

## Digestibilidad *in vitro* de carbohidratos en la langosta espinosa *Panulirus argus* (Latreille, 1804)

Antonio Casuso<sup>1</sup> , Leandro Rodríguez-Viera<sup>1</sup>, Erick Perera<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana, calle 16, No. 114 e/ 1ra y 3ra, Miramar, La Habana, CP. 11300, Cuba.

### RESUMEN

El conocimiento de las capacidades digestivas de determinada especie es un aspecto clave para el establecimiento de dietas y estrategias de alimentación en cautiverio. Los carbohidratos son un macronutriente importante en la dieta y además, desde el punto de vista acuícola, son una fuente de energía barata. Sin embargo, existe un desconocimiento total de la digestión de carbohidratos en la langosta espinosa *Panulirus argus*. En el presente trabajo se evaluó la digestión *in vitro* de diferentes fuentes de carbohidratos por las enzimas digestivas de *P. argus*. El almidón de arroz y los almidones gelatinizados de papa y de maíz fueron los sustratos que presentaron mayores tasas de hidrólisis entre todas las fuentes probadas, seguidos por la harina de arroz, la harina de trigo, el almidón de papa, la harina de maíz, el glucógeno y el almidón de maíz. Los sustratos que mostraron las menores tasas de hidrólisis fueron el alginato, la agarosa, el agar y la carboximetil celulosa. El presente trabajo proporciona las primeras informaciones sobre la digestibilidad de carbohidratos en *P. argus*.

**Palabras clave:** amilasas, digestión de carbohidratos, digestión *in vitro*, langosta espinosa, *Panulirus argus*.

### ABSTRACT

The knowledge of the digestive capabilities of a particular species is a key step in the establishment of diets and feeding strategies in captivity. Carbohydrates are important macronutrients in the diet and also, from the aquaculture perspective, they represent a cheap source of energy. However, there is a lack of information concerning the digestion of carbohydrates in the spiny lobster *Panulirus argus*. In this study we evaluated the *in vitro* digestion of different carbohydrate sources by the digestive enzymes of *P. argus*. Rice starch, and gelatinised potato and corn starches were the substrates with higher rates of hydrolysis among all the tested sources, followed by rice flour, wheat flour, potato starch, corn flour, glycogen and corn starch. Substrates showing the lowest rates of hydrolysis were alginate, agarose, agar and carboxymethyl cellulose. This paper provides the first information on the digestibility of carbohydrates in *P. argus*.

**Key words:** amylases; carbohydrates digestion; *in vitro* digestion; spiny lobster; *Panulirus argus*.

## 1. INTRODUCCIÓN

La familia Palinuridae incluye a las langostas espinosas, las cuales son explotadas comercialmente en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo por su alto valor comercial. La especie *Panulirus argus* (Latreille, 1804) es la de más amplia distribución: desde Carolina del Norte (E.U.) hasta Brasil, incluyendo las Bahamas, México, las islas del Caribe y Bermudas (Ingle *et al.*, 1963, citado por Lellis, 1991). En Cuba, *P. argus* se distribuye a todo lo largo de la plataforma insular y constituye el principal recurso pesquero del país. Actualmente la mayoría de las pesquerías de langostas espinosas están plenamente explotadas o sobreexplotadas, mostrando estabilidad o disminución de las capturas, respectivamente, mientras que las mismas continúan teniendo un alto valor en el mercado internacional. Esta situación ha

provocado un incremento en el interés en la acuicultura de estos crustáceos durante las últimas décadas, como vía para incrementar o mantener los actuales niveles de producción. Existe, además, un mercado para las langostas de talla pequeña el cual no puede ser satisfecho por las pesquerías comerciales, las cuales tienen establecida por lo general una talla mínima legal.

Aunque recientemente la larvicultura de langostas ha mostrado resultados alentadores (Barnard *et al.*, 2011; Goldstein y Nelson, 2011), en la actualidad el mayor interés está en la engorda o cría de postlarvas capturadas en el medio natural. Se ha demostrado que la disponibilidad de postlarvas (semillas) en el medio natural es elevada (Cruz *et al.*, 2006), que la mortalidad en la fase postlarva es muy

alta (98 %) (Phillips *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2006) y que por tanto, la extracción de postlarvas del medio con fines acuícolas tendría un mínimo impacto sobre las pesquerías (Phillips *et al.*, 2003). Aunque esta actividad se ha desarrollado en varios países (Filipinas, Indonesia, India, Tailandia, China, Taiwán, Malasia, Tahití, Singapur, Australia y Nueva Zelanda) (Jeffs y Hooker, 2000; Jeffs y Davis, 2002), es en Vietnam donde se ha logrado el mayor éxito. La engorda en jaulas de la langosta espinosa *Panulirus ornatus* en Vietnam representó aproximadamente 40 millones de USD en el 2004 (Thuy y Ngoc, 2004) y 100 millones de USD en el 2006 (Jones y Williams, 2007).

Sin embargo, como es de esperar de una tecnología en desarrollo, la engorda de langostas espinosas en cautiverio no está libre de dificultades. Las prácticas actuales de alimentación basadas en desechos de la industria del pescado están provocando serios problemas de contaminación en áreas con gran densidad de jaulas. Esto ha incentivado el desarrollo de investigaciones sobre la alimentación en cautiverio en varios países como Australia, Nueva Zelanda, Japón, Vietnam, India, Sudáfrica, EEUU, Puerto Rico y Belice (Williams, 2007). Aunque se han obtenido avances notables en la alimentación artificial de algunas especies, todavía no existen piensos utilizados a nivel comercial. La ausencia de dietas formuladas (piensos) se considera el principal impedimento para el desarrollo sostenible de esta actividad tanto en las regiones donde ya se ha desarrollado significativamente (Asia-Pacífico), como en regiones con gran potencial como el Caribe. Cuba presenta condiciones apropiadas para la engorda de *P. argus* por la gran disponibilidad de semilla en algunas zonas (Cruz *et al.*, 2006), temperaturas elevadas durante prácticamente todo el año, y por presentar *P. argus* una de las mayores tasas de crecimiento respecto al resto de las langostas espinosas (Jeffs y Davis, 2002).

Varios investigadores han evaluado los requerimientos nutricionales de algunas especies de langostas espinosas (Glencross *et al.*, 2001; Crear *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003; 2005; Ward *et al.*, 2003b; Johnston *et al.*, 2003), aunque las tasas de crecimiento con el uso de dietas formuladas todavía son bajas para la mayoría de las especies, incluso cuando las langostas son alimentadas con piensos muy similares, en composición, a las presas naturales (Simon y Jeffs, 2008). Se reconoce hoy que parte de estos problemas se deben al desconocimiento de la fisiología digestiva de estos crustáceos.

El conocimiento de los mecanismos mediante los cuales se logra el eficiente aprovechamiento de un alimento es un aspecto importante para el establecimiento de dietas fisiológicamente adecuadas. En este sentido, en Cuba se han obtenido resultados en la especie *P. argus* respecto a la digestión de proteínas, y hoy se conocen las fuentes de proteínas más

digestibles, los aspectos que se deben mejorar para incrementar la digestibilidad de proteínas, la contribución de las tripsinas digestivas a la digestión de proteínas, así como los principales aspectos relacionados con la regulación de la actividad de estas proteasas (Perera *et al.*, 2008 a y b; 2010 a y b; 2012 a y b). Estos estudios se enmarcan en el esfuerzo internacional por optimizar la digestión de proteínas en diferentes especies de langostas espinosas (Glencross *et al.*, 2001; Crear *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003; 2005; Ward *et al.*, 2003b; Johnston *et al.*, 2003). Sin embargo, la digestión de carbohidratos ha sido muy poco estudiada en langostas espinosas en general. Sólo se cuentan hoy con estudios en la langosta de aguas templadas *Jasus edwardsii* (Radford *et al.*, 2007; Simon, 2009 a, b, c), mientras que no existe información para sus homólogas las langostas tropicales, incluyendo *P. argus*. El deficiente conocimiento de la digestión de carbohidratos en langostas espinosas contrasta con la importancia de los carbohidratos como macro-nutrientes de la dieta. Además, desde el punto de vista económico es de vital importancia optimizar el uso de los carbohidratos de la dieta, debido a que constituyen una fuente barata de energía.

Justamente, el desconocimiento de la digestión de carbohidratos en la langosta *P. argus* motiva la realización del presente trabajo, enfocado en la digestión enzimática como paso esencial del proceso digestivo. En este sentido, existe escaso conocimiento de la relación entre la alta actividad amilasa y el poco uso de los carbohidratos de la dieta, sobre todo en crustáceos carnívoros. Por razones prácticas, se incluyeron en el estudio las fuentes de carbohidrato más utilizadas en alimentos acuícolas, o con potencial para su uso en los mismos.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Colecta de animales y muestras

Para los estudios de digestión *in vitro* de carbohidratos se colectaron 126 ejemplares de la langosta *Panulirus argus* en el golfo de Batabanó, en la plataforma sur-occidental de Cuba. Los animales fueron anestesiados en hielo durante 10 min antes de la extracción de la glándula digestiva o hepatopáncreas (HP). Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para su traslado al Centro de Investigaciones Marinas de la Universidad de la Habana. Posteriormente, las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

### 2.2 Preparación de los extractos enzimáticos de hepatopáncreas (HP)

Los extractos enzimáticos se obtuvieron mediante la homogenización de los hepatopáncreas congelados

en agua destilada (0,09g en 500mL) y se centrifugaron a 4 °C, 10 000 x g durante 15 min. Los sobrenadantes fueron utilizados inmediatamente en los análisis.

### 2.3 Actividad amilasa en los extractos de HP

La actividad alfa-amilasa se determinó usando el Kit HELFA® Amilase Assay de Quimefa Inc. Habana, Cuba (Cat No. A22189). Se incubaron 3 µL de extracto enzimático con 200 µL de sustrato CNP-G<sub>3</sub> (2-cloro-4-nitrofenil-α-maltotriosido), suministrado en el Kit, a 37 °C por un minuto. La actividad fue medida calculando la liberación del cromóforo a 405 nm según las instrucciones del fabricante. La actividad enzimática de la α-amilasa en la muestra (U/L) se definió como ΔDO/min x 4640, donde ΔDO/min es la variación de la absorbancia de la muestra por minuto y 4640 es el factor de actividad enzimática empleado en el kit.

### 2.4. Fuentes de carbohidratos estudiadas

Las 13 diferentes fuentes de carbohidratos utilizados en los experimentos se muestran en la Tabla 1.

### 2.5. Digestión *in vitro* de carbohidratos en tubos Eppendorf

Los carbohidratos estudiados (300 mg) fueron homogenizados en 5 mL de agua Milli-Q® (20°C) para obtener soluciones/suspensiones al 6 % (p/v) que se utilizaron como sustratos en las digestiones. Los almidones nativos forman suspensiones que tienen que ser bien mezcladas antes de usarse, dada su pobre solubilidad en agua (Cousin *et al.*, 1996). Los almidones gelatinizados, el agar, el alginato y la carboximetil celulosa forman geles débiles a estas concentraciones pero no en la mezcla final de ensayo (Simon 2009a).

Los ensayos *in vitro* en tubos Eppendorf fueron realizados utilizando el método descrito por Cousin *et al.* (1996) y modificado por Simon (2009a). Los sustratos (250 µL de la solución al 6 % p/v) y los extractos enzimáticos (0,2 U de actividad amilasa total) fueron mezclados y diluidos hasta 1 mL con tampón citrato-fosfato (100 mM, pH 5,0) en tubos Eppendorf de 2 ml. El pH seleccionado para los ensayos se corresponde con el encontrado en el jugo gástrico de *P. argus* (Perera *et al.*, 2008a) y otras langostas espinosas (Jonnston, 2003), y con el pH óptimo de las amilasas de estos crustáceos (Perera *et al.*, 2008a). Los tubos se agitaron horizontalmente a 26 °C durante 1h. Previamente, se determinó que la linealidad de la reacción con los diferentes sustratos se mantiene por 2h, por lo que se fijó la mitad de este tiempo (1h) como tiempo final en este trabajo.

Transcurrida 1h de digestión, se tomaron 20 µL y se guardaron a -20 °C hasta la determinación de la glucosa libre. Para cada fuente de carbohidrato, se incluyó un control negativo que consistió en ensayos sin extracto enzimático. También se determinó la cantidad de glucosa presente en el extracto enzimático. La cantidad de glucosa liberada tanto del sustrato como del extracto enzimático se restó a la cantidad de glucosa liberada después de la digestión. La glucosa se determinó utilizando el Kit RapiGluco-Test HELFA® de Quimefa Inc. (ver 2.5.1).

La tasa de hidrólisis (TH) de cada sustrato se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$TH \text{ (nmol glucosa min)} = ([\text{glucosa}]_F - [\text{glucosa}]_0) / t$$

Donde: [glucosa]<sub>F</sub> es la concentración final de glucosa después de la incubación con el extracto enzimático, [glucosa]<sub>0</sub> es la concentración de glucosa inicial presente en el sustrato y en el extracto enzimático, y t es el tiempo de incubación.

La expresión anterior resultó de una modificación introducida a la fórmula utilizada por Simon (2009a) en un experimento similar en otra langosta espinosa. El autor homogenizó sus determinaciones dividiendo por la concentración de proteína soluble en los extractos, independientemente de la actividad amilasa de los mismos. Teniendo en cuenta los objetivos propuestos en este trabajo, se consideró más apropiado homogenizar la actividad amilasa total de los extractos (mediante dilución) antes de su uso en las digestiones *in vitro*, independientemente de la concentración de proteínas. El objetivo de este proceder es que, al enfrentar cada sustrato a las mismas unidades de actividad amilasa total, las diferencias observadas en la digestión *in vitro* se deben a la acción diferencial de los extractos de HP sobre los carbohidratos estudiados.

#### 2.5.1. Determinación de glucosa libre

En los ensayos *in vitro* se requirió cuantificar la glucosa liberada luego de la digestión de diferentes carbohidratos. En todos los casos, la glucosa libre se determinó por el Kit RapiGluco-Test HELFA® de productos Biológicos Quimefa Inc. (Habana, Cuba, Cat No. D080033) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se tomaron 20 µL de cada muestra y se le agregaron 200 µL de reactivo (por duplicado). Se leyó la absorbancia a 540 nm pasados 5 min, en un lector de microplacas ELx808 IU, BioTek empleando agua como blanco. La concentración de glucosa (mmol/L) en la muestra se determinó como DO<sub>m</sub> x C<sub>r</sub>/DO<sub>r</sub> donde DO<sub>m</sub> es la absorbancia de la muestra, C<sub>r</sub> es la concentración de la glucosa de referencia (mmol/L) suministrada en el kit y DO<sub>r</sub> la absorbancia de la referencia.

#### 2.5.2. Determinación de azúcares reductores totales

Tabla 1. Carbohidratos utilizados como sustratos en las digestiones *in vitro* y procedencia.

| Carbohidratos                        | Fuente   |
|--------------------------------------|--|
| Agar                                 | UNI-CHEM, Agar powder bacteriological, Cat. No. A12580-2J                  |
| Agarosa                              | SERVA, Agarose low gel strength, cat. No. 11403. Feinbiochemica GmbH & Co. |
| Alginato                             | Aldrich-Chemie, Alginsaeure Natriumsalz, cat. No. D-7924, West- Germany    |
| Carboximetil celulosa (CMC)          | Fluka AG, Cat. No. 21890   |
| Glucógeno                            | Sigma-Aldrich, Inc., Cat. No. G1767  |
| Almidon de maíz natural <sup>a</sup> | Indias, G.R. Baldinelli, Argentina   |
| Almidon de papa natural <sup>a</sup> | Panreac, Cat. No. 171096   |
| Almidon de arroz natural             | BDH, Starch rice, Cat. No. 30263, BDH Limited Poole England                |
| Harina de maíz                       | Yellow Corn Meal, Iberia Foods Corp. , Brooklyn, NY                        |
| Harina de arroz                      | Mercado nacional, Cuba.  |
| Harina de trigo                      | Mercado nacional, Cuba.  |

<sup>a</sup> Carbohidratos que también se evaluaron después de ser gelatinizados a 80 °C por 20 min (100 g l<sup>-1</sup> agua desionizada) secados a 50°C por 48 h (Simon, 2009a).

Debido a que la glucosa libre no es el único producto de la digestión de carbohidratos, se realizaron determinaciones de azúcares reductores totales luego de las digestiones *in vitro*. Los azúcares reductores totales se midieron según el método de Somogyi-Nelson descrito por Robyt y Whelan (1968). Brevemente, se tomaron 300 µL de muestra resultante de la digestión y se le añadieron 300 µL del reactivo 4 (ver abajo) recién preparado. La mezcla se mantuvo por 20 min en baño María a 100 °C. Después de enfriar, se adicionaron 300 uL del reactivo 3 (ver abajo), se agitó en vortex para eliminar el CO<sub>2</sub>, se añadieron 3,35 mL de agua destilada y se agitaron los tubos suavemente. Finalmente se leyó absorbancia a 600 nm en un lector ELx808 IU, BioTek. La concentración final se determinó utilizando una curva patrón de maltosa. Los mg de maltosa liberada determinados mediante este método se utilizaron para calcular las tasas de hidrólisis como mg de equivalentes de maltosa producidos por minuto para su comparación con las tasas de hidrólisis calculadas utilizando los mg de glucosa liberada.

#### Reactivos empleados en el método de Somogyi-Nelson:

Reactivo 1: 25g carbonato de sódico anhidro, 25g de tartrato sódico potásico, 20g de bicarbonato de sódico, 200g de sulfato sódico anhidro, H<sub>2</sub>O para un volumen final de 1L.

Reactivo 2: 30g de sulfato de cobre pentahidratado, 200mL de H<sub>2</sub>O destilada, 4 gotas de ácido sulfúrico 100 %.

Reactivo 3: 25g molibdato de amonio en 450mL H<sub>2</sub>O destilada, 21mL de ácido sulfúrico 100 %. Preparar separado 3g de arsenato sódico heptahidratado en 25 mL de H<sub>2</sub>O, se añade lentamente a la solución anterior. Se lleva a un volumen final de 500 mL y se calienta a 37 °C.

Reactivo 4: 1 mL de reactivo 2 en 25 mL del reactivo 1.

#### 2.5.3. Determinación de la correlación entre los métodos Somogyi-Nelson y el RapiGlu-Test

Se realizaron digestiones con diferentes sustratos (almidón de arroz, almidón hidrolizado de maíz, almidón de papa, harina de trigo, harina de maíz y CMC) en tubos (ver 2.5) con el fin de comprobar la correlación entre el método Somogyi-Nelson y el RapiGlu-



Test para la determinación de la tasa de hidrólisis. La determinación de los azúcares reductores totales y glucosa libre se cuantificó según los métodos antes descritos (ver 2.5.1 y 2.5.2).

## 2.6 Análisis estadístico

A los valores de tasa *in vitro* de hidrólisis en tubos Eppendorf se les comprobó la normalidad y homogeneidad de varianza usando las prueba Kolmogorof-Smirnov y Levene, con  $p \leq 0,05$ . Los datos se analizaron mediante un ANOVA ( $p \leq 0,05$ ) de una vía. Se analizaron 30 individuos (réplicas) para cada fuente de carbohidrato (13 tratamientos), para un total de 390 digestiones. Para determinar las diferencias entre las medias se utilizó el test de comparación de medias Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para los análisis estadísticos se utilizaron los paquetes Statistica 8.0 Soft, Inc. y StatGraphics Plus 5.1. Las figuras se generaron mediante GraphPad Prism 5.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Correlación entre los métodos Somogy-Nelson y el RapiGluco-Test

Luego de realizar digestiones preliminares de varias fuentes de carbohidratos, se cuantificó la glucosa liberada y los azúcares totales con la finalidad de comprobar que la determinación de glucosa libre (método más sencillo) es un indicador confiable de la velocidad de digestión. Se obtuvo una correlación positiva entre el método de determinación de azúcares reductores (Somogy-Nelson) y el método utilizado para la determinación de glucosa libre (RapiGluco-Test) con una  $R^2$  de 0,95 (Figura 1), excluyendo el almidón de arroz del análisis. Para el almidón de arroz, se observaron valores mayores de glucosa liberada que los esperados por la correlación descrita anteriormente entre ambos métodos (Figura 1).

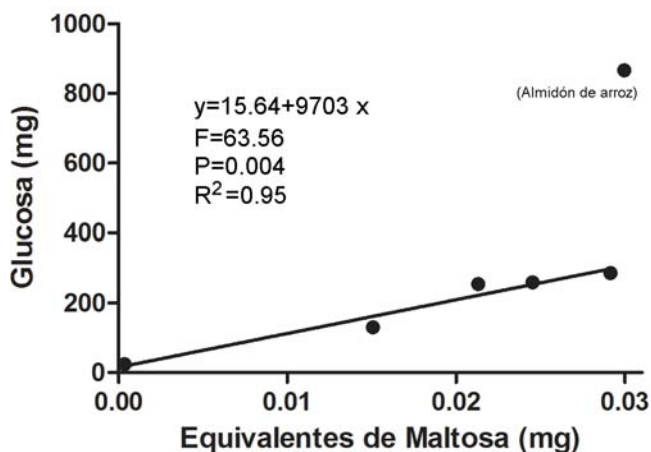


Figura 1. Correlación entre los métodos Somogy-Nelson y el RapiGluco-Test. Las fuentes usadas fueron CMC, harina de maíz, harina de trigo, almidón de papa, almidón de maíz y almidón de arroz.

Teniendo en cuenta estos resultados, en lo adelante se utilizó la cuantificación de glucosa libre como producto de la digestión de carbohidratos, para comparar la digestión *in vitro* de las fuentes de carbohidratos estudiadas.

### 3.2. Hidrólisis *in vitro* de carbohidratos en tubos Eppendorf

Previamente se comprobó la linealidad de la liberación de glucosa hasta 120 min de digestión (Figura 2), por lo que se utilizaron los valores a los 60 min para la comparación de las tasas de hidrólisis. En los ensayos *in vitro* realizados en tubos para los diferentes sustratos se cuantificó la glucosa liberada como indicador de la tasa de hidrólisis (Tabla 2).

Se obtuvieron diferencias altamente significativas en la tasa de hidrólisis entre los sustratos empleados (ANOVA,  $F = 67,25$   $P \leq 0,0001$ ) (Tabla 2). El almidón de arroz ( $80,60 \pm 28,86$  nmol glucosa  $\text{min}^{-1}$ ), el almidón de papa gelatinizado ( $70,5 \pm 16,63$ ) y el almidón de maíz gelatinizado ( $67,0 \pm 15,26$ ) fueron los sustratos que presentaron mayores tasas de hidrólisis de entre todas las fuentes probadas (Tabla 2). Aunque menores, también se obtuvieron tasas de hidrólisis altas con la harina de arroz ( $54,1 \pm 14,90$ ), la harina de trigo ( $42,6 \pm 11,45$ ), el almidón de papa ( $41,6 \pm 18,15$ ), la harina de maíz ( $32,5 \pm 10,51$ ), el glucógeno ( $30,9 \pm 9,91$ ) y el almidón de maíz ( $23,2 \pm 7,42$ ) (Tabla 2). Los sustratos que mostraron las menores tasas de hidrólisis fueron la CMC ( $12,3 \pm 6,22$ ), el alginato ( $3,3 \pm 2,90$ ), la agarosa ( $3,2 \pm 1,27$ ) y el agar ( $7,4 \pm 4,09$ ) (Tabla 2).

## 4. DISCUSIÓN

Se han desarrollado varios métodos *in vitro* como alternativas a los costosos y demorados ensayos de digestibilidad *in vivo*. Estos ensayos brindan una valiosa aproximación a los procesos de digestión *in vivo* (Tester *et al.*, 2006). Además, por ser más sencillos y rápidos, pueden ser utilizados para analizar un número grande de materias primas, lo cual es conveniente en estudios iniciales en especies sobre las cuales no hay información previa. Este es el caso de la langosta espinosa *Panulirus argus* y por esta razón, en este trabajo se utilizaron métodos *in vitro* de digestibilidad como primera aproximación a digestión de carbohidratos en la especie. A partir de los resultados obtenidos se pueden diseñar estudios futuros de digestibilidad *in vivo* de carbohidratos, con las fuentes de más potencial para su uso en dietas formuladas para *P. argus*.

El proceso de digestión del almidón por las  $\alpha$ -amilasas es complejo. Existen muchos factores que contribuyen a la resistencia a la hidrólisis de los gránulos de almidón como la relación amilosa/

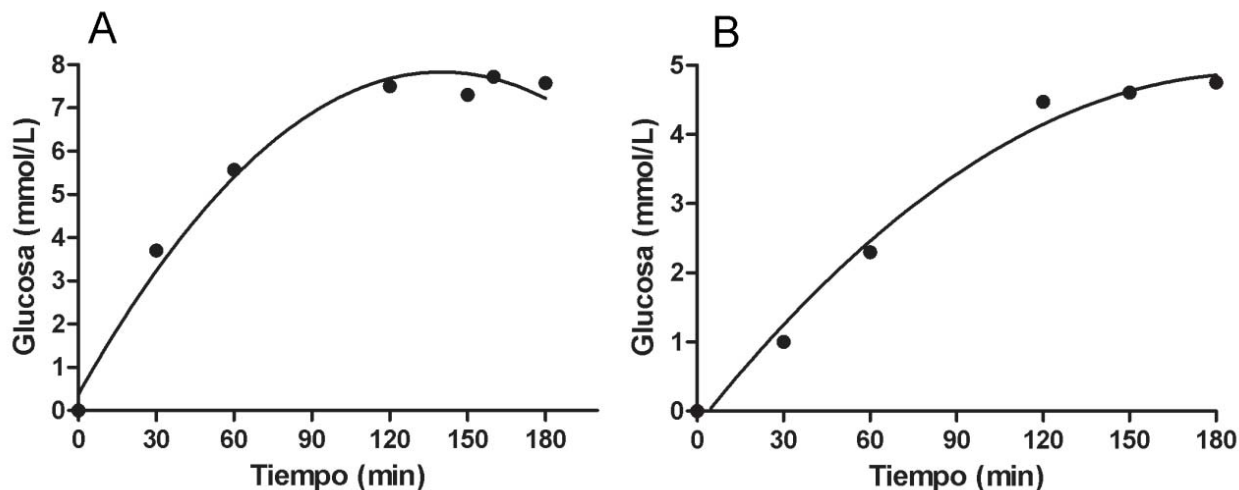


Figura 2. Glucosa liberada (mmol/L) en la digestión in vitro con extracto enzimático de *Panulirus argus*. Panel A: Almidón de arroz., Panel B: Harina de trigo.

Tabla 2. Tasa de hidrólisis in vitro (HR) de diferentes fuentes de carbohidratos por los extractos crudos del hepatopáncreas de la langosta espinosa *Panulirus argus*. Diferencias estadísticas entre las tasas de hidrólisis de las diferentes fuentes de carbohidratos se indican con las letras exponenciales. (p<0.0001).

| Fuente de Carbohidrato          | Media HR ± D.S. nmol glucose min <sup>-1</sup> (n=30) | Media HR ± D.S. (Simon, 2009) ** |
|---------------------------------|---|----------------------------------|
| Almidón de Arroz                | 80,60 ± 28,86 a                                       |                                  |
| Almidón de Gelatinizado de Papa | 70,5 ± 16,63 a  | 32,92±1,75                       |
| Almidón de Gelatinizado de Maíz | 67,0 ± 15,26 ab                                       |                                  |
| Harina de Arroz                 | 54,12 ± 14,90 bc                                      |                                  |
| Harina de Trigo                 | 42,56 ± 11,45 cd                                      |                                  |
| Almidón de Papa                 | 41,58 ± 18,15 cd                                      | 2,01±1,27                        |
| Harina de Maíz                  | 32,52 ± 10,51 de                                      |                                  |
| Glucógeno                       | 30,91 ± 9,91 de                                       | 27,27±1,52                       |
| Almidón de Maíz                 | 23,23 ± 7,42 ef                                       | 5,41±2,21                        |
| Carboximetil celulosa           | 12,32 ± 6,22 g  | 29,20±0,88                       |
| Agar                            | 7,36 ± 4,09 eh  | 2,92±1,00                        |
| Alginato                        | 3,27 ± 2,90 h   | 4,08±2,16                        |
| Agarosa                         | 3,25 ± 1,27 h   |                                  |

\*\* Valores corregidos, expresados en nmol glucosa min<sup>-1</sup> mg de proteína soluble

amilopectina, el tamaño y la forma del granulo, los complejos amilosa-lípidos y las proteínas en la superficie del gránulo (Svihus *et al.*, 2005). Por tanto, al interpretar los resultados de digestibilidad de carbohidratos, se deben considerar los factores que más inciden en la cinética de asociación del almidón y las amilasas.

El almidón en su forma nativa se encuentra formado por dos constituyentes, la α-amilosa y la amilopectina. La α-amilosa está constituida por cadenas largas no ramificadas de D-glucosa que se hallan unidas mediante enlaces α1-4, las cadenas son

polidispersas y varían en peso molecular, no son verdaderamente solubles en el agua pero forman micelas hidratadas que le confieren un enrollamiento helicoidal (Tester y Debon, 2000). Por su parte, la amilopectina está muy ramificada, la longitud media de las ramificaciones es de 24 a 30 residuos de glucosa. Los enlaces glicosídicos son α1-4, pero en los puntos de ramificación son enlaces α1-6 (Lehninger, 2000). La relación de amilosa/amilopectina varía de acuerdo al origen botánico (Buléon *et al.*, 1998). Estas macromoléculas se depositan en los gránulos de almidón en capas sucesivas, formando anillos de

crecimiento que incluyen áreas amorfas intercaladas, con áreas más densas compuestas por lamelas alternas de material cristalino y amorfo. Por tanto el almidón tiene una estructura semi-cristalina con diferentes niveles de cristalinidad. El empaquetamiento de amilosa y amilopectina en los gránulos depende también del origen botánico (Campanha y Franco, 2011).

En la mayoría de los tipos más comunes de endospermos de almidón, el porcentaje de peso relativo de amilosa y amilopectina es de 72-82 % de amilopectina y 18-33 % de amilosa (Buléon *et al.*, 1998). Generalmente la susceptibilidad de los gránulos de almidón a la hidrólisis con  $\alpha$ -amilasa parece variar en relación con su contenido de amilosa (Berry, 1986; Svihus *et al.*, 2005). Altos niveles de amilosa parece dificultar la digestibilidad del gránulo, posiblemente dado el denso empaquetamiento de la estructura helicoidal (Englyst y Cummings, 1985) y a una formación de complejos amilosa-lípidos (Crowe *et al.*, 2000; Tufvesson *et al.*, 2001; Svihus *et al.*, 2005). La hidrólisis también puede verse afectada por el tamaño del gránulo en términos de área de superficie disponible para la acción enzimática tanto *in vivo* como *in vitro* (Franco *et al.*, 1992; Kong *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2007).

En los ensayos de digestión *in vitro* en tubos Eppendorf se observaron diferencias entre las diferentes fuentes de carbohidratos (Tabla 2). Los que presentaron mayores tasas de hidrólisis son exclusivamente almidones y harinas cuyo principal componente es el almidón. Este resultado era esperado, ya que la constitución química y estructural del almidón es idónea para la digestión por las  $\alpha$ -amilasas.

El almidón nativo de arroz fue el que presentó una mayor tasa de hidrólisis entre todos los sustratos evaluados. Con la harina de arroz, cuyo componente mayoritario es el almidón de arroz, se obtuvieron tasas mayores que para el resto de los almidones nativos evaluados (Tabla 2). Esto concuerda con los resultados encontrados por Manelius y Bertoft (1996) y Bednar *et al.* (2001) quienes observaron que cereales con gránulos pequeños como el arroz tienen mayores tasas de digestibilidad que los almidones que poseen gránulos más grandes como el maíz, el trigo y la papa (Tabla 3).

Seguido del almidón de arroz, los almidones gelatinizados de papa y maíz presentaron las mayores tasas de hidrólisis (Tabla 2). La gelatinización es un término utilizado para describir los eventos moleculares asociados con el calentamiento de almidones en presencia de agua (Tester *et al.*, 2006). Este proceso involucra un incremento de la movilidad molecular de las regiones amorfas del gránulo de almidón y la desestabilización de las dobles hélices de amilosa mediante el aumento de temperatura, causando una transición molecular irreversible y transformando el

material cristalino en amorfo (Campanha y Franco, 2011). Nuestros resultados son consistentes con los obtenidos en la langosta espinosa *J. edwardsii*, donde se encontró que la gelatinización incrementa la digestibilidad tanto *in vitro* como *in vivo* (Simon, 2009 a y b). Otros autores sugieren que cuando los gránulos de almidón son sometidos a tratamientos con calor aumenta la susceptibilidad de los mismos a la hidrólisis (Davis y Arnold, 1993; Glass y Stark, 1995; Cousin *et al.*, 1996).

En estudios nutricionales en peces (Stone, 2003) y en crustáceos como la langosta *Homarus gammarus* (Glass y Stark, 1995), el camarón *Litopenaeus vannamei* (Davis y Arnold, 1993; Cousin *et al.*, 1996) y la langosta espinosa *Jasus edwardsii* (Simon, 2009a), se observó que el almidón nativo de trigo presenta alta tasa de hidrólisis comparado con otras fuentes de carbohidrato. También se reportó una alta tasa de digestibilidad aparente de materia seca (82,3 %) en langostas *Panulirus ornatus* alimentadas con dietas con harina de trigo (Irvin y Williams, 2007) la cual ha sido utilizada en varias dietas experimentales para esta especie (Williams, 2007). Estos resultados coinciden con los obtenidos en este trabajo donde la harina de trigo mostró una alta tasa de digestión *in vitro* (Tabla 2). Se conoce que la alta digestibilidad del trigo, se debe al alto contenido de amilopectina ( $\approx$  80 %) presente en su forma nativa, en comparación con otras fuentes vegetales (Cruz-Suarez *et al.*, 1994; Cuzon *et al.*, 2000).

El almidón de maíz resultó significativamente menos digestible que el resto de los almidones estudiados. Esta menor digestión del maíz en comparación con los demás almidones, puede estar dada por la forma poliédrica alargada que adopta este gránulo de almidón, disminuyendo el área superficial de contacto con las enzimas (Tabla 3).

Kong *et al.* (2003) mostraron en cerdos que los gránulos de almidón de maíz de pequeño tamaño fueron más susceptibles a la digestión por  $\alpha$ -amilasa que los gránulos de almidón de papa de mayor tamaño. Esto no concuerda con los resultados de este trabajo, donde el almidón de papa fue más susceptible a la digestión por las enzimas digestivas de *P. argus* que el almidón de maíz. En otros crustáceos, el almidón nativo de maíz tampoco es de las fuentes de mayor digestibilidad (Capuzzo y Lancaster, 1979; Bordner *et al.*, 1983; Koshio *et al.*, 1992; Simon, 2009a). Una posible explicación puede estar en que sobre la eficiencia de hidrólisis de los almidones influyen diferentes factores y no sólo el tamaño del gránulo (Crowe *et al.*, 2000; Tufvesson *et al.*, 2001; Morita *et al.*, 2007), entre ellos la asociación entre el tamaño del gránulo, la forma del mismo y el contenido de amilosa (Tabla 3). Si bien el almidón de maíz posee gránulos más pequeños, a su vez presenta un mayor contenido de amilosa y forma poliédrica (Buléon *et al.*, 1998).

Tabla 3. Características del gránulo de almidón de diferentes fuentes vegetales.

| Sustratos               | Tamaño (µm)                           | Amilosa (% total del gránulo) | Forma                                | Área superficial (µm <sup>2</sup> ) |
|-------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Almidón nativo de arroz | 3 a 8 <sup>1</sup>                    | -                             | Poliédrica <sup>3</sup>              | 28,3–201 <sup>3</sup>               |
| Almidón nativo de maíz  | 12,2 <sup>2</sup> a 30 <sup>1,3</sup> | 25 a 28 <sup>3</sup>          | Poliédrica y redondeada <sup>3</sup> | 12,6–2827 <sup>3</sup>              |
| Almidón nativo de papa  | 5 a 100 <sup>1</sup>                  | 18 a 21 <sup>3</sup>          | Ovalada grande <sup>3</sup>          | 78,5–31416 <sup>3</sup>             |
| Almidón de trigo        | 15 a 35 <sup>1</sup>                  | 25 a 29 <sup>3</sup>          | Disco <sup>3</sup>                   | 707–3849 <sup>3</sup>               |

1. Tester *et al.*, 2006; 2. Mishra y Rai, 2006; 3. Buléon *et al.*, 1998.

Sin embargo, los valores de tasa de hidrólisis *in vitro* obtenidos tanto para la harina de maíz como para el almidón de maíz en *P. argus* son similares a los obtenidos para el glucógeno (principal fuente de carbohidratos presente en las presas naturales). Mientras que las tasas de hidrólisis *in vitro* del glucógeno son similares en *J. edwardsii* (Simon, 2009a) y *P. argus* (este trabajo), la langosta *P. argus* parece digerir mejor el almidón de maíz que su contraparte de aguas templadas, por lo que el uso de esta fuente de carbohidrato (o la harina de maíz) debiera evaluarse en dietas formuladas para *P. argus*. Un análisis similar con la harina de trigo y almidón de papa conllevaría a sugerir igualmente su evaluación, debido a no diferir significativamente del glucógeno en cuanto a su digestibilidad *in vitro*. Las langostas espinosas crecen significativamente más con mejillón fresco, con hasta un 30 % de glucógeno (Simon, 2009c), en comparación con dietas formuladas (Crear *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2003a; Simon y Jeffs, 2008). Por esta razón, Simon (2009a) sugiere que las fuentes de carbohidrato con digestibilidades *in vitro* y respuestas glicémicas posingestión similares al glucógeno, pudieran ser más apropiadas para langostas espinosas que carbohidratos de alta digestibilidad que provocan respuestas glicémicas elevadas. Se ha sugerido para otros crustáceos que el tiempo de aparición de la glucosa en la hemolinfa influye en la utilización metabólica de la misma y el crecimiento (Abdel-Rahman *et al.*, 1979; Cuzon *et al.*, 2000), probablemente asociado a una reducción en la absorción de aminoácidos (Alvaro y Robinson, 1979) o a la saturación de la hexoquinasa por exceso de sustrato (Cuzon *et al.*, 2000).

Por otra parte, varios estudios proponen que las macroalgas pueden brindar carbohidratos viables para ser incluidos en las dietas en langostas espinosas (Jernakoff *et al.*, 1993; Edmunds, 1995; Mayfield *et al.*, 2000; Williams, 2007). Carbohidratos como el agar, el alginato y la CMC son usados comúnmente como aglutinantes en dietas experimentales para crustáceos (Volpe *et al.*, 2008). En experimentos realizados en *J. edwardsii* se obtuvieron mejores digestibilidades con la CMC, que con alginato o agar (Simon,

2009a). Los resultados del presente estudio en *P. argus* coinciden parcialmente con los obtenidos en *J. edwardsii*, pues la CMC resultó más digestible que el alginato, aunque no fue estadísticamente diferente del agar. Sin embargo, la CMC parece ser significativamente más digestible en *J. edwardsii* que en *P. argus*. En *J. edwardsii* la CMC es una de las fuentes de más alta digestión *in vitro*, junto con almidones gelatinizados, la dextrina y el glucógeno, y por encima de almidones como el de papa y el de maíz (Simon, 2009a), lo cual no concuerda con los resultados de este trabajo en *P. argus*. En *P. argus* la CMC mostró bajas tasas de hidrólisis, por debajo de todos los almidones y harinas usadas en el estudio (Tabla 2). Aunque la hidrólisis de la CMC también se ha observado en otros crustáceos (*Homarus gammarus*, Glass y Stark, 1995; *Scylla serrata*, Pavasovic *et al.*, 2004) los resultados del presente trabajo son comparables con los realizados en *Penaeus indicus* (Osmondi y Stark, 1996) y *Penaeus monodon* (Wigglesworth y Griffith, 1994), donde prácticamente no hubo digestión de la CMC.

Las bajas tasas de hidrólisis obtenidas en este trabajo con la agarosa, el alginato y el agar (Tabla 2), concuerdan con los obtenidos en la langosta espinosa *J. edwardsii* por Simon (2009a). Por otra parte, Radford *et al.* (2007) obtienen bajos crecimientos con estos ingredientes en *J. edwardsii* y sugieren que ninguno de estos carbohidratos son alternativas eficientes para dietas de langostas. En general, los resultados obtenidos en *J. edwardsii* y *P. argus* indican que la agarosa, el alginato y el agar no son muy digestibles. Los resultados pueden estar dados por la composición estructural de estos sustratos, obstaculizando una correcta interacción enzima-sustrato.

En general, los resultados del presente trabajo en cuanto a digestibilidad *in vitro* de carbohidratos en *P. argus* concuerdan con los obtenidos en estudios anteriores en crustáceos, aunque se evidencian diferencias incluso con especies cercanas como la langosta espinosa *J. edwardsii* (Simon, 2009a). Por tanto, se confirma que la habilidad de un organismo para digerir y metabolizar diferentes fuentes de carbohidratos varía con la bioquímica digestiva de la especie



en cuestión (Radford *et al.*, 2007). Si bien la información obtenida para algunas especies constituye un punto importante de partida, los resultados del presente trabajo demuestran la necesidad de realizar estudios especie-específicos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su gratitud a : el Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), Cuba, por permitirnos realizar parte de estos estudios en sus instalaciones; en especial a Rolando Perdomo y Vivian Montero por sus acertados comentarios. Al Departamento de Regulaciones Pesqueras del MINAL, en especial a Elisa García; así como a Vargas y Raul Flores en la Industria Pesquera del Puerto de Batabanó, por facilitarnos la obtención de animales vivos para la realización de este estudio.

## REFERENCIAS

- Abdel-Rahman, S.H., Kanazawa, A., Teshima, S.I. (1979) Effects of dietary carbohydrate on the growth and the levels of the hepatopancreatic glycogen and serum glucose of prawn. *Nippon Suisan Gakkaishi* **45**, 1491-1494.
- Alvaro, F., Robinson, J.W.L. (1979) A kinetic study of the interactions between amino acids and monosaccharides at the intestinal brush-border membrane. *J. Physiol.* **295**, 457-475.
- Barnard, R.M., Johnston, M.D., Phillips, B. (2011) Exciting developments: Generation F2 of the tropical *Panulirus ornatus*. *AQUA Culture Asia Pacific Magazine* **7**(1), 37-38.
- Bednar, G.E., Patil, A.R., Murray, S.M., Grieshop, C.M., Merchen, N.R., Fahey Jr., G.C. (2001) Starch and fiber fractions in selected food and feed ingredients affect their small intestinal digestibility and fermentability and their large bowel fermentability in vitro in a canine model. *J. Nutr.* **131**, 276-286.
- Berry, C. (1986) Resistant starch: formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fiber. *J. Cereal Sci.* **4**, 301-314.
- Bordner, C.E., D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. (1983) Assimilation of nutrients by culture hybrid lobsters (*Homarus sp.*) fed experimental diets. *J. World Maric. Soc.* **14**, 11-24.
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S. (1998) Starch granules: structure and biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* **23**, 85-112.
- Campanha, R. and Franco, C. (2011) Gelatinization properties of native starches and their Naegeli dextrins. *J. Therm. Anal. Calorim.* **106**, 799-804.
- Capuzzo, J.M., Lancaster, B.A. (1979) The effects of dietary carbohydrate levels on protein utilization in the American lobster (*Homarus americanus*). *Proc. World Maric. Soc.* **10**, 689-700.
- Cousin, M., Cuzon, G., Guillaume, J., AQUACOP (1996) Digestibility of starch in *Penaeus vannamei*: in vivo and in vitro study on eight samples of various origin. *Aquaculture* **140**, 361-372.
- Crear, B.J., Thomas, C.W., Hart, P.R., Carter, C.G. (2000) Growth of juvenile southern rock lobsters, *Jasus edwardsii*, is influenced by diet and temperature, whilst survival is influenced by diet and tank environment. *Aquaculture* **190**, 169-182.
- Crear, B., Hart, P., Thomas, C., Barclay, M. (2002) Evaluation of commercial shrimp grow-out pellets as diets for juvenile Southern rock lobster, *Jasus edwardsii*: influence on growth, survival, color and biochemical composition. *J. Appl. Aquac.* **12**(3), 43-57.
- Crowe, T.C., Seligman, S.A., Copeland, L. (2000) Inhibition of enzymic digestion of amylose by free fatty acids in vitro contributes to resistant starch formation. *J. Nutr.* **130**, 2006-2008.
- Cruz, R., Lalana, R., Perera, E., Báez-Hidalgo, M., Adriano, R. (2006) Large scale assessment of recruitment for the spiny lobster, *Panulirus argus*, Aquaculture Industry. *Crustaceana* **79**(9), 1071-1096.
- Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Pinal-Mansilla, J.D., Wesche-Ebelling, P. (1994) Effect of different carbohydrate sources on the growth of *Penaeus vannamei*: economic impact. *Aquaculture* **123**, 349-360.
- Cuzon, G., Rosas, C., Gaxiola, G., Taboada, G. and Van Wormhoudt, A. (2000) Utilization of Carbohydrates By Shrimp. En L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa, y R. Civera-Cerecedo, (Eds.), *Avances en Nutrición Acuicola V (Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola)*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.
- Davis, D.A., Arnold, C.R. (1993) Evaluation of five carbohydrate sources for *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* **114**, 285-292.
- Davies, G. and Henrissat, B. (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**, 853-859.
- Edmunds, M. (1995) *The ecology of the juvenile southern rock lobster, Jasus edwardsii* (Hutton 1875) (Palinuridae). Tesis de Doctorado, University of Tasmania, 164 pp.
- Englyst, H.N., Cummings, J.H. (1985) Digestion of the polysaccharides of some cereal foods in

- the human small intestine. *Am. J. Clin. Nutr.* **42**, 778–787.
- Franco, C.M.L., Preto, S.J.R., Ciacco, C.F., Geraldo, B. (1992) Factors that affect the enzymatic degradation of natural starch granules – Effect of the size of the granules. *Starch* **44**, 422–426.
- Glass, H.J., Stark, J.R. (1995) Carbohydrate digestion in the European lobster *Homarus gammarus*. *J. Crustac. Biol.* **15**, 424–433.
- Glencross, B., Smith, M., Curnow, J., Smith, D., Williams, K. (2001) The dietary protein and lipid requirements of post-puerulus western rock lobster, *Panulirus cygnus*. *Aquaculture* **199**, 119–129.
- Goldstein, J.S., Nelson, B. (2011) Application of a gelatinous zooplankton tank for the mass production of larval Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*. *Aquatic Living Resources* **24**, 45–51.
- Irvin, S.J., Williams, K.C. (2007) Apparent digestibility of selected marine and terrestrial feed ingredients for tropical spiny lobster *Panulirus ornatus*. *Aquaculture* **269**, 456–463.
- Jeffs, A.G., Hooker, S.H. (2000) Economic feasibility of aquaculture of spiny lobsters *Jasus edwardsii* in temperate waters. *J. World Aquacult. Soc.*, **31**, 30–41.
- Jeffs, A., Davis, M. (2002) An assessment of the aquaculture potential of the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*. *Proceedings Gulf Caribb. Fish. Institute* **54**, 413–426.
- Jernakoff, P., Phillips, B.F., Fitzpatrick, J.J. (1993) The diet of postpuerulus western rock lobster, *Panulirus cygnus* George, at Seven Mile Beach, Western Australia. *Mar. Freshw. Res.* **44**, 649–655.
- Johnston, D.J. (2003) Ontogenetic changes in digestive enzyme activity of the spiny lobster, *Jasus edwardsii* (Decapoda; Palinuridae). *Mar. Biol.* **143**, 1071–1082.
- Johnston, D.J., Calvert, K. A., Crear, B.J., Carter, C.G. (2003) Dietary carbohydrate/lipid ratios and nutritional condition in juvenil southern rock lobster, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture* **220**, 667–682.
- Jones, C., Williams, K. (2007) Sea cage culture of tropical spiny lobsters. 8th International Conference & Workshop on Lobster Biology & Management, 23–28 September. Charlottetown, Prince Edward Island, Canada.
- Kong, B.W., Kim, J.I., Kim, M.J., & Kim, J.C. (2003) Porcine pancreatic alpha-amylase hydrolysis of native starch granules as a function of granule surface area. *Biotechnol. Prog.* **19**, 1162–1166.
- Koshio, S., Castell, J.D., O'Dor, R.K. (1992) The effect of different dietary energy levels in crab-protein-based diets on digestibility, oxygen consumption, and ammonia excretion of bilaterally eyestalk-ablated and intact juvenile lobsters, *Homarus americanus*. *Aquaculture* **108**, 285–297.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2000) *Principles of Biochemistry, with an extended discussion of oxygenbinding proteins*. Woth Publishers, 479–505 pp.
- Lellis, W. (1991) Spiny lobster, a mariculture candidate for the Caribbean. *World Aquaculture* **22** (1), 60–3.
- Manelius, R., Bertoft, E. (1996) The effect of Ca<sup>2+</sup> ions on the α-amylolysis of granular starches from oats and waxy-maize. *J. Cereal Sci.* **24**, 139–150.
- Mayfield, S., Atkinson, S., Branch, G.M., Cockcroft, A.C. (2000) Diet of the west coast rock lobster *Jasus lalandii*: influence of lobster size, sex, capture depth, latitude and moult stage. *S. Afr. J. Mar. Sci.* **22**, 57–69.
- Mishra, S. and Rai, T. (2006) Morphology and functional properties of corn, potato and tapioca starches. *Food Hydrocolloids* **20**, 557–566.
- Morita, T., Ito, Y., Brown, I.L., Ando, R., Klrlvama, S. (2007) *In Vitro* and *In Vivo* Digestibility of Native Maize Starch Granules Varying in Amylose Contents. *Journal of AOAC International* **90**(6), 1628–1634.
- Omondi, J.G., Stark, J.R. (1996) In vitro carbohydrate digestibility tests in the Indian white shrimp, *Penaeus indicus*. *Aquaculture* **139**, 315–328.
- Pavasovic, M., Richardson, N.A., Andersonb, A.J., Mann, D., Mather, P.B. (2004) Effect of pH, temperature and diet on digestive enzyme profiles in the mud crab, *Scylla serrata*. *Aquacultura* **242**, 641–654.
- Perera, E., Fraga, I., Carrillo, O., Díaz-Iglesias, E., Cruz, R., Báez, M., Galich, G. (2005) Evaluation of practical diets for the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804): effects of protein sources on substrate metabolism and digestive proteases. *Aquaculture* **244**, 251–262.
- Perera, E., Moyano, F.J., Díaz, M., Perdomo-Morales, R., Montero-Alejo, V., Alonso, E., Carrillo, O., Galich, G.S. (2008a) Polymorphism and partial characterization of digestive enzymes in the spiny lobster *Panulirus argus*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **150**, 247–254.
- Perera, E., Moyano, F. J., Díaz, M., Perdomo-Morales, R., Montero, V., Rodríguez-Viera, L., Alonso, E., Carrillo, O., Galich, G. (2008b) Changes in digestive enzymes through developmental and molt stages in the spiny lobster, *Panulirus argus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, **151**, 250–256.

- Perera, E., Pons, T., Hernandez, D., Moyano, F.J., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J.M. (2010a) New members of the brachyurins family in lobster include a trypsin-like enzyme with amino acid substitutions in the substrate-binding pocket. *FEBS Journal*, **277**, 3489–3501.
- Perera, E., Moyano, F. J., Rodríguez-Viera, L., Cervantes, A., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, (2010b) In vitro digestion of protein sources by crude enzyme extracts of the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804) hepatopancreas with different trypsin isoenzyme patterns. *Aquaculture*, **310**, 178–185.
- Perera, E., Rodríguez-Viera, L., Rodríguez-Casariago, J., Fraga, I., Carrillo O., Martínez-Rodríguez, G. and Mancera, J. M. (2012a) Dietary protein quality differentially regulates trypsin enzymes at the secretion and transcription level in *Panulirus argus* by distinct signaling pathways. *Journal of Experimental Biology*, **215**, 853–862.
- Perera, E., Rodríguez-Casariago, J., Rodríguez-Viera, L., Calero, J., Perdomo-Morales, R., Mancera, M.J (2012b) Differences among trypsin isoforms account for variation in protein digestion in the spiny lobster *Panulirus argus*: kinetic approximation to physiological efficiency. *Biol Bull* **222**, 158–170.
- Phillips, B.F., Melville-Smith, R., Cheng, Y.W. (2003) Estimating the effects of removing *Panulirus cygnus pueruli* on the fishery stock. *Fish. Res.*, **65**, 89–10.
- Radford, C.A., Marsden, I.D., Davison, W., Jeffs, A.G. (2007) Effects of dietary carbohydrate on growth of juvenile New Zealand rock lobsters, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture*, **273**, 151–157.
- Robyt, J.F., Whelan, W.J. (1968) The  $\beta$ -amylases. In J.A. Radley, (Ed.), *Starch and its Derivates* (pp 477–497) London: Academic Press.
- Simon, C.J. and Jeffs, A. (2008) Feeding and gut evacuation of cultured juvenile spiny lobsters, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture*, **280**, 211–219.
- Simon, C.J. (2009a) Identification of digestible carbohydrate sources for inclusion in formulated diets for juvenile spiny lobsters, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture*, **290**, 275–282.
- Simon, C.J. (2009b) The effect of carbohydrate source, inclusion level of gelatinised starch, feed binder and fishmeal particle size on the apparent digestibility of formulated diets for spiny lobster juveniles, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture*, **296**, 329–336.
- Simon, C.J. (2009c) Digestive enzyme response to natural and formulated diets in cultured juvenile spiny lobster, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture*, **294**, 271–281.
- Smith, D.M., Willians, K.S., Irvin, S., Barclay, M., Tabrett, S. (2003) Development of a pelleted feed for juvenile tropical spiny lobster (*Panulirus ornatus*): response to dietary protein and lipid. *Aquaculture Nutrition*, **9**, 231–237.
- Smith, D.M., Williams, K.C., Irvin, S.J. (2005) Response of the tropical spiny lobster *Panulirus ornatus* to protein content of pelleted feed and to a diet of mussel flesh. *Aquac. Nutr.*, **11**, 209–217.
- Stone, D.A.J. (2003) Dietary carbohydrate utilization by fish. *Rev. Fish. Sci.* **11**, 337–369.
- Svihus, B., Uhlen, A.K., Harstad, O.M. (2005) Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: A review. *Anim. Feed Sci. Technol*, **122**, 303–320.
- Tester, R.F., Debon, S.J.J. (2000) Annealing of starch: a review. *Int. J. Biol. Macromol.*, **27**, 1–12.
- Tester, R.F., Qi, X., Karkalas, J. (2006) Hydrolysis of native starches with amylases. *Animal Feed Science and Technology*, **130**, 39–54.
- Thuy, N.T.B., Ngoc, N.B. (2004) Current status and exploitation of wild spiny lobsters in Vietnamese waters. In K.C. Williams, (Ed.), *Spiny Lobster Ecology and Exploitation in the South China Sea Region* (pp. 13–16) ACIAR Proc., vol. 120. Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research.
- Tufvesson, F., Skrabanja, V., Bjorck, I., Elmstahl, H.L., Eliasson, A.C. (2001) Digestibility of starch systems containing amylose-glycerol monopalmitin complexes. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **34**, 131–139.
- Volpe, M.G., Monetta, M., Di Stasio, M., Paolucci, M. (2008) Rheological behaviour of polysaccharide based pellets for crayfish feeding tested on growth in the crayfish *Cherax albidus*. *Aquaculture*, **274**, 339–346.
- Ward, L.R., Carter, C.G., Crear, B.J. (2003a) Apparent digestibility of potential 5 ingredients as protein sources in formulated feeds for the southern rock lobster *Jasus edwardsii*. In K.C. Williams, (Ed.), *The Nutrition of Juvenile and Adult Lobsters to Optimize Survival, Growth and Condition: Final Report of FRDC 2000/212* (pp.40–49). Canberra, Australia: Fisheries Research & Development Corporation.
- Ward, L.R., Carter, C.G., Crear, B.J., Smith, D.M. (2003b) Optimal dietary protein level for juvenile southern rock lobster, *Jasus edwardsii*, at two lipid levels. *Aquaculture*, **217**, 483–500.
- Williams, K.C. (2007) Nutritional requirements and feeds development for post-larval spiny lobster: A review. *Aquaculture*, **263**, 1–14.

Recibido: 11/09/2013  
Aceptado: 20/12/2013

#### Como citar este artículo:

Casuso, A., Rodríguez-Viera, L., Perera, E. (2013) Digestibilidad *in vitro* de carbohidratos en la langosta espinosa *Panulirus argus* (Latreille, 1804) *Rev. Invest. Mar.* 33(2), 62-72.