que a una temperatura de cultivo de 27°C el camarón presenta una mayor actividad proteasa atribuida a una mayor cantidad de proteasas secretadas. Este hallazgo sugiere un posible mecanismo de adaptación digestiva para compensar la baja actividad enzimática de las proteasas a 27°C. Por otro lado, el camarón blanco secreta la suficiente cantidad de proteasas a 31°C debido a una mayor eficiencia enzimática a esta temperatura.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen a la empresa VITAPRO S.A. por financiar la totalidad del presente estudio, el cual está en línea con sus investigaciones.

7. Referencias

Aragón-Axomulco, H., Chiappa-Carrara, X., Soto, L., Cuzon, G., Arena, L., Maldonado, C., Gaxiola, G., 2012. Seasonal Variability in Trypsin and-Amylase Activities Caused by the Molting Cycle and Feeding Habits of Juvenile Pink Shrimp *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad, 1939). *Journal of Crustacean Biology*, 32(1), 89-99. <https://doi.org/10.1163/193724011X615361>

- Casillas-Hernández, R., Nolasco-Soria, H., Lares-Villa, F., García-Galano, T., Carrillo-Farnes, O., Vega-Villasante, F., 2006. Ritmo circadiano de la actividad enzimática digestiva del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y su efecto en el horario de alimentación. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 2(2), 55-64.
- Cohen T., Gertler A., Birk, Y. 1981. Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*)-I. Purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase B. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 69(3), 647-653.
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(81\)90364-3](https://doi.org/10.1016/0305-0491(81)90364-3)
- Comoglio, L., Gaxiola, G., Roque, A., Cuzon, G., Amin, O., 2004. The effect of starvation on refeeding, digestive enzyme activity, oxygen consumption and ammonia excretion in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Shellfish Research*, 23(1), 243-250.
- Croll S., Watts S. 2004. The Effect of temperature on feed consumption and nutrient absorption in *Procambarus clarkii* and *Procambarus zonangulu*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 35, 478–488. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2004.tb00113.x>
- Cuartas, E., Diaz, A., Petriella A., 2003. Modificaciones del hepatopáncreas del langostino *Pleoticus muelleri* (Crustacea: Penaeidae) por efecto de la salinidad. *Biociencias*, 11, 53-59.
- Cuartas, E., Díaz, A., Petriella, A., 2002. Estudio Morfológico E Histológico Del Hepatopáncreas Del Langostino *Pleoticus Muelleri* (Bate) (Crustacea, Penaeoidea). *Revista de Investigación Desarrollo. Pesquero.*, 15, 5-13.
- De Oliveira, C., J. R., Zhao, B., Malecha, S., Ako, H., Yang, J., 2006. Morphological and biochemical changes in the muscle of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molt cycle. *Aquaculture*, 261(2), 688-694.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.08.003>
- Díaz, F., Farfan, C., Sierra, E., Re, A. D., 2001. Effects of temperature and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation of juveniles of *Penaeus*

vannamei, Boone. Marine & Freshwater Behaviour & Physiology, 34(2), 93-104.
<https://doi.org/10.1080/10236240109379062>

FAO, 2019 a. Shrimp, FAO-Globefish. Disponible en:

<http://www.fao.org/3/ca5307en/ca5307en.pdf> Acceso 07.09.2020.

FAO, 2019 b. Producción mundial de acuicultura de peces, crustáceos, moluscos, etc., por especies principales en 2017. Disponible en:

http://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2017_USBcard/root/aquaculture/a6.pdf Acceso 07.09.2020.

Galgani, F. 1985. Regulation de l'activite des proteases digestives de *Penaeus japonicus* Bate en relation avec la temperature. Journal of experimental marine biology and ecology, 94(1-3), 11-18. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(85\)90047-4](https://doi.org/10.1016/0022-0981(85)90047-4)

Galgani, F. G.; Y. Benyamin y H. J. Ceccaldi, 1984. Identification of digestives proteinases of *Penaeus kerathurus* (Forsk.) a comparison with *Penaeus japonicus* bate. Comparative Biochemistry and Physiology. 78(B), 355-361.
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(84\)90043-9](https://doi.org/10.1016/0305-0491(84)90043-9)

Gamboa-delgado, J., Molina-poveda, C., Cahu, C., 2003. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. Aquaculture research, 34(15), 1403-1411.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2003.00959.x>

Gornall A. C., Bardawill C. J., David M. M., 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction, Journal of Biological Chemistry, 177(2), 751-766.
<https://doi.org/10.1159/000219790>

Hill, R. W., Wyse, G. A., Anderson, M., 2006. Fisiología animal. Ed. Médica Panamericana.

Lin, Y. C., Chen, J. C., 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. Journal of experimental marine biology and ecology, 259(1), 109-119. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00227-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00227-1)

- Staples, D., Heales, D., 1991. Temperature and salinity optima for growth and survival of juvenile banana prawn *Penaeus merguensis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 154, 251–274. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(91\)90168-V](https://doi.org/10.1016/0022-0981(91)90168-V)
- Tsai, I., Lu, P., Chuang, J., 1991. The midgut chymotrypsins of shrimps (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus penicillatus*). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1080(1), 59-67. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(91\)90112-D](https://doi.org/10.1016/0167-4838(91)90112-D)
- Van W., Le, G., Klein, B., & Sellos, D., 1999. Caracterización de las Tripsinas Y Amilasas De *Penaeus Vannamei* (Crustacea Decapoda): adaptación a la composición del régimen alimenticio. Iv. Enzimas Digestivas Y Estudios Sobre Digestibilidad Para Organismos Acuáticos, 3, 233.
- Walker, S., Neill, W., Lawrence, A., Gatlin, D., 2011. Effects of temperature and starvation on ecophysiological performance of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 319(3-4), 439-445.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.07.015>
- Wyban, J., Walsh, W., Godin, D., 1995. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 138(1-4), 267-279. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)00032-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)00032-1)
- Zhu, T., Morais, S., Luo, J., Jin, M., Lu, Y., Le, Y., Zhou, Q., 2019. Functional palatability enhancer improved growth, intestinal morphology, and hepatopancreas protease activity, replacing squid paste in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, diets. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50(6), 1064-1077.
<https://doi.org/10.1111/jwas.12615>