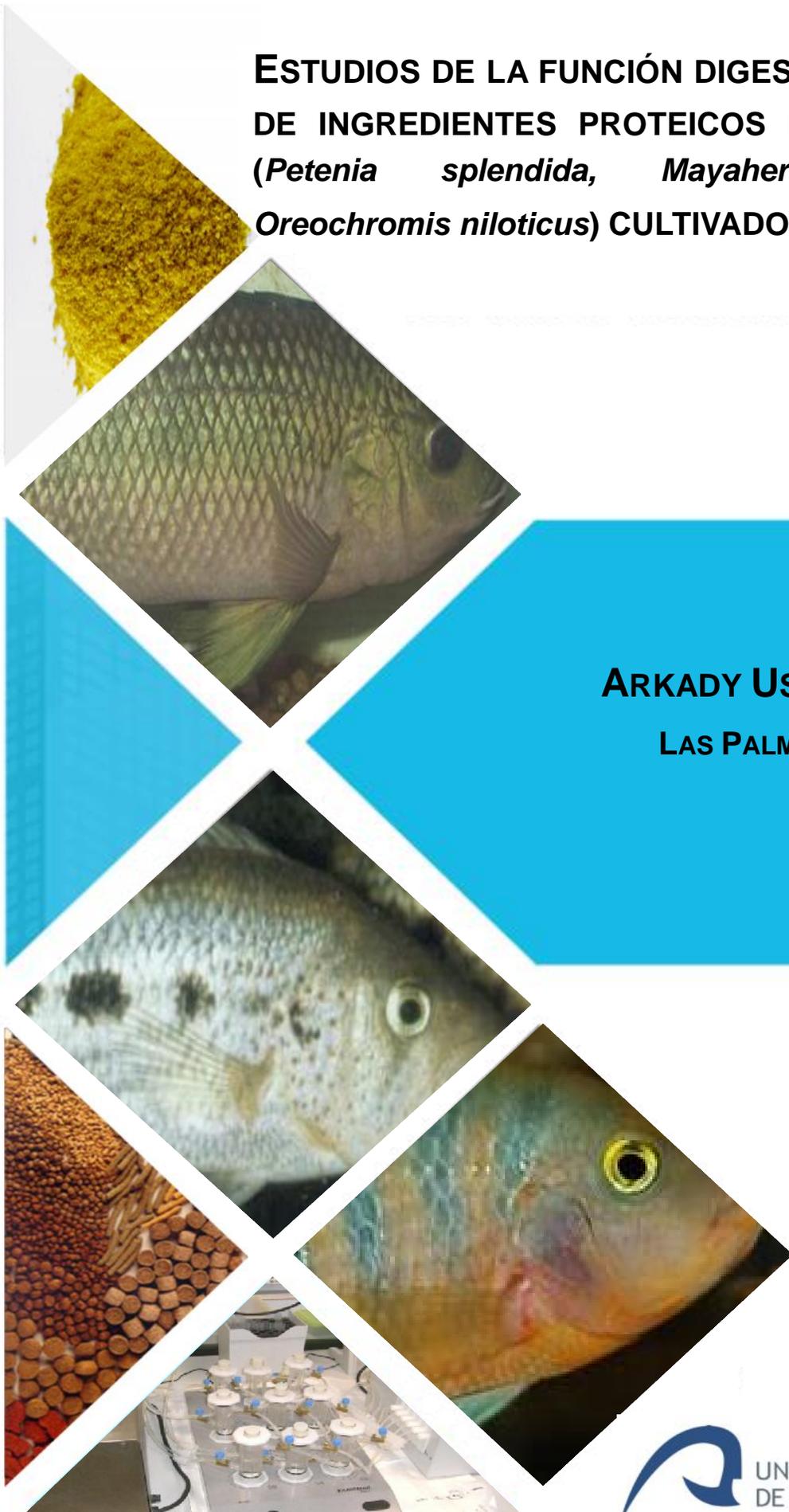


**ESTUDIOS DE LA FUNCIÓN DIGESTIVA Y EVALUACIÓN  
DE INGREDIENTES PROTEICOS EN TRES CÍCLIDOS  
(*Petenia splendida*, *Mayaheros urophthalmus*,  
*Oreochromis niloticus*) CULTIVADOS EN MÉXICO**

**ARKADY USCANGA MARTÍNEZ**

**LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
2020**







UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA

# **Estudios de la función digestiva y evaluación de Ingredientes proteicos en tres cíclidos (*Petenia splendida*, *Mayaheros urophthalmus*, *Oreochromis niloticus*) cultivados en México**

## **Arkady Uscanga Martínez**

Programa de doctorado Acuicultura Sostenible y Ecosistemas Marinos (ACUISEMAR)

**Tesis Doctoral**

**Universidad de Las Palmas de Gran Canaria**

**2020**

**Directores**

**Dr. Francisco Javier Moyano López**

**Dr. Carlos Alfonso Álvarez González**





**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**  
**ESCUELA DE DOCTORADO**

Programa de doctorado en Acuicultura Sostenible y Ecosistemas Marinos

**Título de la Tesis**

Estudios de la función digestiva y evaluación de ingredientes proteicos en tres  
cíclidos Petenia splendida, Mayaheros urophthalmus, Oreochromis niloticus  
cultivados en México.

Tesis Doctoral presentada por D/D<sup>a</sup> Arkady Uscanga Martinez

Dirigida por el Dr/a. D/D<sup>a</sup>. Dr. Francisco Javier Moyano López

Codirigida por el Dr/a. D/D<sup>a</sup>. Dr. Carlos Alfonso Álvarez González

**El/la Director/a,**

**El/la Codirector/a**

**El/la Doctorando/a,**

(firma)

(firma)

Las Palmas de Gran Canaria, a 16 de diciembre de 2019

---

## Agradecimientos

En especial al Dr. Francisco Javier Moyano López por confiar en mí y dirigir la presente investigación científica, por contribuir en mi formación académica de los últimos años y por el apoyo incondicional que me ha brindado para la terminación de este trabajo.

Al Dr. Carlos Alfonso Álvarez González por su incondicional apoyo y la confianza otorgada para el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Lidia Esther Robaina Robaina por su asesoría y seguimiento durante el periodo de permanencia en el programa de doctorado.

Al Dr. Daniel Montero Vítores por todo su acompañamiento y asesoramiento durante el tiempo de permanencia en el programa de doctorado.

Al Dr. Héctor Nolasco Soria, Dr. Lenin Arias Rodríguez y al Mc. Gabriel Márquez Couturrier por su apreciable apoyo.

A la familia por ser el pilar y fortalecimiento del éxito logrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo del programa de becas de doctorado en el extranjero, con No. de registro 177248.

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco que a través de su programa de becas Institucional de Superación Académica, se apoyó el cumplimiento de los objetivos de este estudio.

---

# Í N D I C E

ÍNDICE DE FIGURAS .....	1
ÍNDICE DE TABLAS .....	3
RESUMEN .....	4
I. Introducción .....	6
1.1 Situación actual de la acuicultura .....	6
1.2 Cultivo de especies nativas .....	7
1.3 Descripción de especie en estudio .....	8
1.3.1 La mojarra tenguayaca ( <i>P. splendida</i> ) .....	9
1.3.2 La mojarra castarrica ( <i>M. urophthalmus</i> ) .....	11
1.3.3 La mojarra tilapia ( <i>O. niloticus</i> ) .....	12
1.4 Nutrición .....	13
1.5 Ontogenia .....	15
1.6 Fisiología digestiva .....	17
1.7 Digestibilidad In vivo e In Vitro .....	19
1.7 Referencias .....	21
II Justificación .....	35
III Objetivos .....	38
3.1 General .....	38
3.2 Específicos .....	38
IV. Cambios en la actividad de las enzimas digestivas en la ontogenia inicial de la mojarra tenguayaca ( <i>Petenia splendida</i> ) .....	40
4.1 Resumen .....	41
4.2 Introducción .....	42
4.3 Materiales y Métodos .....	44
4.3.1 Obtención de crías .....	44
4.3.2 Método de muestreo .....	44
4.3.3 Análisis bioquímico .....	45
4.3.4 Zimograma de proteasas .....	47
4.3.5 Cálculos del R <sub>f</sub> y pesos moleculares .....	48
4.3.6 Análisis estadísticos .....	49
4.4 Resultados .....	49
4.5 Discusión .....	55
4.5.1 Crecimiento .....	55
4.5.2 Actividad de las proteasas alcalinas .....	56

---

4.5.3 Actividad de proteasas ácidas.....	58
4.5.4 Zimogramas de proteasas ácidas y alcalinas .....	59
4.5.5 Importancia fisiológica de las enzimas digestivas .....	61
4.6 Referencias .....	65
V. Evaluación de la eficiencia enzimática en la digestión de las proteínas en la tilapia del Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	73
5.1 Resumen.....	74
5.2 Introducción .....	75
5.3 Materiales y métodos.....	76
5.3.1 Peces experimentales y alimentación .....	76
5.3.2 Protocolo de alimentación y medición de paso intestinal .....	77
5.3.3 Cuantificación en la producción de enzimas.....	78
5.3.4 Análisis estadístico.....	79
5.4 Resultados .....	80
5.5 Discusión .....	84
5.6 Referencias .....	87
VI. Evaluación del efecto de harinas de origen vegetal como inhibidores de proteasas digestivas en cíclidos.....	93
6.1 Resumen.....	94
6.2 Introducción .....	95
6.3 Materiales y métodos.....	97
6.3.1 Organismos .....	97
6.3.2 Extractos enzimáticos.....	97
6.3.3 Preparación de los extractos de las harinas .....	98
6.3.4 Cuantificación de la actividad proteasa .....	98
6.3.5 Inhibición de la actividad de proteasa con extractos de las harinas. ....	98
6.3.6 Detección del efecto de inhibidores sobre en enzimas específicas con sustrato-SDS-PAGE .....	99
6.4 Resultados .....	100
6.5 Discusión .....	104
6.6 Referencias .....	108
VII. Digestibilidad in vitro de fuentes alternativas de proteínas para la alimentación de peces tropicales .....	117
7.1 Resumen.....	118
7.2 Introducción .....	119
7.3 Materiales y métodos.....	120

---

7.3.1 Peces experimentales.....	120
7.3.3 Harinas experimentales. ....	121
7.3.4 Preparación de los extractos enzimáticos. ....	122
7.3.5 Determinación de actividad proteasa.....	123
7.3.6 Condiciones generales del sistema in vitro.....	123
7.3.7 Análisis estadísticos.....	124
7.4 Resultados.....	124
7.5 Discusión.....	128
7.6 Referencias.....	132
VIII. Discusión general.....	141
8.1 Referencias.....	150
IX. Conclusiones.....	161

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Peso húmedo promedio ( $\text{mg larva}^{-1} \pm$  desviación estándar,  $n=3$ ) de las larvas de tenguayaca *P. splendida* durante su larvicultivo.....50

Figura 2.- Actividad enzimática digestiva de proteasas durante la ontogenia inicial de tenguayaca (promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n=3$ ). (a) Actividad proteasa alcalina específica, (b) actividad individual de proteasa alcalina, (c) actividad específica de proteasa ácida, (d) actividad individual de proteasa ácida, (e) actividad específica de tripsina, (f) actividad individual de tripsina, (g) actividad específica de la quimotripsina, (h) actividad individual de la quimotripsina, (i) actividad específica de la leucina-aminopeptidasa (j) actividad individual de la leucina-aminopeptidasa.....53

Figura 3.- Actividad enzimática digestiva durante la ontogenia inicial de tenguayaca (promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n=3$ ). (a) Actividad específica de la lipasa, (b) actividad individual de la lipasa, (c) actividad específica de la  $\alpha$ -amilasa, (d) actividad individual de la  $\alpha$ -amilasa, (e) actividad específica de fosfatasa alcalinas, (f) actividad individual de fosfatasa alcalinas, (g) actividad específica de fosfatasa ácidas, (h) actividad individual de fosfatasa ácidas.....54

Figura 4.- Zimogramas de las proteasas digestivas durante el desarrollo larvario de la tenguayaca. (a) SDS-PAGE para proteasas alcalinas. M: Marcador de pesos moleculares. Albúmina bovina sérica (66 kDa); albúmina de huevo (43 kDa); Anhidrasa carbónica (29 kDa); tripsinógeno (24 kDa); inhibidor trípico de soja (20 kDa). (b) PAGE para proteasas ácidas.....55

Figura 5.- Progresión del alimento con respecto al tiempo de residencia en el intestino de juveniles de tilapia.....81

Figura 6.- Producción total de la tripsina (A) y quimotripsina (B) con respecto al tiempo después de la alimentación de los juveniles de tilapia.....82

Figura 7.- Inhibición de la actividad proteasa alcalina obtenida después de 1 hora de incubación con extractos enzimáticos de los diferentes peces frente a incrementos de concentración de harina: A) sorgo, B) salvado de trigo, C) soja y D) trigo..... 102

Figura 8.- Zimograma sobre el efecto de inhibición durante la actividad alcalina frente a incrementos de concentración de harina de soja: Tilapia A) proteína extracto, B) harina de soja. Tenguayaca C) proteína extracto, D) harina de soja. Castarrica E) proteína extracto, F) harina de soja. Marcador de peso molecular: fosforilasa B (97.4 kDa), albúmina de suero

---

bovino (66.2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa),  
inhibidor de tripsina de soja (20.5 kDa) y lisozima (14.4 kDa)..... 103

Figura 9.- Curvas de hidrólisis de la liberación de aminoácidos durante un  
periodo de 180 min como fuente de proteínas las harinas de pollo, sangre  
de res, pescado, sorgo, gluten de trigo, salvado de trigo y casina, por  
extracto enzimático de A) tilapia; B) tenguyayaca y C) castarrica..... 126

---

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Composición de las dietas experimentales utilizadas para evaluar la frecuencia de alimentos en tránsito en juveniles de tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> . .....	77
Tabla 2.- Eficiencia enzimática estimada en las dos secciones del intestino en juveniles de tilapia .....	83
Tabla 3.- Actividad de las proteasa alcalinas y proteína soluble de los extractos intestinales de la <i>P. splendida</i> , <i>M. urophthalmus</i> y <i>O. niloticus</i> (Valores promedio $\pm$ desviación estándar). .....	101
Tabla 4.- Fuentes de proteínas evaluadas en el sistema in vitro.....	122
Tabla 5.- Resultados obtenidos de la hidrólisis de las diferentes fuentes de proteína de origen animal y vegetal con extractos enzimáticos de tilapia, tenguayaca y castarrica (Promedio $\pm$ desviación estándar). Superíndices desiguales indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). .....	127

## RESUMEN

Esta investigación tuvo por objetivo abordar los aspectos de la fisiología digestiva de tres cíclidos de importancia acuícola del sureste mexicano, con el fin de optimizar los requerimientos de alimentación en las diferentes etapas de desarrollo de los peces nativos *Petenia splendida* (Tenguayaca) y *Mayaheros urophthalmus* (Castarrica) y el pez exótico *Oreochromis niloticus* (Tilapia) que permitan mejorar el cultivo controlado en granjas y sistemas de producción de crías. Como primer ensayo, se evaluó el cambio de la actividad enzimática digestiva durante la ontogenia inicial de la mojarra tenguayaca (*P. splendida*). Los resultados mostraron que las actividades de las enzimas digestivas están presentes desde su eclosión y fueron variando gradualmente con cambios en el esquema alimenticio y el desarrollo del sistema digestivo; de acuerdo con los resultados las larvas de las *P. splendida* pueden ser alimentadas con dietas artificiales a partir de los 10 días después de la eclosión (DDE). Posteriormente, se llevó a cabo la evaluación de la eficiencia enzimática en la digestión de las proteínas en juveniles de la mojarra tilapia (*O. niloticus*), se estableció que se requiere 7.15 h de recorrido del alimento a través del tracto digestivo; por lo que el cálculo de la eficiencia enzimática indica que en el intestino proximal se lleva a cabo principalmente la digestión de las proteínas. Por otra parte, se evaluó el efecto de los inhibidores de proteasas en concentraciones crecientes de harinas vegetales sobre los extractos enzimáticos de los digestivos de las tres especies de cíclidos. Se detectó que la actividad de proteasas digestivas de los peces presentan una alta sensibilidad desde 24 hasta con una inhibición máxima del 95%, por lo que se determinó que el valor nutricional de las harinas vegetales presentan inhibidores del tipo Kunitz y Bowman-Birk, los cuales afectan principalmente enzimas de tipo tripsina y quimotripsina presentes en el tracto digestivo de los peces. Por último, se realizó la evaluación in vitro empleando el modelo gastrointestinal de la membrana semipermeable y se determinó la bioaccesibilidad y

biodisponibilidad de las proteínas presentes en las harinas de origen animal y vegetal a nivel industrial utilizadas en la formulación de alimentos balanceados, frente a los extractos multienzimáticos obtenidos de estómagos e intestinos de tilapias, tenguayacas y castarricas. Los resultados muestran que la harina de pescado, fue la que presentó el mayor grado de hidrólisis de aminoácidos liberado de 39.5 mg/mL con las enzimas digestivas de juveniles de *P. splendida*; por lo que se determinó una digestibilidad in vitro del 79%. Así como el tiempo de liberación de 1.99 h del 50% del total de la hidrólisis a partir de 500 g kg<sup>-1</sup> de proteína cruda. Los resultados obtenidos a partir de los estudios realizados, sugieren que se debe profundizar sobre la fisiología digestiva de las citadas especies, con el fin de lograr la formulación de alimentos específicos para cada estadio de cultivo para cíclidos del Sureste de México.

## I. Introducción

### 1.1 Situación actual de la acuicultura

El pescado representa una fuente importante de proteína animal en la dieta de la población humana, su extracción está respaldada por aproximadamente 2,500 especies, principalmente peces óseos (Shiau 2001, FAO 2019). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que una de las principales fuentes para obtener este recurso es la pesca comercial. Se ha observado que la producción pesquera se ha mantenido en 91 millones de toneladas para 2016 (FAO 2018a). En este sentido, la producción acuícola compensó los efectos de este estancamiento, siendo el sistema de producción de alimentos que tuvo la mayor tasa de crecimiento en la última década, por lo que aumentó de 55.1 millones de toneladas en 2009 a 110 millones de toneladas en 2016 (FAO 2010, FAO 2018b). La producción de organismos en agua marina domina con 51.2 millones de toneladas (46.5%) seguido por el cultivo en agua dulce con 50.3 millones de toneladas (45.7%) y finalmente el cultivo de organismos en aguas salobres con una producción de 8.5 millones de toneladas (7.7%), según FAO (2018b).

En México, la acuicultura tiene enorme potencial de desarrollo por la diversidad de organismos que presenta y su posición geográfica, con una elevada disponibilidad de recursos hídricos; 11,122 km de costa, 3 millones de km<sup>2</sup> de área exclusiva de explotación entre mar territorial y plataforma marítima continental, 12,500 km<sup>2</sup> de lagunas salobres y 6,500 km<sup>2</sup> de aguas continentales (INEGI 2010; SAGARPA 2011; SEMARNAT 2016). Destaca el Programa de Vinculación Productiva de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA) que ejerció durante el período de 2014 a 2017 logro una inversión de 1,400 millones de pesos en el desarrollo de innovación tecnológica para el cultivo y reproducción de especies como como tilapia, carpa y camarones. Con estas acciones,

México pretende consolidar la acuicultura como una de las principales actividades que proporcionan fuentes de proteínas para consumo humano (SAGARPA 2017).

## 1.2 Cultivo de especies nativas

En México se cuenta con un registro de 2,171 especies de peces, lo que corresponde al 8,8% a nivel mundial, de las cuales 41 especies son organismos introducidos y/o exóticos. Sin embargo, es importante destacar que dentro de la ictiofauna un número importante de especies (375) corresponde a peces nativos (Martínez et al., 2004). La situación de las especies nativas en hábitats naturales en algunos casos ha llegado a ser crítica como consecuencia de diversos fenómenos de competencia y depredación por parte de las especies exóticas introducidas (Rojas y Mendoza, 2000, Molnar et al., 2008; Liu y Li, 2009; Sanguinetti et al., 2014).

De esta forma, el impacto de las especies exóticas se refleja a nivel biológico (ecológico y genético) y socioeconómico. La base de datos sobre introducción de especies acuáticas de la FAO revela que la mayor parte de los efectos biológicos de especies introducidas han sido negativos, mientras que los impactos socioeconómicos han sido en su mayor parte positivos. Así, la alteración del hábitat, la contaminación, la hibridación, la consanguinidad y la introducción de organismos son actividades vinculadas a la acuicultura que conducen a la disminución de la biodiversidad nativa de organismos acuáticos (Pérez, 1996; Soto et al., 2001; Pérez et al., 2003; Ross et al., 2008; Brufao, 2012; Contreras-MacBeath et al., 2014). De igual manera, se ha señalado que el desarrollo de las actividades acuícolas fundamentada en especies exóticas puede ser un problema más que una solución (Pérez et al., 2000 y 2003; Naylor et al., 2010; Mendoza et al., 2014). Por este motivo se han destinado

---

recursos para la creación de proyectos de investigación y redes para contrarrestar las invasiones biológicas (Savini et al., 2010).

En este mismo sentido, los cultivos de peces de agua dulce que se realizan en México, se llevan a cabo con especies introducidas como truchas, tilapias y carpas (Arismendi, 2009; Arthur, 2010; Copp et al., 2016). La razón de la introducción de estas especies en los países en desarrollo, se debe en mayor grado al desconocimiento de la biología y potencial de cultivo de las especies nativas (Harfush, 1992). De éstas últimas, se han hecho intentos aislados y poco organizados para desarrollar su tecnología de cultivo. En cambio, las especies exóticas se encuentran más desarrolladas y fueron fácilmente adaptadas a las condiciones de nuestro país (Lozano, 2000).

Por su parte, las instituciones de investigación y desarrollo de tecnología (I+D) realizan diversas acciones para ampliar el conocimiento y métodos que permitan aplicarlo a los procesos de producción de alimentos con especies nativas, así como para identificar nuevas especies para integrarlas al catálogo de peces con potencial acuícola del país. Con estas acciones se pretende reducir la introducción de especies exóticas y consigo las consecuencias negativas que estas generan sobre la biodiversidad (Domínguez y Rodiles, 1998; Harfush, 1992; Mendoza, 1994; Ruiz-Campos et al., 2014).

### 1.3 Descripción de especie en estudio

De las especies de peces nativos que habitan en el sureste de México el pejelagarto (*Atractosteus tropicus*), la mojarra castarricas (*Mayaheros urophthalmus*), la mojarra paleta (*Vieja bifasciata*) y la mojarra tenguyaca (*Petenia splendida*), son las que se han estudiado desde hace varios años.

### 1.3.1 La mojarra tenguayaca (*P. splendida*)

La mojarra tenguayaca se distribuye desde el Sureste de México (Tabasco, Chiapas, Campeche y Quintana Roo), hasta Centroamérica. Es común en el estado de Tabasco sobre todo en lagunas, ríos y en lugares denominados popales (Reséndez y Salvadores, 1983; Domínguez y Rodiles, 1998; Torres-Orozco, 1991). Es una especie tolerante a variaciones ambientales; se ha adaptado como un organismo resistente a intervalos de temperatura que fluctúan de 24 a 34 °C (Reséndez y Salvadores, 1983; Gamboa et al., 1997; Pérez-Sánchez y Paramo-Delgadillo, 2008). En lo que se refiere a oxígeno disuelto, puede soportar rangos amplios, desde aguas anóxicas (1.6 mg/L) hasta agua sobresaturada (7.7 mg/L), pH entre 7.03 a 8.45 (Páramo, 1984). La tenguayaca es un pez que tiene un rango amplio de distribución desde dulceacuícola hasta aguas salobres (Caro et al., 1994).

La citada especie alcanza tallas de 37.5 cm de longitud total y 1,500 g de peso, su cuerpo es alto y estrecho, presenta aleta caudal redondeada, mandíbulas protractiles, siendo la inferior muy sobresaliente. Tiene boca grande y cada mandíbula está armada con hilera de dientes filiformes, y otra serie de dientes largos y cónicos (Torral, 1970). Paramo (1982) indica que esta especie no presenta vaina escamosa en la base de las aletas dorsal y anal. En el lago de Peten Itzá, Guatemala, se identificaron dos formas diferentes de tenguayaca, la plateada y la amarilla (Méndez et al., 2011).

Esta especie presenta un solo par de aberturas nasales en la cabeza, con línea lateral interrumpida, una sola aleta dorsal continúa formada por una porción espinosa y otra de radios; la aleta anal similar a la dorsal, pero más corta. En la parte media del cuerpo presenta siete manchas de color negro, que van desde el opérculo hasta el pedúnculo caudal, teniendo en la base de este una mancha más fuerte y definida. El cuerpo es grisáceo con tintes amarillos en la porción media, sobre todo en el opérculo y las

mejillas (Velasco, 1976; Chávez-Lomelí et al., 1989; Contreras, 2003; Vidal, 2004).

La talla mínima de maduración sexual que se tiene registrada para la tenguyaca es de 14 cm de longitud total. Esta especie pone sus huevos adheridos a superficies sólidas y tersas, asimismo se señala que las hembras ponen cerca del millar de huevos; este número varía de acuerdo con el peso de la hembra (Pérez-Vega, 2006). Los huevos tardan en eclosionar de 3 a 5 días según la temperatura del agua. Los ovarios se encuentran bien definidos hasta el estadio IV, son de color anaranjado y se encuentran dos tipos de huevos: unos muy pequeños y otros grandes y alargados. Estos últimos cuando se encuentran en una fase muy cercana a la maduración miden de 1.0 a 2.0 mm de largo y tienen un color amarillo claro (Reséndez y Salvadores, 1983). Se puede confirmar que la tenguyaca es un pez de reproducción precoz y potencialmente capaz de reproducirse durante todo el año. Sin embargo, presenta un período preferencial de reproducción; este período comprende de marzo a septiembre con temperaturas de por lo menos 28 °C (Martínez, 2004).

Es una especie de hábitos diurnos, principalmente carnívoro y en menor intensidad se alimenta de restos vegetales principalmente en etapa adulta (Santiago et al., 1997; Valtierra, 2000). Se han realizado evaluaciones donde se observan mayores rendimientos de crecimiento empleando un requerimiento de proteína del 45 al 50% y lípidos del 12% (Uscanga et al., 2012; Arredondo-Figueroa et al., 2012). Jiménez-Martínez et al. (2009) demostraron que es factible la reproducción de tenguyaca en sistemas de recirculación. Así mismo, se han descrito los cromosomas del cariotipo en meiosis y mitosis (Arias-Rodríguez et al., 2008).

### 1.3.2 La mojarra castarrica (*M. urophthalmus*)

La castarrica (*Cichlasoma urophthalmus*= *Mayaheros urophthalmus*) es una especie que presenta una distribución geográfica, desde los estados del sureste del país (Veracruz, Oaxaca, Tabasco, Campeche, Yucatán y ríos de Quintana Roo) se extienden hasta los países de América Central (Belice, Guatemala, Honduras y Nicaragua) (Martínez, 1987, Martínez-Palacios y Ross, 1992). Se han reportado registros de la especie en el sur de Florida desde 1983 como una especie exótica (Adams y Wolfe, 2007).

Esta especie muestra un fenotipo de corporación alto y estrechado, en la cabeza presenta un solo par de perforaciones nasales, los dientes centrales de la mandíbula superior son más grandes que el resto de los dientes todos ellos se muestran en forma de conos; la línea lateral es interrumpida, exhibe una aleta dorsal y anal, la aleta caudal es redondeada (Álvarez-González et al., 2013). Presenta un color castaño rojizo a verde violáceo, la caracterizan siete franjas perpendiculares en color azul verdoso en la longitud del cuerpo que llegan hasta la base de la aleta caudal. Presenta una cabeza pequeña en comparación del cuerpo en colores rojizos como pecho y garganta. Las aletas son de color verde y alrededor muestran un color rojo y las aletas pectorales se presentan de color amarillas (Martínez-Palacios y Ross, 1994). Es un organismo que muestra una amplia capacidad de adaptación a una diversidad de hábitats (agua dulce, lagunas salobres y manglares) para su crecimiento como su reproducción, así como habilidad para tolerar una amplia gama de condiciones ambientales (Schmitter-Soto, 1996; Chávez-Sánchez et al., 2000). Es un pez que alcanza de 22 a 30 cm de longitud y de 400 a 600 g de peso (Miller et al., 2009; Álvarez-González et al., 2013).

Esta especie presenta hábitos de alimentación con afinidad de ser ictiófagas, con tendencia a la omnívora (Chávez et al., 1989). Su dieta se compone principalmente de materia orgánica (detritus), crustáceos, anfipodos, moluscos, poliquetos, huevos de invertebrados e insectos

(Martínez-Palacios y Ross, 1994; Barrientos-Medina, 2003; Bergmann y Motta, 2005).

Si bien es un pez con alto potencial acuícola, no existe un alimento específico comercial para sus etapas de cultivo, razón por la cual Cuenca et al. (2013) evaluaron en el pH-STAT fuentes de proteína de origen animal y vegetal. Así mismo, han realizado pruebas utilizando harina de pescado *Astyanax aeneus* y el caracol *Pomacea flagellata* como fuentes de proteínas (Cuenca et al., 2016). Se ha descrito la caracterización enzimática lo que confirma las características omnívoras y capacidad de ingerir sustratos propios de organismos carnívoros (Cuenca-Soria et al., 2014).

### 1.3.3 La mojarra tilapia (*O. niloticus*)

Pez dulceacuícola y estuarino, que alcanza hasta 50 cm y 2 Kg de peso, cuerpo alto y robusto, la cabeza es pequeña en relación con la longitud del cuerpo. Presenta escamas grandes y fuertes, la línea lateral es interrumpida (Morales, 1991). La aleta anal tiene 3 espinas y de 8 a 11 radios, presenta colores variables, pero en general, posee un color gris plateado uniforme, generalmente las tilapias poseen dientes en la boca y en la faringe, esta es una característica de las especies herbívoras, ya que éstos últimos son muy fuertes, lo que les permite mayor trituración del alimento, factor que les ayuda a su digestión (Pillay, 1993; Fitzsimmons, 1997).

El sistema digestivo de la tilapia, inicia en la boca, con dientes mandibulares continua en el esófago hasta el estómago. El intestino es de forma de tubo hueco y redondo que se adelgaza después del píloro, diferenciándose en dos partes, una inferior corta que corresponde al duodeno y una posterior más grande de menor diámetro. El intestino es siete veces más largo que la longitud total del cuerpo de pez,

característica que predomina en las especies herbívoras (Egna y Boyd, 1997).

Las tilapias se caracterizan por ser peces de cuerpo comprimido, tipo discoidal, tienen un solo orificio nasal a cada lado de la cabeza que sirve simultáneamente como entrada y salida de la cavidad nasal, y generalmente el macho alcanza mayores tallas que la hembra (Arredondo et al., 1994). La diferenciación externa de los sexos se basa en que el macho presenta dos orificios bajo el vientre: el ano y el orificio urogenital, mientras que la hembra posee tres: el ano, el poro genital (oviducto) y el orificio urinario (Saavedra, 2006). La tilapia es una especie exótica que fue introducida a México por vez primera en 1964 (Arredondo et al., 1994).

#### 1.4 Nutrición

Indudablemente el cultivo exitoso de cualquier especie implica comprender los diversos aspectos biológicos, económicos, sociales y del ambiente. Es así que el continuo desarrollo y mejoramiento en la eficiencia alimentaria en la producción acuícola requiere mejoras sostenidas desde la formulación y la tecnología de los alimentos, así como el conocimiento fisiológico de los organismos, hábitos alimenticios, requerimientos nutricionales, y digestibilidad de los diferentes productos, entre otros, y ello permitirá contribuir a incrementar los rendimientos económicos en esta actividad y de esta forma asegurar un crecimiento óptimo de los organismos (De la Higuera, 1987; Soler et al., 2000).

La nutrición es uno de los factores más importantes en la acuicultura, siendo la proteína uno de los aspectos más significativos a considerar para la alimentación de los peces (Catacutan, 2001; Moon et al., 2001; Ng et al., 2001; Kim y Sang-Min, 2005; Wang et al., 2016; Saavedra et al., 2018; Ren et al., 2019), dada la importancia que tienen en las numerosas funciones que este nutriente realiza, ya sea como catalizadores,

elementos estructurales, en los sistemas contráctiles, reserva de los elementos nutritivos, vehículos de transporte; así también como hormonas y elementos de protección (Tacon, 1987; Barroso et al., 1994; Lehninger, 1995; Kang et al., 2005; Ali y Jauncey, 2005; Kaushik y Seilliez, 2010). Por lo tanto, esta área de la nutrición es la que genera los mayores costos de producción, alcanzando incluso más de la mitad de los costos de la operación del cultivo (National Research Council, 1993; Sang-Min et al., 2000; Kim et al., 2001; Ng et al., 2003; Meyer y Machado, 2004; Cho et al., 2005; Dong-Fang et al., 2011; Ye et al., 2017).

Las proteínas, al ser el componente básico de los tejidos, son esenciales para el mantenimiento y el crecimiento de los peces (Hepher, 1993), constituyen alrededor del 50% del peso seco de las células y son fundamentales en todos los aspectos de la estructura y función. Además aportan los aminoácidos necesarios para varios procesos bioquímicos (Carrillo et al., 1987; Ren et al., 2019). Las proteínas son compuestos orgánicos complejos de elevado peso molecular, que contienen al igual que las grasas y los carbohidratos, oxígeno, carbono e hidrógeno, nitrógeno y azufre (Soler et al., 2000). Estas moléculas, contienen frecuentemente varias centenas de aminoácidos ya que estos son los constituyentes principales de la proteína y se caracterizan por poseer un grupo nitrogenado básico amino (-NH) y uno carboxilo (-COOH) (Curtis y Barnes, 2002). Se ha demostrado que, para lograr el máximo crecimiento en los peces, los aminoácidos esenciales tienen que ser proporcionados en la alimentación, ya que no pueden ser sintetizados por el organismo (Cowye, 1999; Marammazi et al., 2017). Sin embargo, los peces no tienen requerimientos de proteína cruda o absoluta, como lo describen Menghe et al. (2003), sino que requieren ciertas cantidades de aminoácidos digestibles, mismos que son influidos por varios factores como lo son la especie, la edad, la ración alimenticia, composición de la dieta y su contenido en energía digestible, la temperatura del agua y el tamaño de la partícula (Ahmed et al., 2019). Una vez que la proteína es hidrolizada, se

liberan los aminoácidos, los cuales son absorbidos por el tracto intestinal y distribuidos a través de la sangre a todos los órganos y tejidos del pez (Soler et al., 2000; Alam et al., 2002; Dabrowski et al., 2010).

### 1.5 Ontogenia

Durante la vida de los peces uno de los momentos más importantes es el inicio de la alimentación exógena, esto ocurre cuando se han agotado las reservas de nutrientes en el huevo, dicho proceso sucede en los primeros días después de la eclosión. Desafortunadamente, esta etapa no es muy favorable para las larvas, ya que se ha observado tanto en poblaciones naturales como de laboratorio que durante este cambio ontogénico se presenta la mayor mortalidad por diversas razones (Yúfera y Darías, 2007). En el caso de las larvas de peces de ontogenia indirecta o transicional, esta situación obliga a establecer a la par cultivos auxiliares (fitoplancton y zooplancton) para mejorar la supervivencia de las larvas y lograr la producción de semilla (Tucker, 1998; Hamlin y Kling, 2001). De esta forma, se requiere de una inversión adicional para la producción de alimentos vivos, lo que eleva los costes de producción, además de requerir personal técnico altamente capacitado (Holt, 2000). Por lo tanto, una manera de garantizar el éxito del cultivo es mediante un alimento balanceado apropiado para las larvas, el cual debe ser de buena calidad y se debe administrar en cantidades suficientes (Izquierdo, 1996; Yúfera y Darías, 2007).

Debido a estas problemáticas en los últimos años se han realizado estudios que ayudan a entender cómo funciona el sistema digestivo de los peces y así mejorar el cultivo, uno de esos estudios es conocer la ontogenia digestiva, que refleja la funcionalidad y la capacidad que tiene el tracto digestivo del organismo (Pradhan et al., 2012).

Las etapas de vida de los peces pueden ser descritas de acuerdo con sus condiciones fisiológicas y morfológicas donde se presentan cambios que podemos clasificar durante su ontogenia. Por lo tanto, existen tres tipos de ontogenia la directa (embrión, larva, juveniles, adulto y adulto en senectud) la indirecta esta se caracteriza por no tener un periodo larvario pasando directamente a la etapa juvenil y la transicional comprende las etapas de embrión, alevín (presenta un vestigio larvario), juvenil, adulto y senectud (Balon, 1984; Balon, 2002; Alarcón et al., 2017).

En la ontogenia indirecta se presenta un desarrollo embrionario, que se inicia con la fecundación donde se fusionan los gametos, seguidamente de la fertilización, el paso siguiente es la división celular, y se forma el embrión, cuando el embrión ha reabsorbido el vitelo y los glóbulos de aceite se dice que el periodo embrionario ha terminado. Esta etapa, con lleva tres fases segmentación, embrión y eleuteroembrión (Lagler et al., 1977; Balon, 1984)

La segunda etapa de este tipo de ontogenia inicial consiste en el periodo larvario que está comprendida por tres fases (preflexión, flexión y posflexión) en ella las larvas presentan cambios morfo-estructurales y fisiológicos al pasar de una estructura cartilaginosa (notocorda) hasta la formación del hueso, con la estructuración completa de la placa hipúrica hasta que se forman las aletas, escamación y pigmentación semejante a la de un adulto (fases prejuvenil y juvenil), aunque sin la capacidad de realizar el proceso de reproducción; pero si la captura de organismos para su alimentación (Kendall et al., 1984 y Hubbs, 1958 modificado por Ortiz-Galindo, 1991).

Inmediatamente después que todos estos cambios han ocurrido inicia el periodo adulto. El principal indicador de este periodo, es la presencia de las gónadas, y obviamente aparecen las características de la reproducción, en este periodo la tasa de crecimiento disminuye, debido a que el

organismo ocupa la energía en el crecimiento de las gónadas y los gametos (Álvarez-González, 2003).

El último periodo de la ontogenia indirecta es la de senectud, suena lógico que en este periodo disminuya o inclusive finaliza la capacidad de reproducción del pez, otra característica de esta última etapa es que la tasa de crecimiento disminuye considerablemente. Lo que provocará que el organismo muera (Kendall et al., 1984). Sin embargo, el desarrollo de un pez y los cambios morfológicos, no serían exitosos sin una adecuada alimentación, esta ayudará a la perfecta ingesta de alimento y la absorción de nutrientes.

#### 1.6 Fisiología digestiva

El comienzo de la función digestiva será determinado por cada especie, esto establece la capacidad que tienen las larvas para la digestión y absorción de los diferentes tipos de nutrientes. Muchas veces en la literatura se ha mencionado como referencia que, durante el periodo larvario, el páncreas e hígado están completamente desarrollados y son funcionales, por lo que se asume que las enzimas digestivas están presentes (Kendall et al., 1984, Pradhan et al., 2012).

Las enzimas son el grupo de proteínas notables y altamente especializadas. Poseen un grado alto de especificidad con respecto a su sustrato y funcionan en soluciones acuosas en condiciones muy suaves (en general no extremas) de temperatura y pH (Lehninger et al., 1995).

Las enzimas dependiendo de la reacción que catalizan se clasifican en 6 grandes grupos, esto según la Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica (Lehninger, 1984): al primer grupo se le conoce como óxido-reductasas: estas enzimas se encargan de la transferencia de electrones (iones hidruro o átomos de H), el siguiente grupo son las enzimas transferasas: que catalizan transferencias de

grupos funcionales de una molécula a otra. El tercer grupo está formado por las hidrolasas: estas producen reacciones de hidrólisis (trasferencia de grupos funcionales al agua). El cuarto grupo lo integran las liasas: su función es adicionar grupos a dobles enlaces, o formar dobles enlaces por eliminación de grupos. Las isomerasas: entran en el quinto grupo, estas se encargan de transferir los grupos dentro de la molécula dando formas isoméricas. Por último, el sexto grupo lo integran las ligasas. Estas forman enlaces entre átomos de C-C, C-S, C-O, y C-N. Mediante reacciones de condensación acopladas a la rotura de moléculas de ATP (Lehninger et al., 1995).

Con respecto a las enzimas digestivas, la función de las proteasas consiste en catalizar la hidrólisis de los enlaces peptídicos que unen a los aminoácidos y forman la estructura primaria de las proteínas (Dixon y Webb, 1979). Algunas proteasas están implicadas en procesos como la digestión, la activación de proenzimas, prehormonas y muchos otros (Stroud, 1975).

Por otra parte, existe otro tipo de enzimas altamente necesarias denominadas lipasas se clasifican dos tipos I) esterases actúan sobre esterres simples de ácidos grasos de bajo peso molecular y poseen la capacidad de hidrolizar triglicéridos; II) lipasas verdaderas por su preferencia a sustratos de cadenas largas específicamente sobre los enlaces éster; hidrolizan sustratos poco solubles (Canioni et al., 1977). Estas enzimas las podemos encontrar en los lisosomas de la célula, como por ejemplo en las células del páncreas. Algunos estudios indican que también se han encontrado lipasas en el plasma de la sangre, la saliva y el jugo gástrico (Paniagua et al., 2003).

Otras enzimas digestivas importantes son las carbohidrasas, estas enzimas actúan sobre carbohidratos como almidón y glucógeno, su función es hidrolizar los enlaces que unen a dichos monosacáridos, es

decir el enlace glicosídico que se forma entre los carbonos  $\alpha 1$  y 4 (Lehninger et al., 1995). Se dividen en alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ), o endo y exo amilasas. Un grupo particular es la  $\alpha$ -amilasa, la cual está presente en el jugo pancreático de gran cantidad de animales (Archibal, 1987) Actúa sobre los enlaces glucosídicos de la cadena del polímero hidrocarbonado, los productos de dicha reacción es la liberación de moléculas de glucosa, maltosa y oligosacáridos. Por su parte la  $\beta$ -amilasa hidroliza a los carbohidratos por el extremo no reductor, liberando moléculas de maltosa. Se han encontrado en bacterias, hongos y plantas (Hirikado et al., 1994; Ji et al., 2012).

Finalmente, las fosfatasas que catalizan la separación de P inorgánico a partir de fosfato orgánico. Se encuentran en los epitelios intestinales y en diferentes capas tisulares del estómago. Su papel fisiológico en los vertebrados superiores está relacionado con los procesos de mineralización de los huesos (Harris, 1989), así como en procesos de transporte a través de membrana. De hecho, ambas fosfatasas se asocian con el transporte activo de glucosa, proteína y lípidos, e incluso de iones como ha sido reportado para la fosfatasa alcalina (Dupuis et al., 1991, Zacarias et al., 2013).

### 1.7 Digestibilidad In vivo e In Vitro

Para la elaboración de alimentos en la acuicultura, son innumerables las fuentes proteínicas que se utilizan; entre ellas destacan harinas y aceites de animales y plantas, los cuales sirven de base para la formulación y fabricación de los piensos. Desafortunadamente, la mayoría de esas fuentes de proteína no son valoradas desde el punto de vista de la capacidad digestiva de los organismos que las consumen. La formulación y fabricación de los alimentos se basa en los denominados análisis proximales que relacionan la cantidad de combustibles que presentan los alimentos y no en función de la cantidad que requiere el organismo

respecto al tiempo. Una aproximación, que permite valorar la capacidad digestiva de los organismos se da por la utilización de métodos "in vivo", en los que se determina una serie de parámetros o índices relacionados con el grado de aprovechamiento de los ingredientes con relación en el combustible que las compone. Todos estos ensayos resultan costosos, tediosos y largos debido a la necesidad de instalaciones adecuadas, mantenimiento de los animales y el análisis de éstos y sus excretas (Lovell, 1998). Por otra parte, el empleo de marcadores no digeribles como el óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) y óxido de itrio ( $\text{Y}_2\text{O}_3$ ) están siendo más aceptados (Ringo, 1993; Austreng et al., 2000). Sin embargo, el uso de estos marcadores conlleva algunos problemas como el efecto tóxico o el aletargamiento en el paso de los nutrientes (Morales et al., 1999), además de que son una medida indirecta de la digestibilidad, lo cual resulta complicado debido al lento crecimiento de las especies, la dificultad de recolectar las heces en el medio acuático y la influencia de los niveles de inclusión de éstos sobre el aprovechamiento de algunos combustibles (March et al., 1985; Shiao y Liang, 1995).

Debido a lo anterior, se han desarrollado métodos "in vitro" que simulan la digestión de los organismos y podría permitir predecir la digestibilidad de las diferentes harinas que son susceptibles de utilizarse en la formulación de alimentos. De esta manera, algunos investigadores recomiendan que los estudios se encaminen hacia el desarrollo de este tipo de técnicas (Tacon, 1995). Originalmente, se elaboraron métodos solamente que investigaban la fase de digestión alcalina con preparados artificiales de tres a cuatro enzimas (Hsu et al., 1977; Satterlee et al., 1979), donde se valoraba la digestibilidad por medio de la caída de pH en la solución proteica (pH drop o pH shift). A partir de los resultados obtenidos, se ha tratado de simular, en la medida de lo posible, el proceso de digestión completa, mediante sistemas con membrana permeables a modo de bolsa de diálisis que permiten separar y cuantificar en continuo los productos de bajo peso molecular generados por la hidrólisis (Savoie y Gauthier, 1986).

Actualmente, se mejoraron los métodos anteriores, con el desarrollo del sistema del pH-STAT y biorreactores y membranas semi-permeables que permite una determinación rápida de la digestibilidad de la proteína de las diferentes materias primas, las cuales varían en función de la cantidad y tipo de enzimas utilizadas, condiciones de hidrólisis, métodos de fraccionamiento digestivo y el estudio de los productos resultantes (Morales y Moyano, 2010).

### 1.7 Referencias

- Adams AJ, Wolf RK (2007) Occurrence and persistence of non-native *Cichlasoma urophthalmus* (family Cichlidae) in estuarine habitats of south-west Florida (USA): environmental controls and movement patterns. *Marine and Freshwater Research* 58: 921–930.
- Ahmed M, Liang H, Kasiya HC, Ji K, Ge X, Ren M, Liu B, Zhu X, Sun A (2019) Complete replacement of fish meal by plant protein ingredients with dietary essential amino acids supplementation for juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Aquaculture Nutrition* 25:205–214.
- Alam MDS, Teshima S-I, Shunsuke K, Isahikawa M (2002) Arginine requirement of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* estimated by growth and biochemical parameters. *Aquaculture* 205:127-140.
- Alarcón DI, Castillo-Rivera MA, Arroyo-Cabrales J, Figueroa-Lucero G (2017) Cambios Morfológicos en la Ontogenia Temprana de *Chirostoma riojai*. *International Journal of Morphology* 35(1): 331-336.
- Ali MZ, Jauncey K (2005) Approaches to optimizing dietary protein to energy ratio for African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Aquaculture Nutrition* 11: 95-101.
- Álvarez-González CA (2003) Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (PERCOIDEI: SERRANIDAE). Tesis doctoral. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional.

- Archibal AL (1987) Comparison of the serum amylases of farm animals. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 88: 963-968.
- Arias-Rodríguez L, Ibarra-Castro L, Páramo-Delgadillo S (2008) Los cromosomas mitóticos y meióticos del pez tropical *Petenia splendida* (Cichlidae). *Revista de Biología Tropical* 56(2): 895-907.
- Arismendi I, Soto D, Penaluna B, Jara C, Leal C, León-Muñoz J (2009) Aquaculture, non-native salmonid invasions and associated declines of native fishes in Northern Patagonian lakes. *Freshwater Biology* 54(5): 1135-1147.
- Arredondo FJL, Campos R, Flores MV, González TF y Garduño AT (1994) Desarrollo científico y tecnológico del banco de genoma de la tilapia. SEPESCA-UAMI, México. pp. 89.
- Arredondo-Figueroa JL, Matsumoto-Soulé JJ, Ponce-Palafox JT, Shirai-Matsumoto K, Gómez-Márquez JL (2012) Effects of protein and lipids on growth performance, feed efficiency and survival rate in fingerlings of Bay snook (*Petenia splendida*). *International Journal of Animal and Veterinary Advances* 4(3): 204-213.
- Arthur IR, Lorenzen K, Homekingkeo P, Sidavong K, Sengvilaikham B, Garaway JC (2010). Assessing impacts of introduced aquaculture species on native fish communities: Nile tilapia and major carps in SE Asian freshwaters. *Aquaculture* 299: 81–88.
- Austreng E, Storebakken T, Thomassen MS, Refstie S, Thomassen Y (2000) Evaluation of selected trivalent metal oxides as inert markers used to estimate apparent digestibility in salmonids. *Aquaculture* 188: 65-78.
- Balon EK (1984) Reflections on some decisive events in the early life of fishes. *Transactions of the American Fisheries Society* 113: 178-185.
- Balon EK (2002) Epigenetic processes, when *natura non facit saltum* becomes a myth, and alternative ontogenies a mechanism of evolution. *Environmental Biology of Fishes* 65: 1-35.
- Barrientos-Medina RC (2003) The Mayan Cichlid, 'Cichlasoma' urophthalmus: an overview. *The Cichlid Room Companion*. Retrieved from <http://cichlidae.com/article.php?id=181> on 1 March 2007.

- Barroso BJ, García SL, Peregon J, De La Higuera M, Lupiañez AJ (1994) The influence of dietary protein on the kinetics of NADPH production systems in various tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 124:47-59.
- Bergmann GT, Motta PJ (2005) Diet and morphology through ontogeny of the nonindigenous Mayan cichlid '*Cichlasoma (Nandopsis)*' *urophthalmus* (Gunther 1862) in southern Florida. *Environmental Biology of Fishes* 72: 205–211.
- Brufao CP (2012) Las especies exóticas invasoras y el derecho, con especial referencia a las especies acuáticas, la pesca recreativa y la acuicultura. *Revista catalana de dret ambiental* 3(1): 1–54.
- Canioni P, Julien R, Rathelot J, Sarda L (1977) Pancreatic and microbial lipases: a comparison of the interaction of pancreatic colipase with lipases of various origins. *Lipids* 12: 393-397.
- Caro CC, Mendoza AA., Sánchez CM, (1994) Caracterización del ambiente de la Petenia splendida en las lagunas del sur de Quintana Roo: Mendoza E., Galmiche, T. A., Meseguer E. R (Eds). Memoria de II seminario sobre peces nativos con uso potencial en acuicultura. 23 al 26 de mayo 1994. H. Cárdenas, Tabasco, México.
- Carrillo FO, Lee AM, Álvarez VC (1987) *Bioquímica de la nutrición*. Editorial Pueblo y Educación. Habana, Cuba. pp. 134-140.
- Catacutan MR, Pagador GE, Teshima S (2001) Effect of dietary protein and lipid levels and protein to energy ratios on growth, survival and body composition of the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* (Forsskal, 1775). *Aquaculture Research* 32: 811-818.
- Chavez LMO, Mattheeuws AE, Pérez VH (1989) *Biología de peces del río San Pedro en vista de determinar su potencial para la piscicultura*, Xalapa Ver., México. pp. 222.
- Chávez-Sánchez C, Martínez-Palacios CA, Martínez-Pérez G, Ross LG (2000) Phosphorus and calcium requirements in the diet of the American cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Aquaculture Nutrition* 6: 1-9.
- Cho SH, Lee SM, Lee JH (2005) Effect of dietary and lipid levels on growth and body composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L) reared under optimum salinity and temperature conditions. *Aquaculture Nutrition* 11: 235-240.

- Contreras GM de J (2003) Inversión sexual de las mojarrras nativas *Cichlasoma salvini* y *Petenia splendida*, mediante la administración oral de esteroides sintéticos. Tesis Profesional. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. pp. 49.
- Contreras-MacBeath T, Gaspar-Dillanes MT, Huidobro-Campos L, Mejía-Mojica H (2014) Peces invasores en el centro de México, en R. Mendoza y P. Koleff (coords.), *Especies acuáticas invasoras en México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, pp. 413-424.
- Copp HG, Godard JM, Russell CI, Peeler JE, Gherardi F, Tricarico E, Miossec L, Gouilletquer P, Almeida D, Britton RJ, Vilizzi L, Mumford J, Williams C, Reading A, Rees EMA, Merino-Aguirre R (2016) A preliminary evaluation of the European Non-native Species in Aquaculture Risk Assessment Scheme applied to species listed on Annex IV of the EU Alien Species Regulation. *Fisheries Management and Ecology*: 23: 12–20.
- Cuenca SCA, Álvarez GCA, Ortiz-Galindo JS, Guerrero-Zarate R, Perera-García MA, Hernández-Gómez RE, Nolasco-Soria H. (2013) Digestibilidad in vitro de ingredientes proteicos en la mojarra castarrica *Cichlasoma urophthalmus*. *Universidad y Ciencia* 29(3): 263-275.
- Cuenca SCA, Navarro ALI, Castillo-Domínguez A, Melgar VCE, Pérez-Palafox XA, Ortiz-Hernández M (2016) Fuentes proteínicas no tradicionales y su efecto sobre el crecimiento y supervivencia, durante la masculinización del pez *Cichlasoma urophthalmus* (Perciformes: Cichlidae). *Cuadernos de Investigación* 8(2): 163-170.
- Cuenca-Soria CA, Álvarez-Gonzalez CA. Ortiz-Galindo JL, Nolasco-Soria H, Tovar-Ramírez D, Guerrero-Zarate R, Castillo-Domínguez A, Perera-García MA, Hernández-Gómez R, Gisbert E (2014) Partial characterisation of digestive proteases of the Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 40: 689–699.
- Curtis H, Barner SN (2002) *Biología*, 6ta edn. Panamericana pp. 84.
- Dabrowski K, Zhang YF, Kwasek K, Hliwa P, Ostaszewska T (2010) Effects of protein-, peptide- and free amino acid-based diets in fish nutrition. *Aquaculture Research* 41: 668-683

- De la Higuera, M (1987). Requerimientos de proteínas y aminoácidos en peces 53-98 p. en *Nutrición en Acuicultura II*. Espinosa y Labarta (Eds). CAICYT. Madrid. pp. 318.
- Dixon M, EW (1979) *Enzymes*. Academic Press 3th. New York.
- Domínguez-Cisneros S, Rodiles-Hernández R (1998) *Guía de Peces del Río Lacanja, Selva Lacandona, Chiapas, México*. Ecosur, México. pp. 69.
- Dong-Fang D, Zhi Yong J, Warren D, Ryan M, Robert PW (2011) Optimal dietary protein levels for juvenile Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) fed diets with two levels of lipid. *Aquaculture* 316: 25–30.
- Dupuis Y, Tardival S, Poremska Z, Fournier P (1991) Effect of some alkaline phosphatase inhibitors of intestinal calcium transfer. *International Journal of Biochemistry* 23: 175-180.
- Egna HS and Boyd CE (1997) *Dynamics of Pond Aquaculture*. Lewis Publishers, CRC Press, USA. pp. 190-191.
- Fange R, Grove D (1979) Digestion, pp. 161-260. En: W.S. Hoar, D.J. Randall & J.R. Brett (Eds.). *Fish Physiology*. Vol. 8, Academic Press. NY.
- FAO (2010) *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010*. Roma pp. 219.
- FAO (2018a) *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible*. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- FAO (2018b) *Anuario. Estadísticas de pesca y acuicultura 2016*. Roma. pp. 104.
- FAO (2019) *Fisheries Topics: Resources. Recursos de la pesca de captura. Topics Fact Sheets*. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma.
- Fitzsimmons K (1997) Introduction to tilapia Sex-Determination and sex reversal. In: *Proceedings from the fourth international symposium on tilapia in Aquaculture*. Vol. 2, Nov. 9-12. pp. 717-718.
- Gamboa PH, Schmitter SJ (1997) Distribución de las mojarras (Perciformes:Cichlidae) de la Laguna Bacalar, Quintana Roo. En: Ramírez R. G. (Eds.) *Memoria V Congreso Nacional de Ictiología del 3 al 5 de Febrero 1997*. Mazatlán, Sinaloa pp. 2.

- Hamlin HJ, Kling LJ (2001) The culture and early weaning of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) using a microparticulate diet. *Aquaculture* 201: 61-72.
- Harfush MM (1992) Determinación de los requerimientos de proteína dietarica en crías de *Cichlasoma urophthalmus* (Günther, 1962) alimentadas ad libitum. Tesis Maestro en ciencias. Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Harris H (1989) The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin Chim Acta* 186:133-150.
- Hepher B (1993) Nutrición de peces comerciales en estanques. Edit. LIMUSA. Impreso en México, pp. 193.
- Hertrampf JW, Piedad-Pascual F (2000) Handbook of ingredients for aquaculture feeds, Springer, Ámsterdam. pp. 185.
- Hirikado M, Hirata K, Uemarsu Y, Hatooka, Kazama M (1994) Assay for activities of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase used in food processing. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 35(1): 28-33.
- Holt GJ (2000) Symposium on Recent Advances in Larval Fish Nutrition. *Aquaculture Nutrition* 6: 141
- Hsu HW, Vavak DL, Satterlee LD, Miller GA (1977) A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Scienc* 42:1269-1273.
- Hubbs CL (1958) *Dikellorhynchus* and *Kanazawaichthys*: nominal fish genera interpreted as base on prejuveniles of *Malacanthus* and *Antennarius*, respectively. *Copeia* 1958, 282 -285.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). Anuario Estadístico de los Estados Unidos Mexicanos (2010) Instituto Nacional de Estadística y Geografía-México: INEGI 2010.
- Izquierdo MS (1996) Essential fatty acid requirements of culture marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition* 2(4): 183-191.
- Ji H, Sun HT, Xiong DM (2012). Studies on activity, distribution, and zymogram of protease,  $\alpha$ -amylase, and lipase in the paddlefish *Polyodon spathula*. *Fish Physiology and Biochemistry* 38: 603–613.

- Kang WK, Yong JK, Se MC (2005) Optimum dietary protein levels and protein to energy ratios in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal World Aquaculture Society* 36: 165-178.
- Kapoor BG, H. Smit y Verighina IA (1975) The alimentary canal and digestion in teleosts. pp. 109-211. En: F.S. Rusell y M. Yonge (Eds.). *Advances in Marine Biology*. Vol. 13, Academic Press. London.
- Kaushik SJ, Seilliez I (2010) Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: Current knowledge and future needs. *Aquaculture Research* 41: 322–332.
- Kendall AW, Ahlstrom EH, Moser HG (1984) En: Molser HG, Richards WJ, Cohen DM, Fahay MP, Kendall AW, Richardson SL, (Eds.), *Ontogeny and systematics of fishes*, American Society. *Ichthyology. Herpetology. Spec. Public. I. Lawrence*. pp. 11-24.
- Kim JD, Lall SP, Milley JE (2001) Dietary protein requirements of juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *Aquaculture Research* 32(1): 1-7.
- Kim OL, Sang–Min L (2005) Effects of the dietary protein and lipid levels on growth and body composition of bagrid catfish, *Pseudobagrus fulvidraco*. *Aquaculture* 2: 323-329.
- Lagler KF, Bardach JE, Miller RR, Passino DR M (1977) *Ichthyology*. New York, John Wiley & Sons, pp.528.
- Lehninger AL (1984) *Bioquímica*. Omega, Barcelona, España, pp. 1198.
- Lehninger AL (1995) *Bioquímica*. Omega, S. A. Barcelona, España, pp. 1117.
- Liu X, Li Y (2009) Aquaculture Enclosures Relate to the Establishment of Feral Populations of Introduced Species. *PLoS ONE* 4(7): e6199.
- Lovell RT (1998) *Nutrition and Feeding of Fish*. Van Nostrand Reinhold, New York, USA. pp. 73-89.
- Lozano GS (2000) *El marco teórico y práctico de la acuicultura Mexicana*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 219.

- Marammazi JG, Yaghoubi M, Safari O, Peres H, Mozanzadeh MT (2017) Establishing the optimum dietary essential amino acid pattern for silvery-black porgy (*Sparidentex hasta*) juveniles by deletion method. *Aquaculture Nutrition* 23: 1483–1491.
- March BE, Macmillan C, Ming FW (1985) Techniques for evaluation of dietary protein quality for the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 47: 275-292.
- Martínez MJ (2004) Desarrollo embrionario y larval de la mojarra tenguayaca *P. splendida*. Tesis Profesional. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. pp. 72.
- Martínez PC (1987) Aspects of the biology of *Cichlasoma urophthalmus* (Günther) with particular reference to its culture. Ph. D. Thesis, Institute of Aquaculture. University of Stirling. pp. 321.
- Martínez PC, Ross LG (1992) The reproductive biology and growth of the Central American Cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Günther), *Journal Applied Ichthyology* 8: 65-75.
- Martínez PC, Ross LG (1994) Biología y cultivo de la mojarra latinoamericana: *Cichlasoma urophthalmus*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología/Centro de Investigación para la Alimentación y el Desarrollo, México, pp. 203.
- Martínez RE, Doadrio VI, y De Sostoa FA (2004) Peces continentales. En: A.J. García-Mendoza, M.J. Ordóñez y M. Briones-Salas (eds.), *Biodiversidad de Oaxaca*. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund, México, pp. 357-373.
- Martínez-Palacios CA, Ross LG (1992) The reproductive biology and growth of the Central American cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Günther). *Journal of Applied Ichthyology* 8: 99–109.
- Méndez A, García ME, Lozano L (2011) Sistemática del pez *Petenia splendida* (Perciformes: Cichlidae) en el lago Petén Itzá, Guatemala. *Revista de Biología Tropical* 59(3): 1205-1216.

- Mendoza AE, Mendoza AR, Galmiche TA, Meseguer ER (1994) La acuicultura de peces nativos en México: retos y perspectivas: Mendoza E., Galmiche, T. A., Meseguer E. R (Eds). Memoria de II seminario sobre peces nativos con uso potencial en acuicultura del 23 al 26 de mayo 1994. H. Cárdenas, Tabasco, México.
- Mendoza R, Ramírez-Martínez C, Aguilera C, Meave del Castillo ME (2014) Principales vías de introducción de las especies exóticas, en R. Mendoza y P. Koleff (coords.), Especies acuáticas invasoras en México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, pp. 43-73.
- Menghe HL, Bruce BM, Edwin HR, Brian GB (2003) Effect of dietary protein concentration and stocking density on production characteristics of pond-raised Channel Catfish *Ictalurus punctatus*. *Journal of The World Aquaculture Society* 34(2): 147-155.
- Meyer G, Machado FD (2004) Protein requirement of jundia fingerlings *Rhamdia quelen*, at two dietary energy concentrations. *Aquaculture* 240: 331-343.
- Miller RR, Minckley WL, Norris SM (2009) Peces dulceacuícolas de México. pp. 405.
- Molnar LJ, Gamboa LR, Revenga C, Spalding DM (2008) Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Frontiers in Ecology and the Environment*. 6 (9): 485-492.
- Moon LH, Kee-Cho Ch, Jeong-Eui L, Sang-Geun Y (2001) Dietary protein requirement of juvenile giant Croaker, *Nibea Japonica* Temminck & Schlegel. *Aquaculture Research* 32(1): 112-118.
- Morales AE, Cardenete G, De La Higuera M, Sanz A (1994) Effects of dietary protein source on growth, feed conversion and energy utilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 124: 117-126.
- Morales AE, Cardenete G, Sanz A, De la Higuera M (1999) Re-evaluation of crude fibre and acid-insoluble-ash as inert markers, alternative to chromic oxide, in digestibility studies with rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 179, 71-79.
- Morales DA (1991) La tilapia en México. *Biología, cultivo y pesquerías*. A. G. T. Editor S. A., México, D. F. pp. 190.

- National Research Council (1993) Nutrient Requirements of Fish. Editorial National Academy of Sciences. United States of America. pp. 6-13.
- Naylor LR, Williams LS, Strong RD (2001) Aquaculture - A Gateway for Exotic Species. *Science* 294: 1655 -1656.
- Ng WK, Soon SC, Hashim R (2001) The dietary protein requirement of a bagrid catfish, *Mystus nemurus* (Cuvier & Valenciennes), determined using semipurified diets of varying protein level. *Aquaculture Nutrition* 7: 45-51.
- Ortíz-Galindo, JL (1991) Ontogenia inicial de la mojarra rayada *Eugerres axillaris* Gunther, 1864. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN. 64 pp.
- Paniagua R, Nistal M, Álvarez-Uría M, Fraile B, Anadon RJ, Saez F (2003). *Biología Celular*. 2ª ed. Mc Graw-Hill. Interamericana. Madrid, España.
- Páramo DS (1982) Ictiofauna del río González y lagunas adyacentes Tabasco, México. Tesis profesional. Facultad de ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Páramo DS (1984) Ictiofauna del río González y lagunas adyacentes, Tabasco, México. *Universidad y Ciencia* 1(4): 5-18.
- Pérez JE (1996) Mejoramiento genético en acuicultura. Editorial Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. pp. 178.
- Pérez JE, Alfonsi C, Nirchio M, Muñoz C, Gómez JA (2003) The Introduction of exotic species in aquaculture: a solution or part of the problem. *Interciencia* 28: 234-238.
- Pérez JE, M Nirchio, JA Gómez (2000) Aquaculture: part of the problem, not a solution. *Nature* 408:514.
- Pérez-Sánchez E, Paramo-Delgadillo S (2008) The culture of cichlids of southeastern México. *Aquaculture Research*, 39: 777- 783.
- Pérez-Vega, MH (2006) Estudio histológico y endocrino de los Cíclidos Neotropicales, *Tenguayaca*, *Petenia splendida* y la Mojarra Pinta, *Parachromis (Cichlasoma) managuensis* del Sudeste de México. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México, D.F.

- Pillay TV (1993) Aquaculture: principles and practices. Great Britain, Fishing News Books. Pp. 360-376.
- Pradhan PK, Jena J, Mitra G, Sood N, Gisbert E (2012) Ontogeny of the digestive enzymes in butter catfish *Ompok bimaculatus* (Bloch) larvae. *Aquaculture* 424-425: 120-130.
- Ren M, He J, Liang H, Ji K, Ge X, Sun A, Pan L, Masagounder K (2019) Use of supplemental amino acids on the success of reducing dietary protein levels for Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) *Aquaculture Nutrition* 25: 567–576.
- Reséndez MA, Salvadores VML (1983) Contribución al conocimiento de la biología del pejelagarto *Lepisosteus tropicus* (Gil) y la tenguayaca *Petenia splendida* Günther, del Estado de Tabasco. *Biótica* 8(4): 413-4426.
- Ringo E (1993) Does chromic oxide ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) affect faecal lipid and intestinal bacterial flora in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.)? *Aquaculture Research* 24: 767-776.
- Rojas CP, Mendoza EA, (2000) El cultivo de especies nativas en México. Instituto Nacional de la Pesca-SEMARNAP. Dirección General de Investigaciones en Acuicultura. Estado de Salud en la Acuicultura pp. 42.
- Ross GL, Martínez PCA, Morales JE (2008) Developing native fish species for aquaculture: the interacting demands of biodiversity, sustainable aquaculture and livelihoods. *Aquaculture research* 39(7): 675-683.
- Ruiz-Campos G, Varela-Romero A, Sánchez-Gonzales S, Camarena-Rosales F, Maeda-Martínez AM, González-Acosta AF, Andreu-Soler A, Campos-González E, Delgadillo-Rodríguez J (2014) Peces invasores en el noroeste de México, en R. Mendoza y P. Koleff (coords.), *Especies acuáticas invasoras en México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, pp. 375-399.
- Saavedra M, Pereira TG, Candeias-Mende A, Carvalho L, Pousão-Ferreira P, Conceição LEC (2018) Effect of increased dietary protein level in meagre (*Argyrosomus regius*) juvenile growth and muscle cellularity. *Aquaculture Nutrition* 24: 1153–1159.

- Saavedra, MA (2006) Introducción al cultivo de tilapia. Coordinación de Acuicultura, Departamento de Ciencias Ambientales y Agrarias, Facultad de Ciencia, Tecnología y Ambiente. Universidad Centroamericana. Managua, Nicaragua. pp. 22.
- SAGARPA (2003) Boletines del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y Red de Diagnostico, Reseña Histórica de la Truchicultura en México, Boletín 21, Vol. 1, número 21.
- SAGARPA (2011) Anuario estadísticos de acuicultura y pesca 2010. p 285
- SAGARPA (2017) Boletín pesquero y acuícola, SAGARPA-CONAPESCA ha invertido 880 MDP en proyectos pesqueros y acuícolas en beneficio de 11 mil mueres. México.
- Sang-Min L, Hwoan CS, Kyoung-Duck K (2000) Effects of Dietary Protein and Energy Levels on Growth and Body Composition of juvenile Flounder *Paralichthys olivaceus*. Journal of the world aquaculture society 31(3): 306-315.
- Sanguinetti J, Buria L, Malmierca L, Valenzuela AEJ, Núñez C, Pastore H, Chauchard L, Ferreyra N, Massaccesi G, Gallo E, Chehébar C (2014) Manejo de especies exóticas invasoras en Patagonia, Argentina: Priorización, logros y desafíos de integración entre ciencia y gestión identificados desde la Administración de Parques Nacionales. Ecología Austral 24: 183-192.
- Santiago LMC, Jardono J, Jaramillo SG, Reyes AJE, Sanchez VA (1997) Edad, crecimiento y hábitos alimenticios de *Cichlasoma salvini* (Günther), *Cichlasoma urophthalmus* (Günther), *Oreochromis niloticus* (Linneo), y *Petenia splendida* (Günther) presa Miguel de la Madrid H. "Cerro de Oro" Tuxtepec, Oaxaca. En: Ramírez R. G. (Eds.) Memoria V Congreso Nacional de Ictiología del 3 al 5 de Febrero 1997. Mazatlán Sinaloa. pp. 38.
- Satterlee LD, Marshall HF, Tennyson JM (1979) Measuring protein quality. Journal of the American Oil Chemists' Society 56: 103-109.
- Savini D, Occhipinti-Ambrogi A, Marchini A, Tricarico E, Gherardi F, Olenin S, Gollasch S (2010) The top 27 animal alien species introduced into Europe for aquaculture and related activities. Journal of applied Ichthyology 26(2): 1-7.
- Savoie L, Gauthier SF (1986) Dialysis cell for the in vitro measurement of protein digestibility. Journal of Food Science 51: 494-498.

- Schmitter-Soto JJ (1996) Catalogo de los peces continentales de Quintana Roo. pp. 144-145.
- SEMARNAT (2016) Costas y mares de México. Manejo integrado con amor. México. pp. 118.
- Shiau S, Liang H (1995) Carbohydrate utilization and digestibility by tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, are affected by chronic oxide inclusion in the diet. *Journal of Nutrition* 125(4): 976-982.
- Shiau S-Y (2001) Applications of fish nutrition research in aquaculture: the Taiwan experience. *Aquaculture Research* 32: 639-643.
- Soler JM, Rodríguez GH, Victoria DP (2000) Fundamentos de nutrición y alimentación en acuicultura. Editorial Hollman Echeverry Cubillos. Impreso en Colombia.
- Soto DF, Jara F, Moreno C (2001) Escaped salmon in the Chiloé and Aysen inner seas, southern Chile: facing ecological and social conflicts. *Ecological Applications* 11: 1750-1762.
- Stroud R (1975) A family of proteins-cutting proteins. *Scientific American* 231(1): 74-89.
- Tacon AG (1987) The nutrition and feed of conventional farmed fish and shrimp- A training manual. Vol. 1 The essential nutrients GCP/RLA/075/ITA.FAO. pp. 117.
- Tacon AG (1995) Application of nutrient requirement data under practical conditions: special problems of intensive and semi-intensive fish farming. *Journal of Applied Ichthyology* 11: 205-214.
- Toral AS (1970) Los cíclidos de la Laguna de Términos. Tesis profesional. Facultad de ciencias Universidad Nacional Autónoma de México. p 21
- Torres-Orozco BR (1991) Los Peces de México. AGT Editor, S. A. México. pp. 191.
- Tucker JW (1998) Marine fish culture. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, U.S.A. pp. 750.
- Uscanga-Martínez A, Álvarez-González CA, Contreras-Sánchez WM, Márquez-Couturier G, Civera-Cerecedo R, Nolasco-Soria H, Hernández-Llamas A, Goytortúa-Bores E, Moyano FJ (2012) Protein requirement in masculinized and non-masculinized juveniles of Bay snook *Petenia splendida*. *Hidrobiológica* 22(3): 220-229.

- Valtierra VMT, Schmitter SJJ (2000) Hábitos alimentarios de las mojarra (Perciformes: Cichlidae) de la laguna Caobas, Quintana Roo, México. *Revista Biología Tropical* 8: 2-3.
- Velasco RC (1976) Los Peces de Agua Dulce del Estado de Chiapas. Ediciones Gobierno Del Estado. México. pp. 154.
- Vidal LJM (2004) Masculinización de crías de la mojarra Tenguayaca *Petenia splendida* Günther, 1862 mediante bioencapsulado del esteroide 17 – Metiltestosterona en nauplios de *Artemia salina*. Tesis Profesional. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. pp. 53.
- Wang J, Jiang Y, Li X, Han T, Yang Y, Hu S, Yang M (2016) Dietary protein requirement of juvenile red spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Aquaculture* 450: 289–294
- Ye W, Han D, Zhu X, Yang Y, Jin J, Xie S (2017) Comparative study on dietary protein requirements for juvenile and pre-adult gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III). *Aquaculture nutrition* 23: 755–765.
- Yúfera M, Darias MJ (2007) The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture* 268: 53-63.
- Zacarias SM, Baro BS, Lazo JP (2012) Ontogeny and distribution of alkaline and acid phosphatases in the digestive system of California halibut larvae (*Paralichthys californicus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 39:1331–1339.

## II Justificación

Los Estados Unidos Mexicanos, es un país que por su ubicación geográfica posee sistemas hídricos importantes y amplia variedad de climas; trae consigo que exista una gran biodiversidad de especies acuáticas. La suma de todos estos factores, lo proyectan como un país con un enorme potencial para el desarrollo de la acuicultura. Sin embargo, la producción acuícola de México, se basa en muy pocas especies, siendo estas principalmente exóticas y/o introducidas. Por lo tanto, la importancia de generar información con nuevas especies de peces de origen nativo permitirá diversificar el catálogo de organismos con potencial acuícola.

Es por ello, que en este documento se planteó desarrollar varias investigaciones que permitirá conocer algunos aspectos básicos sobre la fisiología digestiva que contribuyan a mejorar el cultivo de cíclidos. Es bien conocido, que una de las etapas más delicadas durante el cultivo de los peces es la producción de larvas, es cuando el organismo es más susceptible a factores como la alimentación y nutrición, trayendo consigo afectaciones en la supervivencia y crecimiento de las larvas. Estos efectos, se hacen evidentes en especies que no tienen aún la capacidad de digerir algunos de los ingredientes que contienen los alimentos balanceados, debido a que no tienen completo su equipamiento enzimático y su tracto digestivo aún no está desarrollado. Por lo tanto, sus enzimas digestivas apenas empiezan a expresarse y a funcionar para digerir y posteriormente a absorber los nutrientes que los organismos necesitan para un desarrollo óptimo.

Otro de los puntos importantes es la capacidad digestiva de los peces. Es por ello, que se requiere determinar la eficiencia hidrolítica de las proteasas para entender los tipos y modos de acción, así como el nivel de actividad que presentan. De entre los muchos factores estudiados hasta la fecha en relación con el funcionamiento de las enzimas digestivas

(temperatura, salinidad, edad del pez, etc.) existen algunos que determinan en buena medida la hidrólisis resultante final de los sustratos y que no han sido hasta la fecha analizados con suficiente detalle. Este es el caso de:

- El tiempo de reacción; es decir el tiempo que permanecen en contacto las enzimas digestivas con los sustratos presentes en la ingesta. Este tiempo debe estar estrechamente ligado a la velocidad de tránsito digestivo.
- La relación E:S; que implica, la cantidad de enzima que se pone en contacto con una cantidad determinada de los sustratos correspondientes.

Es por ello, que el reto actual de la alimentación en peces es desarrollar alimentos balanceados a partir de los estudios de la fisiología digestiva, lo que contribuya a maximizar el rendimiento técnico de la producción, en sus diferentes etapas de crecimiento. Por otra parte, incrementar el rendimiento económico, mediante el desarrollo de los alimentos balanceados más adecuados desde una perspectiva tecnológica, considerando tanto el valor nutritivo como el coste, disponibilidad y facilidad de procesado de las diferentes materias primas, como uso de fuentes alternativas de proteína.

En este contexto, se destaca de manera especial

- las diferencias en la sensibilidad de las enzimas digestivas frente a los diversos inhibidores presentes en los ingredientes vegetales.

La función del sistema digestivo es el de actuar como interface de proceso entre el alimento y la asimilación de nutrientes en el organismo, dado que en él, se lleva a cabo la manipulación inicial que puede incluir la disminución del tamaño de partícula, la hidrólisis, la absorción y

transferencia de los nutrientes hacia el interior para su distribución en el cuerpo. De aquí se deduce la gran importancia de obtener un conocimiento detallado sobre la función digestiva. Consecuentemente, este proceso permitirá evaluar el empleo de harinas vegetales y animales a partir de la susceptibilidad de los sustratos a ser hidrolizados por acción de las enzimas digestivas (bioaccesibilidad) y la disponibilidad de los productos del resultado de la hidrólisis enzimática potencialmente absorbibles a nivel intestinal para sus funciones fisiológicas (biodisponibilidad). Por lo tanto, la evaluación de estas fuentes alternativas permitirá la inclusión a nuevas formulaciones y fabricación de dietas balanceadas altamente digestible con el objetivo de reducir el aporte de desechos nitrogenados y crear alimentos amigables al medio ambiente, además de mejorar el crecimiento y la supervivencia de los organismos en cultivo.

### III Objetivos

#### 3.1 General

Estudiar la bioquímica digestiva en tres especies de cíclidos del Sureste de México: tenguayaca (*P. splendida*), castarrica (*M. urophthalmus*) y tilapia del Nilo (*O. niloticus*), que permitan la optimización de las fórmulas y pautas de alimentación de dichas especies para mejorar el cultivo.

#### 3.2 Específicos

1.-Caracterizar la presencia de enzimas digestivas en larvas.- Se determinó los cambios en la actividad enzimática digestiva tipo pepsina, tripsina, quimotripsina, aminopeptidasa, lipasa, amilasa y fosfatasa involucradas en la ontogenia inicial; así como el efecto de varias condiciones ambientales (pH y temperatura) e inhibidores y la caracterización enzimática a través de análisis electroforéticos sobre las proteasas presentes en los extractos multienzimáticos de la tenguayaca (*P. splendida*).

2.- Determinar la velocidad de tránsito digestivo.- Se estableció la velocidad con la que transita el alimento por el interior del tubo digestivo para estimar el tiempo de acción de las enzimas digestivas (tripsina y quimotripsina) en contacto con los sustratos correspondientes. Este estudio se llevó a cabo con juveniles de tilapia del Nilo (*O. niloticus*).

3.- Evaluar el efecto de harinas de origen vegetal como inhibidores de proteasas en los cíclidos.- Se evaluó los efectos de inhibidores de proteasas en diferentes fuentes proteicas de origen vegetal (soja, trigo, sorgo y salvado de trigo) sobre la actividad de las proteasas digestivas de *P. splendida*, *M. urophthalmus* y *O. niloticus*.

4.- Evaluar la digestibilidad in vitro de fuentes alternativas de proteínas de origen animal y vegetal.- Se determinó la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de diferentes fuentes proteicas de origen animal y vegetal, por medio de estudios in vitro simulando la digestión gástrica e intestinal para su inclusión en el diseño de alimentos especializados durante el cultivo de los cíclidos.

## IV. Cambios en la actividad de las enzimas digestivas en la ontogenia inicial de la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*).

A. Uscanga-Martínez<sup>1</sup>, N. Perales-García<sup>2</sup>, C. A. Álvarez-González<sup>2</sup>, F. J. Moyano<sup>1</sup>, D. Tovar-Ramírez<sup>3</sup>, G. E. Gisbert<sup>4</sup>, G. Márquez-Couturier<sup>2</sup>, W. M. Contreras-Sánchez<sup>2</sup>, L. Arias-Rodríguez<sup>2</sup>, J. R. Indy<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biología Aplicada, Escuela Politécnica Superior, La Cañada de San Urbano, Universidad de Almería, 04120 Almería, España

<sup>2</sup>Laboratorio de Acuicultura Tropical, DACBIOL, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa Cárdenas km 0.5, 86139 Villahermosa, Tabasco, México

<sup>3</sup>Laboratorio de Bioquímica, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, 23090, La Paz, B.C.S., México

<sup>4</sup>IRTA, Sant Carles de la Rápita, Crta. Poble Nou km 5.5, 43540 Sant Carles de la Rapita (Tarragona), España

Este capítulo ha sido publicado en *Fish Physiology and Biochemistry* (2011) 37:667–680

### 4.1 Resumen

Las muestras de las larvas de *P. splendida* fueron obtenidas desde huevos hasta los 60 días después de la eclosión (DDE). La actividad de las proteasas ácidas y alcalinas, tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa,  $\alpha$ -amilasa, lipasa y fosfatasa alcalina fueron determinadas a partir de técnicas bioquímicas. Posteriormente, se realizaron zimogramas con la técnica SDS-PAGE para determinar las proteasas ácidas y alcalinas con la finalidad de identificar las isoformas presentes durante la ontogenia inicial. Las proteasas alcalinas y quimotripsinas se detectaron desde el momento de la eclosión e incrementando su actividad gradualmente hasta alcanzar su máximo valor a los 35 días después de la eclosión (DDE). Por lo tanto, las actividades de tripsina y leucina aminopeptidasa presentaron valores bajos durante la eclosión y estas fueron aumentando gradualmente con el crecimiento de las larvas. El zimograma de las proteasas alcalinas presentó cuatro isoformas, en los diferentes días del cultivo, a partir de la eclosión hasta el final del larvicultivo (95.2 kDa a los 11 DDE, 26.4 kDa a los 9 DDE, 21.4 kDa a los 3 DDE, y 23.5 kDa a partir del día 1 DDE). La actividad de la pepsina se expresó a los 7 DDE y aumento progresivamente hasta el final del larvicultivo. El zimograma para las proteasas ácidas presentó únicamente un zimógeno (0.65 rf), esta apareció a partir de los 6 DDE. La actividad de las lipasas presentó un valor alto desde el momento de la eclosión y fueron en incremento hasta los 15 DDE, posteriormente su actividad se fue reduciendo paulatinamente. La actividad enzimática de la amilasa mostró altos valores desde el inicio hasta los 15 DDE, para ir disminuyendo paulatinamente. Las fosfatasas ácidas y alcalinas mostraron una alta actividad desde la etapa embrionaria, disminuyendo ligeramente durante la primera alimentación. Sin embargo, entre los 20 al 30 DDE mostraron un aumento de actividad. Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que las larvas pueden ser alimentadas con dietas artificiales a partir del día 10 después de la eclosión.

Palabras claves:  $\alpha$ -amilasa, tenguayaca, larvicultivo, lipasa, *Petenia splendida*, fosfatasa, proteasas, zimograma.

### 4.2 Introducción

El cultivo de peces en México es una actividad reciente; sin embargo, ha sido sustentada desde sus inicios por el cultivo de peces introducidos como la tilapia (*Oreochromis niloticus*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) entre otras y a través de la transferencia de sus tecnologías, lo cual ha provocado que el desarrollo de las especies de peces nativos sea incipiente. Desde hace más de diez años el interés por desarrollar el cultivo de especies nativas del Sureste de México ha ido en aumento, sobre todo para organismos de alto valor comercial y con potencial para su cultivo. La tenguayaca (*Petenia splendida*, Günther, 1862) la cual tiene una alta demanda en el mercado, presenta buen crecimiento, tiene carne de excelente calidad, y resiste altas densidades; pero está siendo fuertemente explotada, poniendo en riesgo las poblaciones naturales (Reséndez et al., 1983; Chávez et al., 1989; Caro et al., 1994; Santiago et al., 1997; Valtierra y Schmitter 2000). Por estas razones, se han estudiado diversos aspectos que van desde la reproducción controlada, el desarrollo embrionario y cultivo de larvas, el desarrollo de sistemas acuícolas, la masculinización, manejo de fotoperiodo, temperatura y requerimientos nutricionales para esta especie (Contreras et al., 2003; García, 2003; Chan, 2004; Jiménez, 2004; Martínez, 2004; Vidal, 2004; Uscanga, 2006; Guerrero, 2007; Jiménez, 2007), por lo que se ha logrado cerrar el cultivo a una escala experimental. Sin embargo, aunque actualmente se logra el larvicultivo utilizando nauplios de *Artemia* y alimento comercial para truchas, se desconoce si estos alimentos son los adecuados para esta etapa del cultivo ya que no se han realizado los estudios básicos en torno a la fisiología digestiva de *P. splendida*.

De esta manera, si se quiere optimizar la producción de juveniles para etapas posteriores del cultivo se necesita realizar los estudios sobre el desarrollo de las enzimas digestivas durante las primeras etapas de vida (Divakaran et al., 1999), lo que permitiría establecer protocolos más adecuados para el manejo de las larvas e implementar estrategias para lograr la sustitución adecuada del alimento vivo por alimento artificial diseñado para este periodo de desarrollo (Moyano et al., 1996). Recientemente, se han realizado estudios en otras especies que han permitido mejorar el crecimiento y la supervivencia larvaria a través de la capacidad digestiva durante la ontogenia inicial. En este aspecto, los primeros estudios se enfocaron en el conocimiento del desarrollo de las enzimas digestivas (proteasas, amilasas, lipasas, fosfatasas), las cuales han sentado las bases para desarrollar alimentos específicos para las especies como dorada (*Sparus aurata*), corvina europea (*Dicentrarchus labrax*), carpa común (*Cyprinus carpio*), y tilapia (*O. niloticus*) (Moyano et al., 1996; Cahu et al., 2004; Drossou et al., 2006, Yanbo y Zirong, 2006;). Actualmente, se han realizado varios estudios para relacionar la presencia de las enzimas digestivas con los aspectos fisiológicos y nutricionales en truchas (*O. mykiss*), lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) manjuarí (*Atractosteus tristoechus*), peje rey cola amarilla (*Seriola lalandi*), bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), lenguado de California (*Paralichthys californicus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*), lucioperca (*Sander lucioperca*) (Furnè et al., 2005; Almeida et al., 2006; Álvarez-González et al., 2006; Ben et al., 2006; Bolasina et al., 2006; Brien–MacDonald et al., 2006; Comabella et al., 2006 Hamza et al., 2007). De esta forma, este trabajo tiene como objetivo determinar la actividad enzimática durante la ontogenia inicial de *P. splendida*.

### 4.3 Materiales y Métodos

#### 4.3.1 Obtención de crías

Se obtuvieron un total de 7,500 embriones a partir de dos desoves simultáneos del lote de reproductores de *P. splendida* que fueron mantenidos en el Laboratorio de Acuicultura Tropical de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (DACBIOL-UJAT). Después de la eclosión (3 días post-fertilización) los eleutero embriones fueron colocados en un tanque de plástico de 1,000 L de capacidad ( $7.5 \text{ larvas L}^{-1}$ ) conectados a un sistema abierto. Diariamente se midió la temperatura ( $29 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), el oxígeno disuelto ( $6.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) con un oxímetro digital (YSI 55, Yellow Springs Industries, Yellow Springs, OH, USA) y el pH (7,4) con un potenciómetro digital (Denver Instruments, UB-10, Arvada, CO, USA) durante el larvicultivo, hasta el día 60 los parámetros se midieron a las 10:00 a.m. Las larvas con 3 días post-eclosión (con la boca abierta) fueron alimentadas diariamente a saciedad aparente cuatro veces al día (8:00, 12:00, 16:00 y 18:00 h) utilizando nauplios de *Artemia* ( $5.5 \text{ nauplios mL}^{-1}$ , INVE Aquaculture Nutrition) hasta los 21 días después de la eclosión (DDE), posteriormente fueron alimentadas tres veces al día (8:00, 14:00 y 20:00 h) con alimento para trucha (Silver Cup, 45% de proteína y 16% de lípidos) hasta los 60 DDE.

#### 4.3.2 Método de muestreo

El número de organismos colectados fue de 500 embriones para el día 0; a partir de la post-eclosión y hasta el día 60 se colectaron 100 organismos. La toma de muestra se realizó con una red de  $500\text{-}\mu\text{m}$  los días 0, 3, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45 y 60 post-eclosión. Posteriormente, las larvas fueron sacrificadas con una sobredosis de metasulfonato de tricaina (MS-222 Argent, Redmond, WA, USA). A continuación, fueron lavados con agua destilada y almacenadas a

-20 °C hasta su procesamiento y análisis. Adicionalmente, para un periodo similar al antes señalado, se tomaron 10 larvas que fueron fijadas en formol al 4% amortiguada con boratos para evaluar el crecimiento en peso húmedo individual por medio de una balanza analítica (Sartorius AG, Gottingen, Germany; precisión de  $1 \times 10^{-4}$  g).

### 4.3.3 Análisis bioquímico

Las muestras de embriones y larvas hasta los 11 DDE fueron procesadas enteras, las larvas del día 13 hasta los 25 DDE fueron disectadas para obtener el paquete visceral cortando la cabeza, cola y parte dorsal del cuerpo, a las larvas del día 27 hasta los 60 DDE se les extrajeron únicamente el estómago y el intestino, esto por triplicado. Todas las muestras fueron homogeneizadas en la solución buffer de Tris-HCl 50 mmol, pH 7.5 ( $15 \text{ mg mL}^{-1}$ ) y centrifugadas ( $16,000 \times g$  por 5 min a 5 °C), el sobrenadante fue recuperado, separándolo en alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  y se congelaron a -20 °C para el análisis enzimático. La concentración de proteína soluble se evaluó por la técnica de Bradford, (1976) usando como patrón una curva estándar de albúmina bovina sérica.

La actividad de proteasas alcalinas fueron medidas por la técnica descrito por Walter (1984), usando caseína (0.5%) como sustrato en la solución amortiguadora Tris-HCl 50 mmol, pH 9,0. La actividad de proteasas ácidas se determinó por la técnica de Anson (1938), usando hemoglobina (0.5%) en una solución amortiguadora glicina-HCl 100 mmol. pH 2.0. La mezcla de reacción en ambas técnicas fue incubada a 37 °C y las reacciones se detuvieron agregando una solución al 20% de ácido tricloracético (TCA). Los péptidos liberados se midieron a 280 nm para ambas técnicas. Una unidad de actividad enzimática fue definida como 1  $\mu\text{g}$  de tirosina liberada por minuto, usando el coeficiente de extinción molar (CEM) de 1,290. La actividad tripsina se midió a 25 °C bajo la técnica descrita por Erlanger et al., (1961) usando el sustrato BAPNA (N- $\alpha$ -benzoyl-DL-arginina p-

nitroanilida) disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) 10 mmol y en una solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mmol, 10 mmol de  $\text{CaCl}_2$ , pH 8.2. La actividad de la quimotripsina se midió a 25 °C siguiendo el protocolo de Del Mar et al., (1979) con el sustrato específico SAAPNA (N-succinyl-ala-ala-pro-phe p-nitroanilida) disuelta en DMSO 10 mmol y solución amortiguadora Tris-HCl 100 mmol, 10 mmol  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.8. La actividad de la enzima leucina aminopeptidasa se evaluó a 25 °C con el protocolo de Maraux et al. (1973) usando la solución amortiguadora fosfato de sodio 50 mmol, pH 7.2 y el sustrato leucina p-nitroanilida (0.1 mmol disuelta en DMSO). Las reacciones en todas las técnicas anteriormente descritas fueron detenidas con 30% de ácido acético. La actividad enzimática se definió como 1  $\mu\text{g}$  de nitroanilida liberado por minuto, utilizando el coeficiente de extinción molar de 8,800 para la tripsina, quimotripsina y leucina aminopeptidasa con base en la absorbancia a una longitud de onda de 410 nm.

El ensayo de  $\alpha$ -amilasa fue realizado con el protocolo de Somoyi-Nelson descrito por Robyt y Whelan (1968) usando almidón (2%) como sustrato disuelto en una solución amortiguadora de fosfato-citrato 100 mmol, NaCl 50 mmol pH 7.5. Midiendo la actividad a 25 °C, con base en la absorbancia a 600 nm. Se definió una unidad como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{g}$  de maltosa por minuto. La actividad lipasa fue cuantificada a 25 °C de acuerdo a Versaw et al. (1989), usando una solución amortiguadora Tris-HCl 50 mmol pH 7.2 y solución de tauricolato de sodio (100 mmol). El sustrato utilizado fue el  $\beta$ -naftil caprilato (200 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) deteniendo la reacción con una solución de TCA (0.72 N). Para revelar la reacción se utilizó la solución de fast blue (100 mmol), clarificando la reacción con una solución de etanol: acetato de etilo (1:1 v/v). Una unidad de actividad fue definida como la liberación de 1  $\mu\text{g}$  de naftol por minuto evaluada a 540 nm, usando una curva estándar de naftol. Las actividades de fosfatasa ácida y alcalina fueron medidas a 25 °C de acuerdo con la metodología de Begmeyer, (1974) incubando los extractos

en una solución al 2% de 4-nitrofenil fosfato en una solución amortiguadora de ácido cítrico/citrato (1:1 P/P) pH 5.5. La reacción fue detenida adicionando una solución de NaOH (0.05 N) y la Absorbancia se midió a 405 nm. Una unidad de actividad fue definida como la liberación de 1 µg de 4-nitrofenol por minuto utilizando el coeficiente de extinción molar de 18,000.

La actividad de los extractos fue determinada usando las siguientes ecuaciones: 1) Unidad por mL = ( abs x volumen final de la reacción (mL)) / (CEM x tiempo (min) x volumen del extracto (mL)); 2) Unidades por mg de proteína = Unidades por mL / mg de proteína soluble); 3) Unidades por larva = Unidades por mL / No. de larvas por mL. El abs es determinado por la longitud de onda de cada técnica y el CEM es el coeficiente de extinción molar del producto de reacción. Los resultados se presentan de acuerdo con las ecuaciones 2 y 3. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### 4.3.4 Zimograma de proteasas

Previo a la realización de los zimogramas para proteasas alcalinas, se realizaron electroforesis de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (usando dodecil sulfato de sodio) de manera discontinua siguiendo el protocolo de Laemmli et al. (1970), usando un gel almacenador al 4% y un gel de corrimiento al 10%. Las electroforesis se realizaron en la cámara electroforetica Mini PROTEAN III (Bio-Rad) con dos placas de geles verticales de 8×10×0.075 cm. con capacidad para 20 muestras por electroforesis. Las muestras fueron preparadas para los zimogramas de proteasas alcalinas de acuerdo con lo descrito por García-Carreño et al. (1993) por medio de un corrimiento de 60 min a 100 V por gel a 5 °C. Después de la electroforesis los geles fueron enjuagados con agua destilada e incubados por 30 min a 5 °C con una solución de caseína tipo Hammerstein al 5% a pH 9. Los geles fueron incubados por 90 min en

la misma solución a 37 °C sin agitación. Finalmente, los geles fueron fijados con una solución de TCA al 12% y teñidos con solución 0,1% de azul brillante de Coomassie R-250, metanol, ácido acético y agua (50:20:50) por 1 h para después ser desteñidos con metanol-ácido acético-agua (35:10:55). Las zonas claras indican la presencia de proteasas alcalinas después de un periodo de 24 h.

Para el análisis de proteasas ácidas en los extractos larvarios, se realizó una electroforesis de poliacrilamida continua en condiciones nativas (10%) de acuerdo con el protocolo de Williams y Reisfeld (1964). Las condiciones de las electroforesis fueron realizadas a 100 V y 64 mA por gel. Para revelar las isoformas de las proteasas ácidas, se siguió el procedimiento de Díaz-López et al. (1998) usando solución de pepsina porcina ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , Sigma, 2,500-3,500 U mg de proteína<sup>-1</sup>) como enzima de referencia a una concentración de 30 µg de proteína por pocillo. Una vez realizada la electroforesis, los geles fueron removidos de la cámara y enjuagados con HCl 0.1 mol L<sup>-1</sup> a pH 2.0 para activar las proteasas ácidas y a los 15 min, los geles fueron incubados por 30 min a 4 °C en hemoglobina 0.25% en una solución amortiguadora de Glicina-HCl 100 mmol pH 2.0; luego de 90 min se les colocó la misma solución y se realizó la incubación final a 37 °C. Los geles fueron enjuagados en agua destilada y fijados con TCA al 12% por 15 min. Los procedimientos mencionados se siguieron para revelar las bandas de actividad de las proteasas ácidas.

### 4.3.5 Cálculos del Rf y pesos moleculares

Se utilizó un marcador de pesos moleculares de bajo rango (LRMWM) que fue aplicado para cada SDS-PAGE agregando 5 µL por pocillo. El LRMWM contiene las siguientes proteínas como marcadores: fosforilasa b (97 kDa), albúmina bovina sérica (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa) e inhibidor trípico de soya (20 kDa). La electromobilidad relativa (Rf) fue calculada para

todos los zimogramas (Igbokwe y Downe 1978) y el peso molecular (MW) de cada banda con actividad de proteasa alcalina fue calculado como el ajuste lineal entre el Rf y el logaritmo decimal de los pesos moleculares de las proteínas usadas como marcadores usando el programa Quality One V 4.6.5 (Hercules, CA).

### 4.3.6 Análisis estadísticos

Se utilizó un modelo de crecimiento exponencial para la evaluación del crecimiento larvario con la expresión  $y=e^{ax}$  donde  $y$ = peso fresco individual,  $e$  = base exponencial,  $a$ = tasa de crecimiento y  $x$ = edad en días de la larva. La evaluación de los parámetros del modelo se realizó por medio de interacciones Mardquat. El modelo se llevó a cabo utilizando el software Statistica v. 8.0 (software de análisis, Arizona, USA.).

### 4.4 Resultados

El crecimiento en peso de las larvas de *P. splendida* durante los primeros 42 días de cultivo, fue constante y a partir del día 45 hasta el 60 DDE fue más acelerado hasta alcanzar el peso máximo de 90 mg larva<sup>-1</sup>. En el modelo exponencial se observó alta correlación ( $r= 0.96$ ) mostrando una tasa de crecimiento de 0.076 mg día<sup>-1</sup> durante los 60 días de larvicultivo (Figura 1).

La actividad específica de proteasas alcalinas (Figura 2a) se detectó a partir de la absorción del vitelo (3 días DDE), incrementándose ligeramente para primeros 11 DDE, permaneciendo relativamente constante hasta los 27 DDE, a partir del día 30 y hasta los 36 DDE se muestra la máxima actividad, decayendo abruptamente para el día 42 y manteniéndose constante hasta los 60 DDE, este mismo patrón fue observado para la actividad individual de proteasas alcalinas (Figura 2b). La actividad específica de las proteasas ácidas mostró niveles bajos desde el embrión hasta la absorción de vitelo hasta los 6 DDE, para

incrementarse a partir de los 9 DDE y permanecer fluctuante durante los 60 días de cultivo, siendo los 21 DDE el que mostró la máxima actividad (Figura 2c).

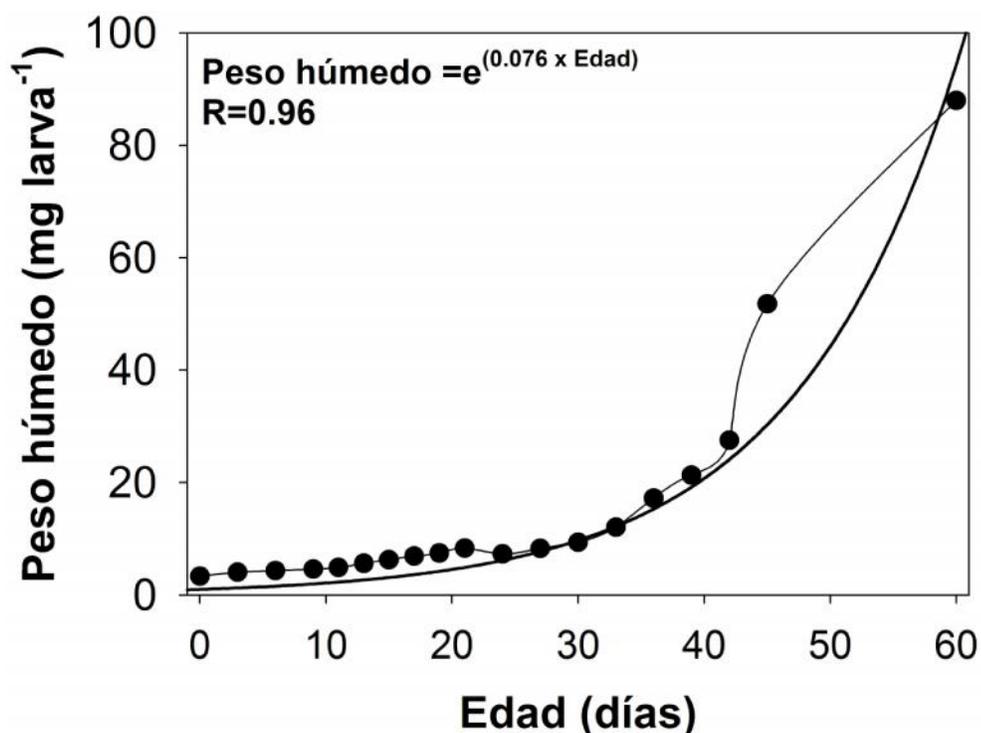


Figura 1.- Promedio del peso húmedo (mg larva<sup>-1</sup> ± desviación estándar, n= 3) de las larvas de tenguayaca *P. splendida* durante su larvicultivo.

La actividad individual de las proteasas ácidas mostró bajos niveles desde la eclosión hasta los primeros 6 DDE a partir del día 9 y hasta los 60 DDE se incrementó de forma constante hasta alcanzar el máximo valor a los 60 DDE (Figura 2d). La actividad específica de tripsina fue detectada en niveles bajos desde el embrión hasta los 24 DDE incrementando ligeramente para los 27 DDE, para volver a decaer a partir de este día hasta los primeros 42 DDE, para un nuevo incremento rápidamente hasta alcanzar su máxima actividad a los 60 DDE (Figura 2e). Este mismo patrón fue observado para la actividad individual de tipo tripsina donde la máxima actividad se detectó para los 60 DDE (Figura 2f). Para la actividad específica de tipo quimotripsina se observó un patrón similar al de

proteasas alcalinas específicas donde a partir de los 9 DDE, se detectó un ligero aumento de la actividad manteniéndose relativamente constante hasta los 24 DDE, alcanzando su máxima actividad de forma acelerada para los 30 DDE y decayendo paulatinamente a partir del día 33 hasta los 60 DDE (Figura 2g). La actividad individual de quimotripsina mostró valores bajos desde los 9 días hasta los 24 DDE, incrementándose gradualmente hasta los 42 DDE, con una ligera caída para los 45 DDE y observándose el máximo valor de actividad para los 60 DDE (Figura 2h). La actividad específica de leucina-aminopeptidasa muestra un patrón relativamente constante desde el embrión hasta los primeros 42 DDE, incrementándose de forma acelerada para los 45 DDE y manteniéndose constante hasta los 60 DDE (Figura 2i). Finalmente, la actividad individual de esta misma enzima mostró un patrón similar que la actividad específica donde a los 45 y 60 DDE mostraron los valores más altos (Figura 2j).

La actividad específica de la lipasa (Figura 3a) se detectó desde el embrión, siendo muy fluctuante desde el día 9 hasta los 27 DDE, con una caída para los 30 DDE y nuevamente un aumento en la actividad de forma similar a los días previos alcanzando su máxima actividad para los 39 DDE y decayendo rápidamente para los 42 DDE y finalmente aumentando ligeramente para los 60 DDE. En cuanto a la actividad individual de las lipasas, se observa un comportamiento similar al de las lipasas específicas, con la diferencia que el día de la máxima actividad fue detectado a los 60 DDE (Figura 3b). La actividad específica de la  $\alpha$ -amilasa fue detectada desde el embrión con un ligero incremento de los niveles hasta los 13 DDE, para decaer entre los días 15 al 19 DDE, alcanzando su máximo valor para los 21 DDE, manteniéndose constante hasta los 36 DDE y después decaer rápidamente a los 60 DDE (Figura 3c). En el caso de la actividad individual de la  $\alpha$ -amilasa, muestra una baja actividad desde el embrión hasta los 33 DDE, incrementándose rápidamente entre los días 39 al 42 DDE, para después mostrar una caída

en la actividad a los 45 DDE y volver a incrementarse para los 60 DDE (Figura 3d).

Las actividades específica e individual de fosfatasa alcalina (Figura 3e y f) muestran un mismo patrón de actividad, donde se observa que desde el embrión se detectó alta actividad, para decaer gradualmente hasta los primeros 9 DDE y nuevamente incrementarse para los 21 DDE, observándose en este día el primer pico de máxima actividad, decayendo nuevamente para los 30 DDE y volver a aumentar hasta alcanzar el segundo pico de máxima actividad para el día 36 DDE y volver a decaer, manteniéndose constante hasta los 60 DDE.

Finalmente, la actividad específica e individual de fosfatasas ácidas, muestran patrones similares en los cambios de la actividad, donde se observa que un aumento continuo desde el embrión hasta alcanzar un primer pico de alta actividad para los 11 DDE, decayendo rápidamente para los 15 DDE y manteniendo bajos niveles de actividad hasta los 33 DDE, donde nuevamente se observa un aumento hasta alcanzar el segundo pico de máxima actividad a los 36 DDE y decaer a niveles constantes desde ese día hasta el día 60 DDE (Figura 3g y h).

El zimograma de proteasas alcalinas muestra la presencia de una banda (23.5 kDa) a partir del día 1 DDE, una segunda banda (21.4 kDa) a partir del día 3 hasta el 6 DDE, se expresó una tercera banda (26.4 kDa) para el día 9 DDE y finalmente, a partir del día 11 en adelante se mostró una cuarta banda con actividad (95.2 kDa) que se mantiene sin cambios hasta los 60 DDE (Fig. 4a). En el caso del zimograma para proteasas ácidas, se observa la presencia de una sola banda ( $R_f = 0.65$ ) con actividad proteolítica a partir de los 6 DDE, la cual cambia en intensidad, pero permanece durante el resto de los días de muestreo (Fig. 4b).

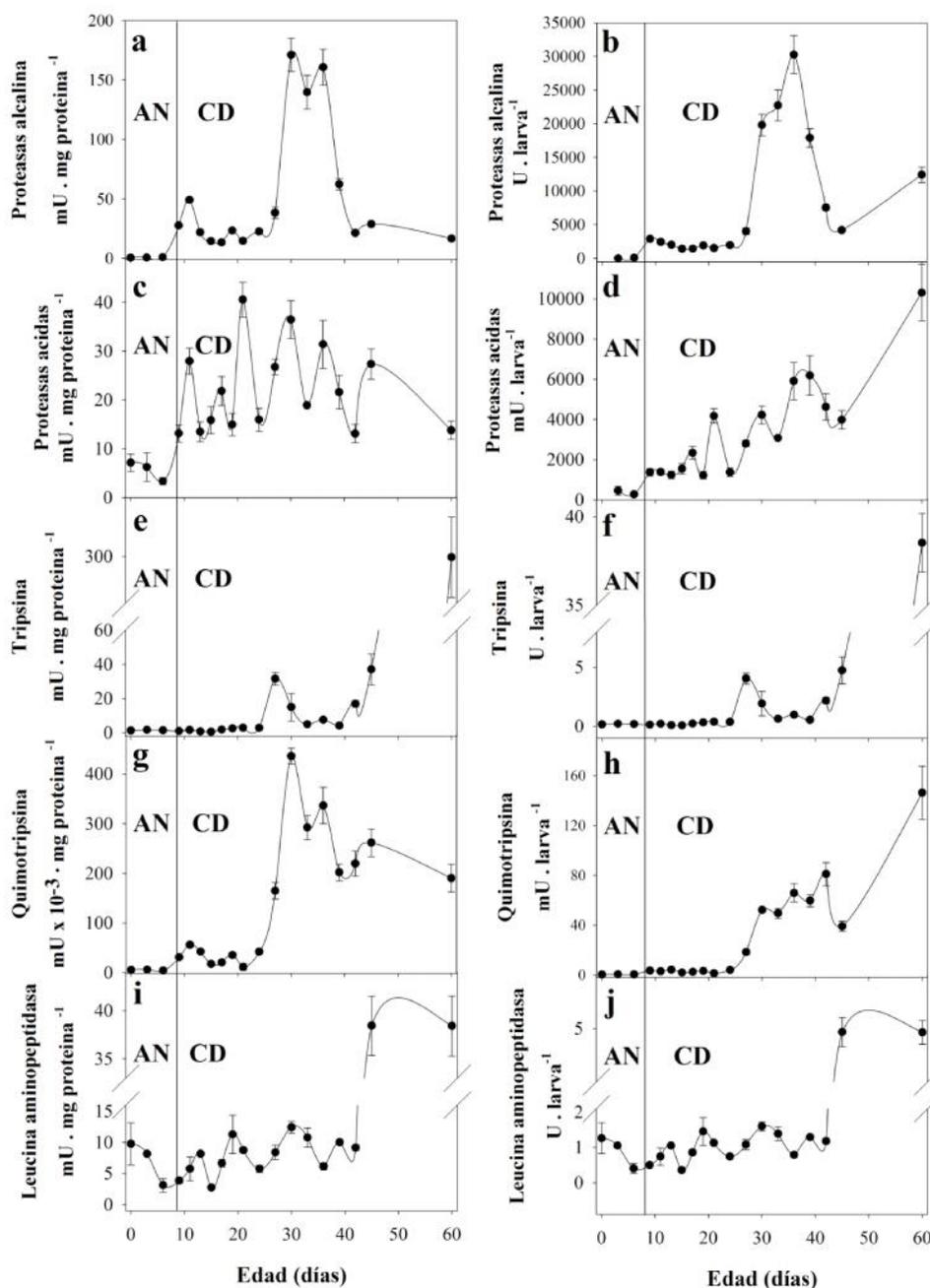


Figura 2.- Actividad enzimática digestiva de proteasas durante la ontogenia inicial de tenguayaca (promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n= 3$ ). (a) Actividad proteasa alcalina específica, (b) actividad individual de proteasa alcalina, (c) actividad específica de proteasa ácida, (d) actividad individual de proteasa ácida, (e) actividad específica de tripsina, (f) actividad individual de tripsina, (g) actividad específica de la quimotripsina, (h) actividad individual de la quimotripsina, (i) actividad específica de la leucina-aminopeptidasa (j) actividad individual de la leucina-aminopeptidasa.

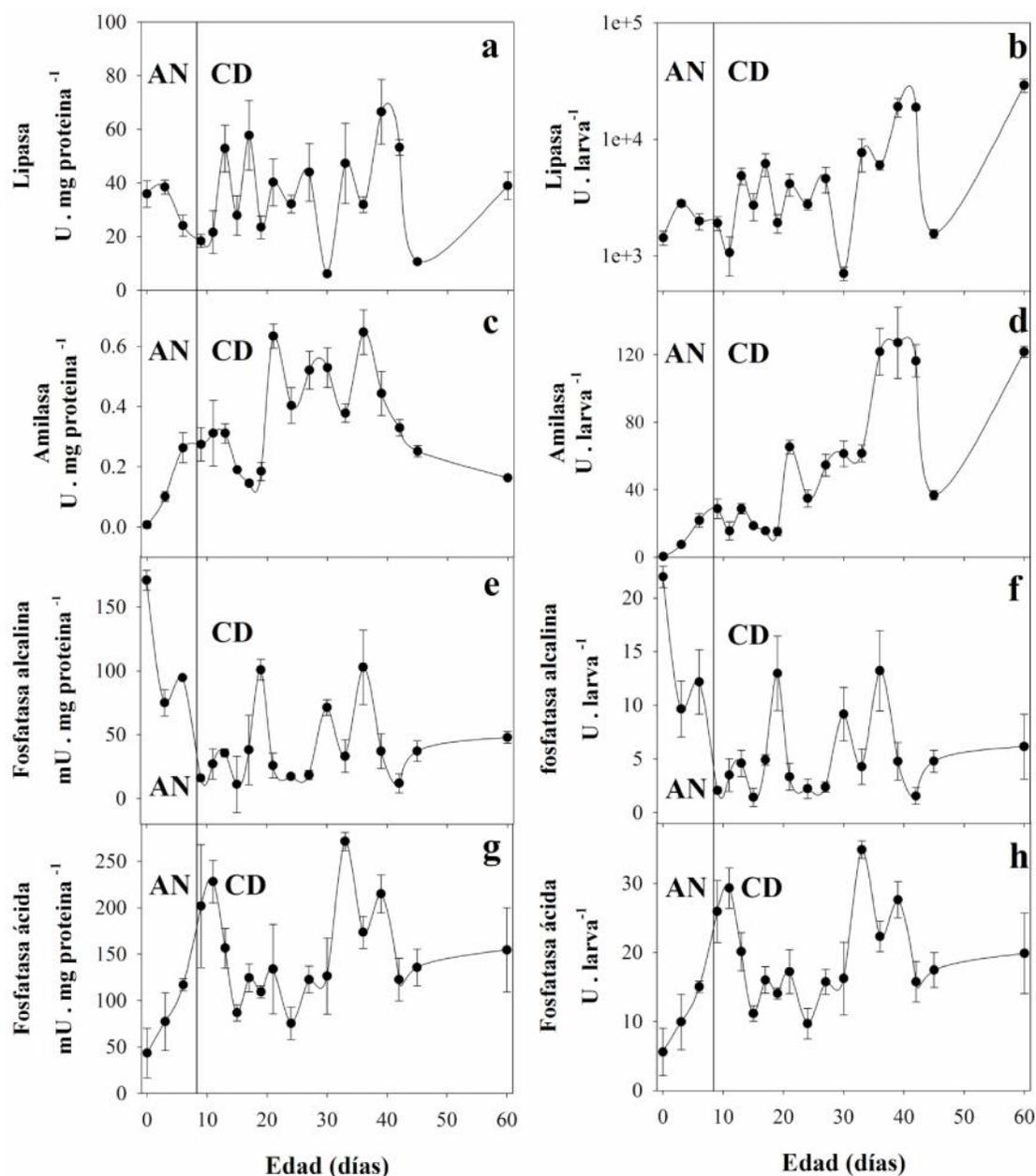


Figura 3.- Actividad enzimática digestiva durante la ontogenia inicial de tenguyaca (promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n=3$ ). (a) Actividad específica de la lipasa, (b) actividad individual de la lipasa, (c) actividad específica de la  $\alpha$ -amilasa, (d) actividad individual de la  $\alpha$ -amilasa, (e) actividad específica de fosfatasas alcalinas, (f) actividad individual de fosfatasas alcalinas, (g) actividad específica de fosfatasas ácidas, (h) actividad individual de fosfatasas ácidas.

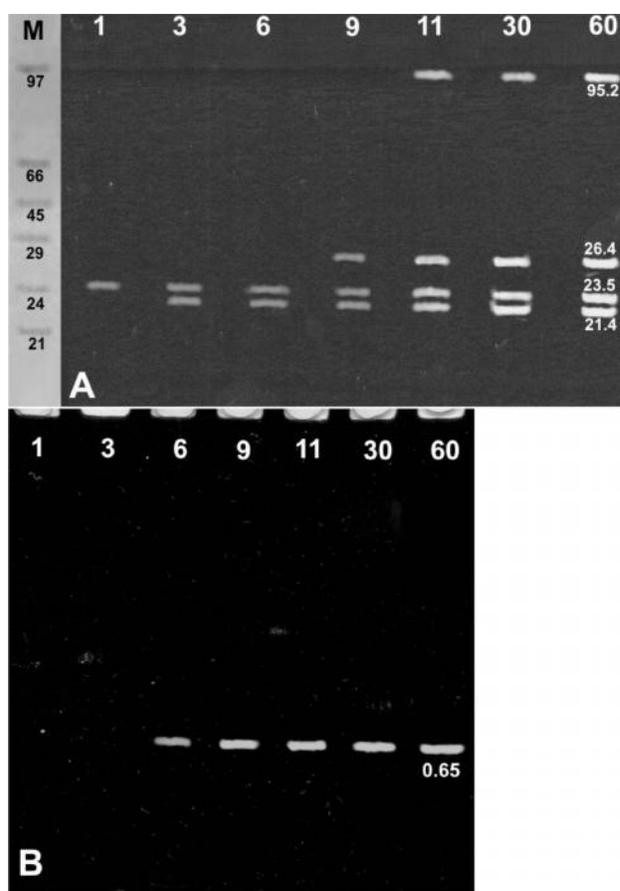


Figura 4.- Zimogramas de las proteasas digestivas durante el desarrollo larvario de la tenguayaca. (a) SDS-PAGE para proteasas alcalinas. M: Marcador de pesos moleculares. Albúmina bovina sérica (66 kDa); albúmina de huevo (43 kDa); Anhidrasa carbónica (29 kDa); tripsinógeno (24 kDa); inhibidor trípico de soya (20 kDa). (b) PAGE para proteasas ácidas.

## 4.5 Discusión

### 4.5.1 Crecimiento

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la *P. splendida* presenta un crecimiento relativamente lento, similar al observado en otras especies como en *P. olivaceus*, donde el crecimiento de las larvas es lento hasta los 27 DDE, el contenido de proteína soluble presenta un período de estancamiento entre los 27 y 33 DDE que incrementa su actividad enzimática máxima cuando la metamorfosis se inicia (asentamiento). De

igual manera, fue reportado para larvas de *S. lalandi*, donde el crecimiento en peso es lento durante los primeros 36 DDE, incrementándose cuando las larvas sufren cambios morfológicos para transformarse a juvenil (Bolasina et al. 2006; Ben et al. 2006). Estos cambios pueden ser causados por el tipo de alimentos suministrados (alimentos vivos o artificiales); sin embargo, hay otros factores que pueden afectar el crecimiento, incluyendo el tamaño de la partícula suministrada, la calidad del agua, la composición química de los alimentos o el balance nutricional, la cantidad de alimentos suministrados durante el día, y la aparente actividad de las enzimas digestivas durante la ontogenia inicial.

### 4.5.2 Actividad de las proteasas alcalinas

Las proteasas alcalinas en larvas de *P. splendida* están presentes desde el momento de la eclosión, incrementado su actividad a partir de los 11 DDE y alcanza su máxima actividad a los 30 DDE, lo que sugiere que las proteasas alcalinas producidas por un aparato digestivo funcional están presentes en el momento de la eclosión, esta capacidad aumenta progresivamente hasta alcanzar su nivel óptimo a los 30 DDE, cuando los organismos están completamente formados. Esta actividad en las proteasas alcalinas es similar en larvas de otros peces, cuando la digestión en el intestino tiene lugar gracias a la acción complementaria de las hormonas secretadas en el intestino por la pared intestinal o las glándulas, tales como el hígado y el páncreas. Esto se registró en *A. trisioechus* en el que la actividad de las proteasas alcalinas se detectó a partir de los 8 DDE, en el caso de larvas de carpa de la india (*Catla catla*), se logró cuantificar las enzimas proteolíticas del intestino inferior durante la ontogenia inicial, probando tres tipos de alimentos se observó que la actividad enzimática aumentaba con el tipo de alimento y la edad manifestando un incremento significativo de las proteasas alcalinas a partir de los primeros 9 DDE alcanzando su pico máximo de actividad

hasta el día 26 DDE. Asimismo, en las larvas de *S. senegalensis*, la actividad de las enzimas digestivas alcalinas se expresó entre los 2 y 18 DDE seguido de una disminución de su actividad (Ribeiro et al., 1999; Kumar et al., 2000; Comabella et al., 2006). Debido a esto, se considera que la capacidad para digerir alimentos ricos en proteínas es alta en esta especie, principalmente debido a la presencia de enzimas como la tripsina, quimotripsina, aminoácidos y leucina aminopeptidasa que son capaces de hidrolizar proteínas complejas, y por lo que, los péptidos libres y aminoácidos son absorbidos rápidamente por los enterocitos que ayudan a completar el desarrollo del pez (desarrollo de escamas, espinas, piel, etc.), lo cual concluye con el desarrollo de un estómago funcional (Lazo et al., 2007).

En el caso de *P. splendida* la presencia de tripsina y la quimotripsina se muestran en niveles muy bajos a partir de los primeros 11 DDE alcanzando su máxima actividad entre los días 25 y 40 DDE, lo cual es similar a lo observado en especies como la *O. niloticus*, salmonete de roca (*Pseudupeneus maculatus*), *S. lalandi* y *P. erythrinus*, donde las actividades de tripsina y quimotripsina se manifiestan entre los días 3 y 15 DDE alcanzando su máxima actividad entre los días 20 y 36 DDE para la tripsina y para la quimotripsina la actividad inicia entre los días 10 y 15 DDE alcanzando su máximo nivel entre los días 20 y 24 DDE (Drossou et al., 2006; Chen et al., 2006; Suzer et al., 2006; Souza et al., 2007). Uno de los aspectos que debe considerarse es que durante los primeros días después de la eclosión la actividad de la tripsina es baja presentando una digestión limitada de proteínas y un crecimiento relativamente lento de las larvas, que pueden ser causados por el tipo de alimentos suministrados (en vivo y alimentos artificiales). Esto es respaldado por el hecho de que la digestión de proteínas requiere de la acción combinada de varios tipos de enzimas, incluyendo la endoproteasas (principalmente tripsina y quimotripsina) y exopeptidasas (amino y carboxipeptidasas). Sin embargo, para una acción maximizada de estas enzimas digestivas se

requiere que sus zimógenos deban ser activados al mismo tiempo. En este sentido, el control coordinado se consigue por acción de la tripsina como el activador común de todos los zimógenos pancreáticos. De esta forma, si la secreción y actividad de la tripsina es limitada, la capacidad de romper, no solo los enlaces entre la arginina y la lisina de cualquier proteína, sino la activación del resto de las enzimas se verán fuertemente afectadas (Stryer et al., 2003). De esta forma, las diferentes relaciones entre las enzimas digestivas alcalinas, la tripsina y la quimotripsina, pueden ser buenos indicadores en la nutrición del estadio larvario (Cara et al., 2003). Adicionalmente, se sabe también que la quimotripsina comparte los mismos sitios de corte que la pepsina, y que además la tripsina, quimotripsina y elastasa, tienen pesos moleculares parecidos, sugiriendo que en los primeros días del desarrollo larvario su acción conjunta permitirá la degradación de proteínas, mientras se desarrolla el estómago (Zambonino-Infante y Cahu, 2002). Además, en el caso de la leucina aminopeptidasa en *P. splendida* la actividad se presenta a partir del inicio del cultivo alcanzando su máxima actividad entre los días 20 y 40 DDE, siguiendo el mismo patrón de comportamiento de la larva del roncador amarillo (*Pseudosciaena crocea*), donde el cruce de las actividades de la fosfatasa alcalina y la aminopeptidasa expresaron la maximización de los procesos de digestión y absorción en el intestino ya desarrollado entre los días 23 y 25 DDE (Ma et al., 2005).

### 4.5.3 Actividad de proteasas ácidas

El desarrollo del tracto digestivo en las larvas de peces dulceacuícolas en ambientes tropicales es muy diferente, comparado con el desarrollo del tracto digestivo de larvas de peces marinos o de peces de aguas templadas. Por ejemplo, el desarrollo del estómago en los peces tropicales se da tempranamente, inclusive antes o durante la absorción del vitelo como es el caso de *A. tristoechus* (Comabella et al., 2006) y *M. urophthalmus* (López-Ramírez et al., 2010). En contraste, las larvas de

peces marinos donde el estómago no es funcional en la primera alimentación y la digestión de las proteínas depende de la acción de secreciones de las enzimas pancreáticas, como es el caso de las larvas de *G. morhua* y de lenguado del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*). En estas especies, la digestión no mejora hasta varias semanas después cuando las células gástricas empiezan a producir ácido clorhídrico y pepsina. Por lo tanto, el estómago se convierte en el principal órgano en la digestión de los alimentos (Brien-MacDonald et al., 2006; Murray et al., 2006). Esto ha sido ampliamente documentado en muchas especies, incluyendo la *P. splendida* en la que las células gástricas se detectaron a los primeros 9 DDE aun cuando se observaba la presencia de vitelo, demostrando que esta especie presenta un patrón de alimentación mixto (endo-exotrófica) (Treviño-Carrillo et al., 2010). Es así que la actividad de las proteasas ácidas como la pepsina es muy importante al ser un indicador final del periodo larvario, como ha sido reportado en especies como lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), *S. lucioperca* y la breca (*Pagallus erythrinus*) (Ribeiro et al., 1999; Suzer et al., 2006; Hamza et al., 2007).

#### 4.5.4 Zimogramas de proteasas ácidas y alcalinas

Los zimogramas de las proteasas alcalinas durante la ontogenia inicial de la *P. splendida* indica la presencia de cuatro isoformas que se van desarrollando conforme aumenta la edad de la larva para completarse a partir de los 11 DDE, siendo similares en peso molecular (21.4, 23.5, 26.4 y 95.2 kDa en esta investigación) las tripsina, quimotripsina y aminopeptidasas de otras especies de peces como el disco azul (*Symphysodon aequifasciatus*), el piracanjuba (*Brycon orbinyanus*), y la corvina roja (*Sciaenops ocellatus*) (Chong et al., 2002; García-Carreño et al., 2002; Lazo y Arnol, 2007). Por ejemplo, para la especie *S. aequifasciatus* se reportaron pesos moleculares para algunas tripsinas entre (36.1-39.8 kDa), para las metaloproteasas (73.3-76.5 kDa) y las

serin proteasas (58.7- 61.4kDa). Sin embargo, el peso molecular para las proteasas gástricas del *B. orbinyanus* fueron bajos y para las proteasas alcalinas se mostraron entre (7-70 kDa), en el caso de *S. ocellatus* se encontraron bandas de actividad que van desde los 23 hasta los 68 kDa, detectando 5 bandas de actividad desde los primeros 3 días de alimentación exógena en un rango de 27 hasta los 42 kDa, y para el día 18 DDE se reportaron bandas de actividad con pesos moleculares de 68 kDa.

En el caso de las proteasas ácidas, únicamente se detectó una banda a partir de los 6 DDE con un Rf de 0.65, el cual podría corresponder a una pepsina que adicionalmente aumenta en su actividad de acuerdo al crecimiento de las larvas; esto concuerda con el tipo de proteasas ácidas detectadas durante la ontogenia inicial de varias especies de peces tanto marinos como de agua dulce como son la cabrilla arenosa (*Paralabrax maculatofasciatus*) que fue detectada a partir de los 25 DDE o castarrica (*Cichlasoma urophthalmus*) que se detectó a partir de los primeros 3 DDE (Álvarez-González et al., 2008, 2010; López-Ramírez et al., 2010). Por lo tanto, consideramos que es posible formular un alimento artificial para el periodo larvario; sin embargo, el patrón de bandas proteolíticas observadas por medio de las electroforesis revelan que el número de isoformas que presenta es limitado (una banda para las proteasas ácidas y cuatro bandas para las proteasas alcalinas), por lo que la formulación de un alimento para esta etapa tendrá que ser basado en proteínas de origen animal (principalmente proteínas de organismos marinos), y con un alto contenido de nutrientes, requeridas para asegurar una buena nutrición de las larvas (Díaz-López et al., 1997). Por esta razón, las larvas de *P. splendida* pueden ser consideradas carnívoras estrictas, lo cual es corroborado por el bajo número de bandas activas, este patrón de bandas también ha sido reportado en especies como *S. ocelotes*, donde las técnicas electroforéticas revelaron que las larvas poseen casi por completo un conjunto de proteasas alcalinas desde la primera alimentación 3 días

después de la eclosión (Lazo et al., 2007). Otros ejemplos de la actividad proteolítica detectada en electroforesis es el caso de especies como *S. aurata* y pargo plateado (*Diplodus sargus*) (Díaz-López et al., 1998; Cara et al., 2003). En estos casos, las isoformas de proteasas alcalinas se presentaron desde el momento de la apertura de la boca, esto es un indicativo del inicio del desarrollo de los enterocitos y de la maduración del sistema digestivo (Álvarez-González et al., 2010), que adicionalmente se complementa rápidamente por la presencia de una banda de actividad proteolítica ácida, lo que es un indicativo de la alta actividad gástrica que presenta la especie aun mientras se da la absorción del vitelo. Esto fue corroborado por los estudios de morfología e histología en donde se muestra claramente que después de la absorción del saco vitelino se presentan un incremento en la producción de células gástricas en la región donde se formará el estómago (Treviño-Carrillo et al., 2010). De manera más tardía sucede con especies como *S. aurata* y lenguado común (*Solea solea*) donde las bandas de actividad se observaron hasta el día 20 DDE (Moyano et al., 1996; Fernández et al., 2001).

### 4.5.5 Importancia fisiológica de las enzimas digestivas

La presencia de proteasa ácidas y alcalinas durante la absorción del vitelo en *P. splendida* y su incremento a partir de los 35 DDE es de gran importancia en el conocimiento del desarrollo del sistema digestivo y de la capacidad de absorción de nutrientes, lo que refleja el rápido desarrollo del intestino en esta especie. Este tipo de actividad es el factor que indica la madurés de los enterocitos y la conformación de un sistema digestivo bien desarrollado que se ha reportado en larvas de *D. labrax*, *S. aurata*, *S. senegalensis*, esto se ha relacionado con la disminución simultánea de las enzimas citosólicas (Zambonino-Infante y Cahu, 1994; Moyano et al., 1996; Ribeiro y Zambonino-Infante, 2002). Sin embargo, la baja tasa de crecimiento observada en *P. splendida* podría indicar una digestión lenta y la capacidad de absorción de nutrientes a pesar de la presencia de

fosfatasa y exopeptidasas, lo cual se corrobora con el intestino corto de esta especie (Treviño-Carrillo et al., 2010), que podrían reducir la retención de alimentos y la recuperación de nutrientes en los enterocitos (Ueberschär et al., 1993; Alarcón et al., 1998).

En el presente estudio la actividad de las lipasas de la *P. splendida* estuvieron presente desde el inicio del período del cultivo y alcanzó su máxima actividad a los 40 DDE. Esto también se hizo presente en *C. catla*, en los que se detectó actividad lipasa a los 4 DDE y fue aumentando continuamente desde los 22 DDE en adelante (Kumar et al., 2000; Ben et al., 2006). En este sentido, el estudio de las lipasas durante la ontogenia inicial de los peces es muy importante ya que permite relacionar la actividad de estas enzimas para la utilización óptima de los lípidos de los alimentos, y definir si los tipos de lípidos y el enriquecimiento de los procesos son adecuados para la formulación de dietas artificiales (López et al., 2003). Esto resulta de manera fundamental, debido a que las larvas no tienen la capacidad metabólica para sintetizar los ácidos grasos de las series linoleico n-6 y linolénico n-3. Sin embargo, los ácidos grasos deberán ser incorporados durante la fabricación de los alimentos. También, se debe considerar el tipo y concentración de los ácidos grasos poli-insaturados (AGPI), estos serán una variable dependiente de la especie y por supuesto la capacidad digestiva durante la ontogenia. Los ácidos grasos más abundantes en los tejidos de los peces de agua dulce como marinas, pertenecen a la serie linolénica (n-3), mientras que los AGPI de las series n-6 se presentan a una concentración más baja; aunque se debe resaltar ciertas diferencias entre los peces dulceacuícolas donde se han reportado niveles mayores de las series n-6 comparados con los marinos. Quizás esto no sea sorprendente si consideramos que la dieta de peces de agua dulce puede contener elementos derivados a partir de otras fuentes no marinas, que consecuentemente son ricas en ácidos grasos de las series n-6 (Kim et al., 2001; Jun-Zhang et al., 2006). Sin excluir la presencia de los AGPI de la serie n-3. De esta manera, se

considera que los ácidos grasos de las series n-6 y n-3 (éstos últimos con mayor importancia), al tener un mayor grado de insaturación permitirán una mayor fluidez de membranas, flexibilidad y permeabilidad a temperaturas bajas, por lo que su incorporación a partir de la dieta es fundamental, para lo cual se requiere de la acción de las esterasas, fosfolipasas y lipasas verdaderas dependientes de sales biliares que favorezcan esta incorporación (Evans et al., 1998).

El estudio de la  $\alpha$ -amilasa en *P. splendida* mostró que la actividad de esta enzima se expresa a partir de los primeros días de cultivo y que se mantiene de manera fluctuante, pero con baja actividad; sin embargo, su máxima actividad se refleja entre los 45 y 60 DDE, siendo similar a lo reportado para especies como *O. niloticus* (Tengjaroenkul et al., 2002). Aunque es diferente a lo reportado para otras especies principalmente marinas como *D. sargus* y *D. labrax* (Cara et al., 2003; Cahu et al., 2004) donde la actividad de la amilasa decrece con la edad del pez. Esta actividad ha sido considerada baja para peces monogástricos y de alta importancia para peces agástricos lo cual les permite digerir carbohidratos (como el glucógeno y almidón) como es el caso de la *C. catla* (Kumar et al., 2000). Adicionalmente, esta actividad ha sido reportada que tiene un patrón similar al de la lactasa en mamíferos, la cual a cierta edad desaparece ya que puede obtener la energía necesaria para el metabolismo no solo de los carbohidratos, sino también de otras fuentes de nutrientes, por lo que no es raro que su actividad disminuya o desaparezca conforme la larva crece (Zambonino-Infante y Cahu, 1994). Aunque se debe mencionar que para peces dulceacuícolas la acción de esta enzima no desaparece, sino que inclusive aumenta, lo que le permitiría para el caso de *P. splendida* aprovechar más adecuadamente los nutrientes a través de la hidrólisis del glucógeno de sus presas al ser un pez de hábitos carnívoros al terminar el periodo larvario y al comienzo del periodo juvenil.

En su conjunto las actividades específicas de la amilasa, lipasa y fosfatasa alcalina de la *P. splendida* mostraron tres fases diferenciadas iniciando con un fuerte aumento de la actividad enzimática al inicio de la alimentación exógena a los 3 DDE, seguida de una serie de fluctuaciones y un declive general hacia los 18 DDE, para finalizar con un período de baja actividad después del día 18 hasta los 36 DDE. Este comportamiento es muy similar a la observada en especies como *C. catla* y *P. olivaceus* donde la actividad tanto de la tripsina, como de la lipasa se expresa desde los 2 DDE alcanzando su máxima actividad a partir de los 36 DDE (Rathore et al., 2005; Bolasina et al., 2006). La presencia de alta actividad de lipasa a los 40 DDE se correlaciona con la presencia de los ciegos pilóricos los cuales han sido reportados como una sección del sistema digestivo capaz de incrementar el tiempo de retención de estas y otras enzimas digestivas maximizando su acción sobre el sustrato (Peña-Martínez et al., 2003).

La actividad de las enzimas digestivas se emplea como un indicador de la aceptación del alimento para las larvas y hasta cierto punto, servir como una guía para el desarrollo de la capacidad digestiva en relación con el tipo de alimento (Nolting et al., 1999; Zambonino-Infante et al., 2002). Además, los estudios sobre las secreciones digestivas en peces pueden esclarecer ciertos aspectos de su fisiología y resolver así problemas de nutrición para combinar una dieta artificial, de acuerdo con las necesidades nutricionales del pez (Furné et al., 2005; Hidalgo 2005). En este trabajo, nuestros resultados muestran que la *P. splendida* presenta un crecimiento lento al inicio del cultivo probablemente ocasionado por el tipo de alimento suministrado (nauplios de *Artemia*), aunque existen otros factores que pueden afectar el crecimiento como son el tamaño de la partícula suministrada, la calidad del agua, la composición química del alimento o balance nutricional y la cantidad de alimento proporcionado durante el día. Por otra parte, la digestibilidad del alimento es un factor fundamental ya que proporciona los nutrientes necesarios para maximizar el crecimiento por lo que muchos de los cambios en la actividad

enzimática ocurren con relación a los cambios de alimento y su efecto en las funciones metabólicas durante el desarrollo de los órganos y tejidos digestivos (Ma et al., 2005).

Los resultados de este estudio, permiten establecer que las larvas de *P. splendida* tienen una completa acción de las enzimas digestivas a partir del día 6 después de la eclosión, y que se maximiza a partir de los 9 DDE, inclusive con la presencia de vitelo en una fase de alimentación endo-exotrófica, lo cual permitiría suministrar un alimento artificial a partir de esa edad. Sin embargo, al suministrar el alimento de trucha, este no necesariamente es el más adecuado para esta especie, por lo que se puede estar limitando la acción de las enzimas digestivas al no contener el tipo de ingredientes o la cantidad de nutrientes adecuados. En este caso se sugiere profundizar en la determinación de los requerimientos nutricionales para el periodo larval y la evaluación de la digestibilidad in vitro durante esta etapa del ciclo de vida para esta especie.

### 4.6 Referencias

- Alarcón FJ, Díaz M, Moyano FJ, Abellan E (1998) Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiology and Biochemistry* 19: 257-267.
- Almeida LC, Lundstedt LM, Morales G (2006) Digestive enzyme response of tambaqui (*Colossoma macropomum*) Fed on different levels of protein and lipid. *Aquaculture Nutrition* 12: 443-450.
- Álvarez-González CA, Moyano-López FJ, Civera-Cerecedo R, Carrasco-Chávez V, Ortiz-Galindo J, Nolasco-Soria H, Tovar-Ramírez D, Dumas S (2010) Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* II: Electrophoretic analysis. *Fish Physiology and Biochemistry* 36(1) 29-37.
- Álvarez-González CA, Cervantes TM, Tovar RD, Conklin DE, Nolasco H, Gisbert E, Piedrahita R. (2006) Development of digestive enzyme in California Halibut (*Paralichthys californicus*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* 31(1): 83-93.

- Álvarez-González CA, Moyano-López FJ, Civera-Cercedo R, Carrasco-Chávez V, Ortiz-Galindo J, Dumas S (2008) Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass (*Paralichthys maculatofasciatus*). 1. Biochemical analysis. *Fish Physiology and Biochemistry* 34: 373-384.
- Anónimo (1984) Catálogo de especies acuáticas de importancia comercial en el estado de Tabasco, artes y métodos de captura. Secretaria de Pesca. México.
- Anson ML (1938) the estimation of pepsin, tripsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of General Physiology* 22: 79-89.
- Ben NCH, Jian GQ, Martin SK, Wayne GH, Steven MC (2006) Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture* 260:264-271.
- Bergmeyer HV (1974) *Methods of Enzymatic Analysis*. Phosphatases. Vol 2. Verlag Chemic. Academic Press. Inc.
- Bolasina S, Pérez A, Yamashita Y (2006) Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 252: 503-515.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-54.
- Brien-MacDonald KO, Joseph AB, Christopher CP (2006) Growth, behavior, and digestive enzyme activity in larval Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to rotifer lipid. *Journal of Marine Science* 63: 275-284.
- Cahu C, Rønnestad I, Grangier V, Zambonino Infante JL, (2004) Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin *Aquaculture* 238: 295–308.
- Cara JB, Moyano FJ, Cardenas S, Fernandez DC, Yúfera M (2003) Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *Journal of Fish Biology* 63: 48-58.

- Caro CC, Mendoza A, Sánchez M (1994) Caracterización del medio ambiente de (*Petenia splendida*) en lagunas del sur de Quintana Roo. In: Memorias del II Seminario sobre Peces Nativos con uso Potencial en Acuicultura. Del 23 al 26 de mayo Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, H. Cárdenas, Tabasco, México.
- Chan R (2004) Efecto de la temperatura sobre el consumo de oxígeno en la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*) Günther 1862. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México.
- Chávez-Lomelí MO, Mattheeuws AE, Pérez MH (1989) Biología de los Peces del Río San Pedro en Vista de determinar su potencial para la piscicultura. INREB-FUCID. Xalapa, Veracruz, México.
- Chen BN, Qin JG, Kumar MS, Hutchinson W, Clarke S, (2006) Ontogenetic development of the digestive system in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) larvae. *Aquaculture* 256: 489–50.
- Chong ASC, Hashim R, Lee LC, Ali AB (2002) Characterization of protease activity in developing discus (*Symphysodon aequifasciatus*) larva. *Aquaculture Research* 33: 663-672.
- Comabella Y, Mendoza R, Aguilera C, Carrillo O, Hurtado A, García GT (2006) Digestive enzyme activity during early larval development of the Cuban gar (*Atractosteus tristoechus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 32: 147-157.
- Contreras M (2003) Inversión sexual de las mojarra nativas (*Cichlasoma salvini*) y (*Petenia splendida*), Mediante administración de oral de esteroides sintéticos. Tesis de Licenciatura. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México
- Del Mar EG, Largeman C, Brodick JW and Geokas MC, (1979) A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Analytical Biochemistry* 99: 316-320.
- Díaz-López M, Moyano FJ, Alarcón FJ, García-Carreño FL, Navarrete del Toro MA (1998) Characterization of fish acid proteases by substrate-gel electrophoresis. *Comparative Biochemistry and Physiology* 121B: 369-377.
- Díaz-López M, Moyano FJ, García-Carreño LF, Alarcón FJ, Sarasquete MC (1997) Substrate-SDS- PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. *Aquaculture International* 5: 461-471.

- Divakaran S, Kim BG, Ostrowski AC (1999) Digestive enzymes present in Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) (Bloch and Schneider 1801) and Bluefin trevally (*Caranx melampygus*) (Cuvier 1833). *Aquaculture Research* 30: 781-787.
- Drossou A, Ueberschär B, Rosenthal H, Herzig KH, (2006) Ontogenetic development of the proteolytic digestion activities in larvae of (*Oreochromis niloticus*) fed with different. *Aquaculture* 256:479-488.
- Erlanger B, Kokowsky N, Cohen W (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95: 271-278.
- Evans RP, Parrish CC, Zhu P, Brown JA, Davis PJ (1998) Changes in phospholipase activity and lipid content during early development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Marine Biology* 130: 369-376.
- Fernández I, Moyano FJ, Díaz M, Martínez T (2001) Characterization of  $\alpha$ -amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 262: 1-12.
- Furné M, Hidalgo MC, López A, Garcia GM, Morales AE, Domezain A, Domezain EJ, Sanz A (2005) Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). A comparative study. *Aquaculture* 250: 391-398.
- García M (2003) Determinación de la temperatura preferencial y metabolismo de la rutina de la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*) Günther 1862. Tesis de licenciatura, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México.
- García-Carreño FL, Albuquerque-Cavalcanti C, Navarrete del Toro M, Zaniboni-Filho E (2002) Digestive proteinases of *Brycon orbinyanus* (Characidae, Teleostei): characteristics and effects of protein quality. *Comparative Biochemistry and Physiology* 132(B):343-352.
- Guerrero R (2007) Efecto de la temperatura en la proporción de sexos de las mojarra nativas "castarrica" (*Cichlasoma urophthalmus*) y "tenguayaca" (*Petenia splendida*). Tesis de Licenciatura. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México.

- Hamza N, Mhetli M, Kestemont P (2007) Effect of waning age and diets on ontogeny of digestive activities and structures of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* 33:121-133.
- Jiménez LD (2007) Efecto de la densidad de siembra inicial de larvas de las mojarra nativas tenguayaca (*Petenia splendida*) y castarrica (*Cichlasoma urophthalmus*) en un sistema de recirculación. Tesis de licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México
- Jiménez C (2004) Efecto de la temperatura en el crecimiento de crías de mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*) Günther 1862. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México.
- Jun-Sheng L, Jian-lin L, Ting-ting W (2006) Ontogeny of protease, amylase and lipase in the alimentary tract of hybrid Juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus*) *Fish Physiology and Biochemistry* 32: 295-303.
- Kim Bong G, Divakaran S, Christopher L. Brown and Anthony Ostrowski C (2001) Comparative digestive enzyme ontogeny in two marine larval fishes: Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) and bluefin trevally (*Caranx melampygus*) *Fish Physiology and Biochemistry* 24: 225-241.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Kumar S, Sharma JG, Chakrabarti R (2000) Quantitative estimation of proteolytic enzyme and structural study of anterior part of intestine of Indian major carp (*Catla catla*) larvae during ontogenesis. *Current Science* 79: 1007-1101.
- Lazo JP, Arnold CR (2007) Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 265: 194-205.
- López LS, Nolasco H, Vega-Villasante F (2008) Characterization of digestive gland esterase - lipase activity of juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 135B: 337-347.
- Ma H, Cahu C, Zambonino J, Yu H, Duan Q, Le Gall M, Mai K (2005) Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Aquaculture* 245:239-248.

- Maraux S, Louvard D, Baratti J (1973) The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochimica et Biophysica Acta* 321: 282–295.
- Martínez JL (2004) Desarrollo embrionario larval de la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*) Günther 1862. Tesis profesional. División Académica de ciencias Biológicas Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México.
- Moyano FJ, Diaz M, Alarcon, Sarasquete MC (1996) Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry* 15: 121-130.
- Murray HM, Gallant JW, Johnson SC, Douglas SE (2006) Cloning and expression analysis of three digestive enzymes from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) during early development: Predicting gastrointestinal functionality. *Aquaculture*: (252): 394-408.
- Nolting M, Ueberschar B, Rosenthal H (1999) Trypsin activity and physiological aspects in larval rearing of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using live prey and compound diets. *Fish Physiology and Biochemistry* 15: 138-142.
- Peña-Martínez R, Dumas S, Villalejo-Fuerte M, Ortiz-Galindo JL (2003) Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) larvae. *Aquaculture* 219: 633-644.
- Igbokwe EC, Downe AER (1978) Electrophoretic and histochemical comparison of three strains of *Aedes aegypti*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 60B: 131-136.
- Rathore RM, Kumar S, Chakrabarti R (2005) Digestive enzyme patterns and evaluation of protease classes in *Catla catla* (Family: Cyprinidae) during early developmental stages. *Comparative Biochemistry and Physiology* 142B: 98-106.
- Reséndez A, Salvadores ML (1983) Contribución al conocimiento de la biología del pejelagarto (*Lepisosteus tropicus*) (Gill) y la tenguayaca (*Petenia splendida*) (Günther) del Estado de Tabasco. *Biótica* 8(4): 413-426.
- Ribeiro L, Zambonino-Infante JL, Cahu C, Dinis MT (1999) Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858 *Aquaculture* 170: 465-473.

- Ribeiro L, Zambonino-Infante JL, Cahu CL, Dinos MT (2002) Digestive enzymes profile of *Solea senegalensis* post larvae fed *Artemia* and a compound diet. *Fish Physiology and Biochemistry* 27: 61–69.
- Robyt JF, Whelan WJ (1968) The  $\alpha$ -amylases. In: Radley JA (ed) *Starch and its derivatives*. Academic Press, London, 477-497.
- Santiago LMC, Jardon OJ, Jaramillo SG, Reyes AJE, Sanchez VA (1997) Edad, crecimiento y hábitos alimenticios de *Cichlasoma salvini* (Gunther), *Cichlasoma urophthalmus* (Gunther), *Oreochromis niloticus* (Linneo) y *Petenia splendida* (Gunther). Presa Miguel de la Madrid H. "Cerro de Oro" Tuxtepec, Oaxaca. pp 38 in: V Congreso Nacional de Ictiología. 3 a 5 de Febrero de 1997. Mazatlán, Sinaloa, México. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad Autónoma de Sinaloa, México.
- Souza AAG, Amaral IPG, Albérico RES, Carvalho Jr LB, Bezerra RS (2007) Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*) *Food Chemistry* 100: 1429-1434.
- Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL (2003) *Bioquímica: Lípidos y membranas celulares*. Reverté, fifth Ed, Barcelona, España.
- Suzer C, Saka S, Firat K (2006) Effects of illumination on early life development and digestive enzyme activities in common pandora *Pagellus erythrinus* L. larvae. *Aquaculture* 260: 86-93.
- Tengjaroenkul B, Smith BJ, Smith SA, Chatreewongsin U (2002) Ontogenic development of the intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus* L). *Aquaculture* 211: 241–251.
- Treviño-Carrillo LM, Alvarez-González CA, Gisbert E, Perales-García N, Arévalo-Galán L, Márquez-Couturier G, Uscanga-Martínez A (2008) Histological and morphological evaluations of the digestive system of native cichlid bay snook *Petenia splendida* during early ontogeny. 8th Larval Biology Symposium. 6-11<sup>th</sup> July 2008, Lisbon, Portugal.
- Ueberschär B (1993) Measurement of proteolytic enzyme activity: significance and application in larval fish research. In: Walther BT, Fyhn, HJ (eds) *Physiological and Biochemical Aspects of Fish development*. University of Bergen, Norway.

- Uscanga A (2006) Determinación de requerimiento de proteína en juveniles masculinizados y no masculinizados de la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*). Tesis de Maestría. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México.
- Valtierra VMT, Schmitter SJJ (2000) Hábitos alimentarios de las mojarra (Perciformes: Cichlidae) de la laguna Caobas, Quintana Roo, México. *Revista de Biología Tropical* 48: 2-3.
- Versaw WK, Cuppett SL, Winters DD, and Williams LE (1989) An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *Journal of Food Science* 54: 1557-1558.
- Vidal-López JM (2004) Masculinización de crías de la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*) Günter 1862 mediante bioencapsulado del esteroide con 17- metilttestosterona en nauplios de *Artemia salina*. Tesis de Licenciatura Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México.
- Walter HE (1984) Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer HJ (ed) *Methods of enzymatic analysis*, vol V. Verlag Chemie, Weinham.
- Williams DE, Reisfeld RA (1964) Disc electrophoresis in polyacrylamide gels: extension to new conditions of pH and buffers. *Annals of the New York Academy of Sciences* 121: 373-381.
- Yanbo W, Zirong Xu (2006) Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Journal of Animal and Feed Sciences Tech* 127: 283-292.
- Zambonino-Infante JL, Cahu C (1994) Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* 12: 399-408.
- Zambonino-Infante JL, Cahu CL (2002) Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology* 130C: 477-487.

## V. Evaluación de la eficiencia enzimática en la digestión de las proteínas en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*)

A. Uscanga-Martínez<sup>1</sup>, F. J. Moyano<sup>1</sup>, C. A. Álvarez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Aplicada, Escuela Politécnica Superior, La Cañada de San Urbano, Universidad de Almería, 04120 Almería, España

<sup>2</sup>Laboratorio de Acuicultura Tropical, DACBIOL, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa Cárdenas km 0.5, 86139 Villahermosa, Tabasco, México

Este capítulo ha sido publicado en *Fish Physiology and Biochemistry* (2010) 36:1079–1085

### 5.1 Resumen

En el presente estudio se desarrolló un experimento enfocado a estimar la eficiencia de la digestión de las proteínas en los juveniles de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), para lo cual se midió la tasa de tránsito intestinal y la actividad total de las principales proteasas intestinales (tripsina y quimotripsina). El tiempo total para la digestión, calculado a través de la estimación de la velocidad de tránsito en el intestino. Los resultados en el contraste de color del alimento fue de 7.15 h. La producción media de tripsina y quimotripsina fue de 15.94 y 24.11 mU en el intestino proximal y mucho más baja en la parte distal del intestino 2.39 y 4.90 mU respectivamente. La eficiencia de la enzima fue calculada a partir de la actividad enzimática y el tiempo promedio de residencia de la ingesta en cada sección intestinal; es así como los resultados muestran que, el intestino proximal realiza un papel importante en la digestión de las proteínas para esta especie. Esta información permite discutir la importancia de la eficiencia enzimática digestiva para especies con un pseudoestómago.

Palabras claves: tránsito intestinal, proteasas, eficiencia enzimática, tilapia del Nilo

## 5.2 Introducción

En los últimos años, un gran número de trabajos han sido enfocados a la caracterización del tipo y cantidad de enzimas presentes en el tracto digestivo en peces (Chan et al., 2004; Papoutsoglou y Lyndon, 2005, Liu et al., 2008), así como su respuesta a cambios en la composición de los alimentos (Applebaum y Holt, 2003; Papoutsoglou y Lyndon, 2006a); Cara et al., 2007). Estos trabajos ofrecen información muy valiosa sobre las diferencias existentes de cada especie, entre las enzimas y su capacidad para hidrolizar sustratos específicos, este es en gran medida un factor clave para explicar las diferencias observadas en la digestibilidad de los principales nutrientes de alimentos. Sin embargo, el resultado neto de la función de la enzima depende de otros factores importantes, como su concentración relativa presente en el intestino del pez, así como el tiempo disponible para hidrólisis, siendo este último determinado por el tránsito de los alimentos. Se cree que la mayor eficiencia en el proceso digestivo únicamente se logra cuando se produce una cantidad adecuada de enzima, y se presenta un tiempo suficiente para la terminación de la hidrólisis (Scocco et al., 1997; Olsson y Holmgren, 2001). Esto podría conducir a la determinación de lo que se ha llamado "eficiencia enzimática", este es un índice de la estimación de una determinada especie alimentada en condiciones normales, que para obtenerla, se requiere la cuantificación tanto de la cantidad total de la actividad enzimática producida en un momento determinado y la estimación del tiempo de tránsito intestinal de los alimentos (Chan et al., 2004). A pesar de la importancia de este último parámetro en la evaluación de la función digestiva de los peces, pocos trabajos se han orientado a su estimación (Anderson, 1991; Pääkkönen y Marjomäki, 1997). El presente trabajo tiene por objeto desarrollar un procedimiento experimental para estimar la eficiencia de la digestión de las proteínas como se explicó anteriormente, utilizando la tilapia del Nilo (*O. niloticus*) como peces experimentales. El experimento se enfocó a medir la velocidad de tránsito intestinal y el total

de las principales proteasas intestinales tripsina y quimotripsina producidas después de la ingestión de los alimentos.

### 5.3 Materiales y métodos

El tránsito de los alimentos en el tracto digestivo de los peces fue evaluado visualmente, este protocolo requirió el uso de alimentos con diferentes colores para poder detectarlos fácilmente después de la disección del intestino, los peces que se utilizaron en los muestreos secuenciales debían tener una talla similar y realizar un protocolo de alimentación en el cual todos los peces debían recibir la misma cantidad de alimentos.

#### 5.3.1 Peces experimentales y alimentación

Los juveniles de *O. niloticus* (sexos: mixtos), con peso promedio ( $n= 50$ ,  $30 \pm 5,0$  g), se obtuvieron de una granja local (VALAQUA; Valencia, España). Los peces fueron mantenidos en tanques de 50 L dentro de un sistema de recirculación que dispuso de agua libre de cloro a una temperatura entre 28-29 °C. El fotoperiodo fue 12L/12N. Cada grupo de peces que constituyeron una muestra ( $n= 5$ ) se mantuvieron en compartimentos separados dentro de los tanques. Los grupos fueron formados por peces que presentaron la mayor similitud en peso. El agua utilizada se manejó con suministro de aireación continua, y la concentración de oxígeno se mantuvo en  $6.40 \pm 0.28$  mg/L. Un 10 % del volumen total de agua fue reemplazado diariamente. Se formularon dos dietas semi-purificadas con una composición similar (Tabla 1), las cuales se tiñeron, una de color blanco y otra de color verde oscuro al incluir una pequeña cantidad de talco en la primera y mientras que en la segunda se le agregó óxido de cromo. Cada dieta fue preparada mezclando todos los ingredientes secos en una batidora industrial (Samimic, modelo BM-11, Azpeitia, España) y después se agregó el aceite de pescado a la mezcla. Posteriormente se añadió agua hasta formar una masa dura, después la

mezcla se pasó a través de un molino de carne (BRAHER Internacional, modelo P 22-82). Obteniendo pellets de 2 mm los cuales se secaron a temperatura ambiente (25 °C), siendo entonces envasados en bolsas de plástico y refrigerados a 5 °C hasta su uso.

Tabla 1.- Composición de las dietas experimentales utilizadas para evaluar la frecuencia de alimentos en tránsito en juveniles *O. niloticus*.

Ingredientes (g 100g <sup>-1</sup> dietas)	Blanco	Verde oscuro
Caseína <sup>a</sup>	35	35
Salvado de trigo <sup>b</sup>	25	25
Aceite de pescado <sup>c</sup>	10	10
Dextrina <sup>d</sup>	17	17
Carboxymetil celulosa <sup>e</sup>	5	10
Alginato <sup>f</sup>	2	2
Talco <sup>g</sup>	6	0
Oxido de cromo <sup>h</sup>	0	1

caseína<sup>a</sup> = EPSA, # lot 270501703, Hecho en España  
 salvado de trigo<sup>b</sup> = Commercial, Almería, España  
 Aceite de pescado<sup>c</sup> = AFANSA # ES·36·01·POL.-C3  
 Dextrina<sup>d</sup> = Puma Specialities # lot 070237, Hecho España  
 Carboxymetil celulosa<sup>e</sup> = Walocel C, Hecho en Alemania  
 Alginato<sup>f</sup> = EPSA, Hecho en España  
 Talco<sup>g</sup> = Panreac Química, Sau # catalogo141733·1211  
 Oxido de cromo<sup>h</sup> = Jalmek # catalogo C5260-05

### 5.3.2 Protocolo de alimentación y medición de paso intestinal

Durante el período de aclimatación (10 días), los peces fueron alimentados con un pienso comercial dos veces al día. Antes del experimento, los peces se sometieron a un periodo de inanición durante 24 horas para asegurarse de que el tracto digestivo de los peces se encontraran vacíos, con lo cual se realizaron pruebas preliminares de disección en ese momento, encontrándolo que permitió determinar que todos los peces muestreados en el tiempo 0 mostraron intestinos vacíos. Los peces recibieron una primera alimentación a base de dieta verde

(punto 0), transcurridos 120 minutos después se suministró una segunda alimentación constituida por la dieta blanca, y 480 min después una tercera alimentación constituida por dieta verde. La dieta suministrada fue del 1% del peso vivo de cada pez; ensayos previos demostraron que esta cantidad de alimento era suficiente para satisfacer el consumo de los peces.

Se establecieron un total de 8 muestreos en diferentes momentos después de la alimentación, inicialmente a 30, 60 y 90 minutos y desde de este momento a diferentes intervalos. Los peces seleccionados en cada muestreo (n= 5) se sacrificaron con una sobredosis de anestésico MS222 a una concentración de  $1 \text{ g L}^{-1}$  (metanosulfonato tricaina, Argent, Laboratories, Inc., Redmond, WA, USA) y fueron mantenidos en agua fría hasta su procesamiento (Los procedimientos de manipulación de los peces cumplieron con los términos del Comité para el Uso Ético de los Animales Experimentales). El aparato digestivo fue extraído cuidadosamente por disección, sobre una mesa provista con una escala milimétrica y cada biometría fue registrada por medio de fotografías. Las imágenes fueron posteriormente procesadas digitalmente utilizando el software (Image-Pro Plus 5,1) para medir la longitud total del intestino (LT) la distancia se determinó en mm entre las dos distintas dietas dentro del intestino en relación con el esfínter pilórico de cada pez.

### 5.3.3 Cuantificación en la producción de enzimas

Una vez fotografiado el intestino de cada pez se dividió en dos secciones iguales (intestino proximal y distal; IP e ID), se pesaron y se utilizaron para la preparación de los extractos enzimáticos. Los extractos fueron preparados por la homogenización de los tejidos a una proporción de 1:10 (peso/volumen) con agua destilada, se utilizó un sonicador como molino (Misonix, modelo Microson Ultrasonico disruptor celular, NY) como se detalla en Moyano et al. (1996). Los sobrenadantes obtenidos tras la

centrifugación a 16,000 x g durante 30 minutos a 4 °C fueron almacenados a -20 °C hasta su uso para el análisis enzimático. La concentración de proteína soluble en los extractos se determinó por el Método de Bradford (Bradford1976) usando como estándar una curva patrón de albúmina sérica bovina a razón de 1 mg mL<sup>-1</sup>.

La actividad de la tripsina se midió con 1 mM de N-benzoil-DL-Arg-p-nitroanilida (BAPNA, Sigma B4875) en 50 mM de Tris-HCl, a un pH 8, y 20 mM de CaCl<sub>2</sub>. BAPNA fue disuelto en DMSO de 1 ml y se aforó a 100 ml con solución tampón 2 (50 mM Tris-HCl, pH 8, 20 mM CaCl<sub>2</sub>). Los cambios en la absorbancia a 410 nm se registraron durante 3 minutos (Erlangeretal, 1961). La actividad de la quimotripsina fue evaluado similar al anterior, con 100 mM de succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida (SAPNA, sigma S7388) en solución tampón como sustrato. La Absorbancia a 410 nm se midió con un espectrofotómetro Ex Multiskan (Thermolab Sistemas, Helsinki, Finlandia). Una unidad de actividad fue definida como un 1 μmol de p-nitroanilina liberada por minuto de tripsina o quimotripsina según sus respectivos sustratos.

La actividad total por peso de tejido se calculó tomando en cuenta el peso de cada porción de intestino, mientras que la eficiencia enzimática (EE) en cada sección del intestino se calculó de la siguiente manera:

EE = Actividad enzimática (1 μmol de p-nitroanilina min<sup>-1</sup>) X el tiempo de residencia de la digestión en determinada sección (en minutos).

### 5.3.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos sobre las diferencias en la actividad de la tripsina y quimotripsina (mU) en las diferentes secciones de intestino (IP e ID), fueron analizados con una ANOVA de una vía. Las diferencias entre las medias atP\0.05 se analizaron mediante la prueba de Tukey (Zar, 1996).

Empleando el Paquete de análisis Statistica versión 7.0 (software, Arizona, EE.UU.).

### 5.4 Resultados

Al momento de la disección todos los peces presentaron el sistema digestivo lleno. Sin embargo, en los muestreos posteriores se observaron dos peces que presentaban un patrón anormal en la evacuación gástrica, los cuales se descartaron para los cálculos siguientes. El cálculo de la progresión de la ingesta (en la parte delantera) a lo largo del intestino (LI) después de la alimentación en relación con el tiempo, se incluyó en una ecuación logarítmica (Figura 5). El tiempo para realizar el paso intestinal se calculó mediante la sustitución de "Y" en la ecuación por la longitud media del aparato digestivo obtenido de todos los peces muestreados ( $n = 50$ ,  $620 \text{ mm} \pm 15$ ). El valor obtenido sobre el tiempo de progresión fue de 430 min (7.15 h). Además, el tiempo medio de paso de los alimentos a lo largo de cualquiera del IP o ID se estimó teniendo en cuenta su longitud media respectiva, siendo 320 y 250 minutos, respectivamente.

La actividad de las dos proteasas alcalinas, la tripsina y la quimotripsina, fueron medidas en diferentes momentos después de la ingestión de alimentos en las dos secciones del intestino (IP e ID), las cuales se presentan en la figura 6.

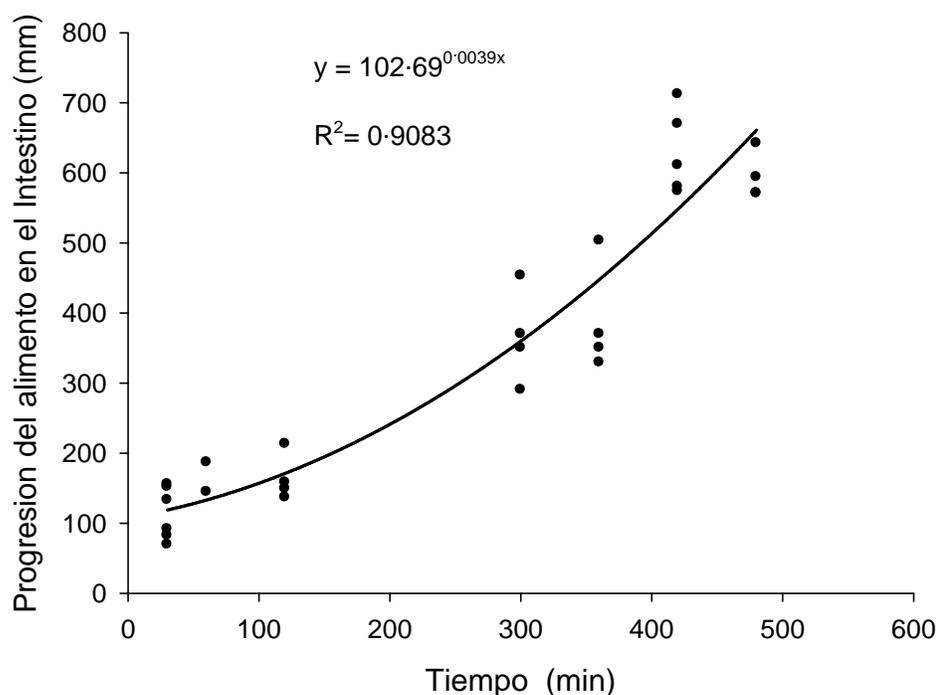


Figura 5.- Progresión del alimento con respecto al tiempo de residencia en el intestino de juveniles de tilapia.

A pesar de las grandes variaciones individuales, se observa un incremento claro y progresivo en la actividad de la tripsina con respecto al tiempo registrado en el IP con valores significativamente más altos ( $p < 0.05$ ) a 360, 480 y 610 minutos en comparación con los tiempos iniciales. La actividad máxima observada fue de casi 26 mU, alcanzando el máximo peso del tejido (TWT) 6 horas después a partir del tiempo 0 (estómago vacío). Esto podría ser considerado la máxima producción de tripsina disponible para la digestión en el intestino de esta especie, aunque el valor medio calculado para todo el período fue de  $15.9 \pm 3.6$  mU por TWT. La actividad de la tripsina medida en el ID fue mucho menor y se mantuvo relativamente constante durante todo el tiempo de observación ( $2.39 \pm 1.00$  mU por TWT). En el caso de la quimotripsina, la actividad relacionada con el tiempo después de la ingestión de las dietas en el IP e ID no presentaron variaciones significativas.

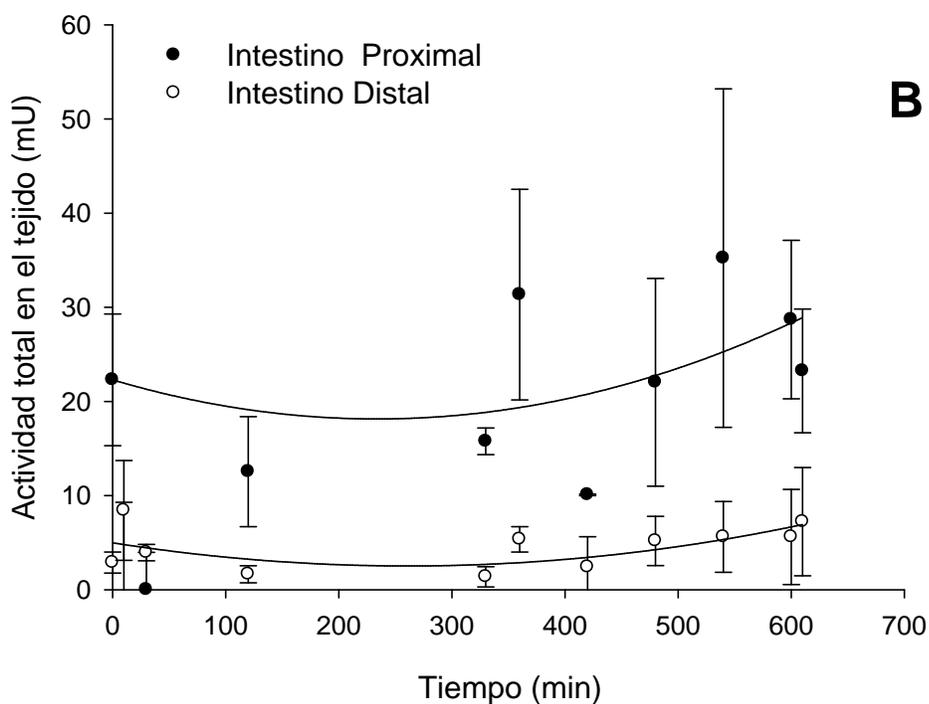
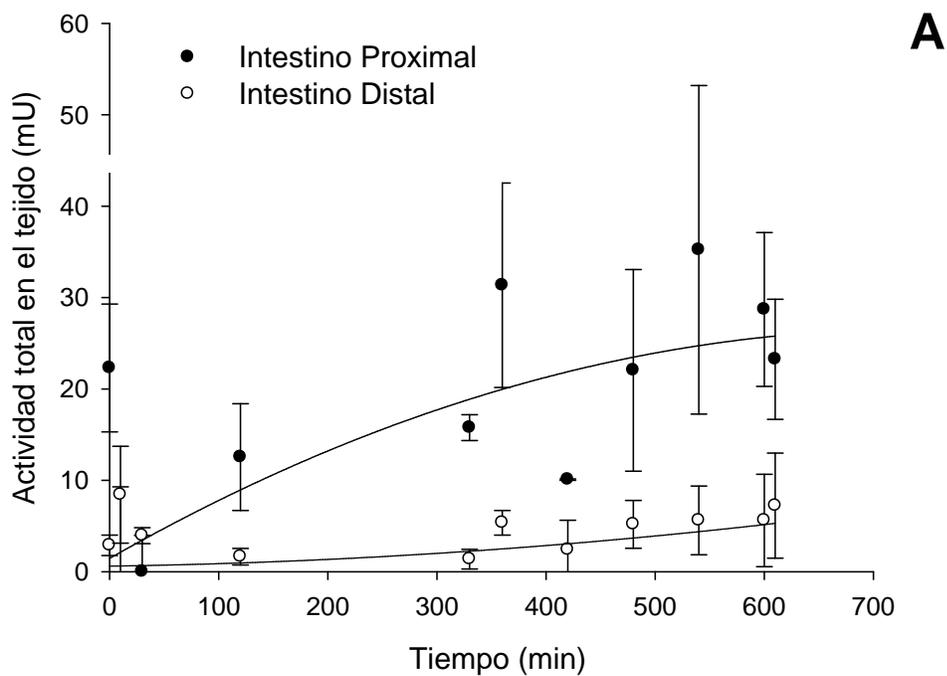


Figura 6.- Producción total de la tripsina (A) y quimotripsina (B) con respecto al tiempo después de la alimentación de los juveniles de tilapia.

En contraste a la tripsina, los valores más altos de actividad de la quimotripsina fueron medidos incluso pocos minutos después de la ingestión de los alimentos ( $24.41 \pm 1.26$  mU por TWT), presentándose una actividad mucho más baja en el intestino distal; ( $4.90 \pm 1.28$  mU por TWT).

Los valores de la eficiencia enzimática estimada para cada enzima y cada sección del intestino se concentraron en la Tabla 2. La combinación entre una concentración enzimática más alta y un mayor tiempo de residencia de la digesta en el IP dio como resultado valores mucho más altos (de seis a nueve veces más altos) en comparación con los obtenidos en el ID, los cálculos obtenidos de la estimación de la eficiencia enzimática obtenidos fueron de 5,100 vs 597  $\mu\text{mol}$  de la tripsina; 7,811 vs 1,225  $\mu\text{mol}$  para quimotripsina, en el IP e ID respectivamente.

Tabla 2.- Eficiencia enzimática (EE) estimada en las dos secciones del intestino en juveniles de tilapia

Intestino proximal			
	Tripsina	Quimotripsina	
Media de producción enzimática (mU)	$15.94 \pm 3.60$	$24.41 \pm 1.26$	
Tiempo de residencia (min)	320	320	
Eficiencia enzimática estimada	5,100	7,811	
Intestino distal			
Media de producción enzimática (mU)	$2.39 \pm 1.00$	$4.90 \pm 1.28$	
Tiempo de residencia (min)	250	250	
Eficiencia enzimática estimada	597	1,225	

Eficiencia enzimática (expresado en  $\mu\text{mol}$  de p-nitroanilina) = media de la actividad enzimática (mU) X tiempo de residencia del alimento en la sección del intestino (min). El tiempo de residencia en cada sección fue calculado teniendo en cuenta la longitud promedio en la ecuación de la progresión del alimento.

### 5.5 Discusión

A pesar del gran número de trabajos publicados enfocados a la determinación del tiempo de evacuación gástrica en diferentes especies de peces (Andersen, 2001; Andersen y Beyer, 2005, 2007), muy pocos se han enfocado a la determinación del tiempo de tránsito intestinal (Storebakken et al., 1999). Esto puede deberse al hecho de que en peces que poseen estómago, el tiempo de retención y el pre-procesamiento de los alimentos en este órgano es el punto clave que determina el curso subsecuente de la digestión en el intestino. En los peces herbívoros como la tilapia, el estómago es reducido y apenas funcional o ausente por completo, por lo cual la digestión de los alimentos se produce principalmente en la parte anterior, así como en todo el tránsito intestinal en la que el tiempo para realizar la digestión es de suma importancia. Por esta razón, el presente estudio se enfocó a la determinación de la velocidad de tránsito intestinal.

En el presente trabajo, el tiempo total requerido para la evacuación intestinal en juveniles de tilapia se estimó en 7.15 h. Este es un corto período de tiempo para la finalización del tránsito digestivo cuando se compara con algunas evaluaciones reportadas en especies carnívoras: 20-60 h como el observado en el merlán *Merlangus merlangus* (L.) (Andersen, 1998), 5 a 17 h en *Lota lota lota* L. (Pääkkönen et al. 1999), o hasta 48 horas para el lucio del norte *Esox lucius* (Nilsson y Brömark, 2000). Sin embargo, tales tiempos de tránsito concuerdan con el rango de 2 a 6 h en varios peces de estómago reducido como el eperlano alto *Atherinops affinis* L. (Logothetis et al., 2001). El pez loro (*Scarus gibbus* L. y *Scarus jonesi* L. Smith y Paulson, 1974), la lagartina *Parablennius sanguinolentus* a una temperatura entre 20 y 30 °C (Horn y Gibson, 1990). Sin embargo, un tiempo de tránsito intestinal más largo (12–20 h), fue reportado para el Butterfish *Odax pullus* de estómago pequeño a temperaturas entre 13 y 15 °C (Clements y Rees, 1998).

Un gran número de factores puede afectar el tiempo de tránsito de la digesta en el intestino de los peces. Algunos de ellos dependen de las características anatómicas del pez (talla del pez, presencia o ausencia de estómago, longitud total del intestino, etc.), por otra parte existen factores externos, como la temperatura del agua (Singh-Renton y Bromley, 1996; Pääkkönen y Marjomäki, 1997; Hurst, 2004), tamaño del alimento (Daan, 1973; Bagge, 1977; Andersen, 1999) o la calidad del alimento (Klumpp y Nichols, 1983; Targett y Targett, 1990; Fris y Horn, 1993; Polunin et al., 1995). Este último parece influir en gran medida el tiempo de paso de los alimentos, para mantener un adecuado flujo de nutrientes, ya que el consumo continuo de alimentos de baja calidad, se traduce en un mayor tiempo de tránsito (Horn y Messer, 1992). La temperatura del agua en la que los peces se mantuvieron (28,5 °C) combinado con el punto anterior podría explicar el corto tiempo de tránsito intestinal registrado en el presente estudio en juveniles de tilapia.

Un gran número de estudios se han orientado a la cuantificación de las proteasas digestivas en el intestino de diferentes peces (Drewe et al., 2004; Lundstedt et al., 2004; Chakrabarti et al., 2006; Jun-Sheng et al., 2006). La mayoría de estos estudios están enfocados a la generación de información acerca de actividades específicas en relación en la evaluación de proteínas solubles o tejidos. En el presente estudio, se evaluó la actividad enzimática tomando en cuenta tanto las unidades de actividad por gramo de tejido y la masa de tejido correspondiente, lo que se definió como "la capacidad" según Kuz'mina (1996). Sin embargo, se ha realizado un reducido número de estudios enfocados a la estimación de la producción de una enzima determinada como un conjunto en diferentes partes del intestino o del organismo (Logothetis et al., 2001; Papoutsoglou y Lyndon, 2006b). La realización de este tipo de estudios podría dar lugar a una mejor comprensión acerca de la capacidad que poseen las diferentes especies para hidrolizar substratos teniendo en cuenta las diferencias existentes en el tamaño del tracto digestivo de cada

especie. En el presente estudio, claras diferencias en la actividad entre tripsina y quimotripsina fueron encontradas al comparar el IP e ID registrándose valores aproximadamente seis veces más altos en el primero sobre el segundo. Esto podría explicarse tomando en cuenta que la porción duodenal del intestino es el lugar donde las enzimas pancreáticas son liberadas. Lo cual concuerda con los resultados obtenidos en diferentes estudios en los que se han comparado peces herbívoros, omnívoros y carnívoros, y cuyos resultados mencionan una mayor actividad de la tripsina en la región proximal del intestino (Hofer y Schiemer, 1981; Bitterlich, 1985; Chakrabarti et al., 1995; Einarsson et al., 1996). La mayor actividad de la tripsina en el IP puede intensificar la hidrólisis de las proteínas para la absorción de aminoácidos, en particular para los omnívoros y herbívoros que se alimentan de una dieta baja en proteínas y nitrógeno (Hofer y Schiemer, 1981; Bitterlich 1985). Estas diferencias entre el IP e ID son aún más evidentes cuando se observan los valores de la EE que se muestran en la Tabla 2, los cuales se calcularon tomando en cuenta el tiempo disponible para la hidrólisis durante la permanencia de los alimentos en una porción del intestino y la actividad promedio de la enzima durante dicho tiempo. En el presente estudio, la combinación entre una mayor actividad de ambas proteasas y un mayor tiempo de permanencia en el IP dieron como resultado valores claramente más alto de EE para esta sección intestinal. En este sentido, una EE similar puede ser alcanzada con una alta producción de enzimas combinada con un corto tiempo de permanencia de los alimentos en el intestino o con una actividad enzimática baja y un tiempo más largo de la permanencia de los alimentos en el intestino. El cálculo de la EE puede ser más precisa al comparar la función digestiva entre diferentes especies de peces como ha sido evaluado por Chan et al. (2004). Estos autores encontraron que algunos peces herbívoros presentaron actividades de tripsinas similares o superiores a las especies carnívoras, posiblemente para maximizar la eficiencia de las proteínas digestivas para compensar su dieta con una baja constitución proteica. Por otra parte, el largo tracto

digestivo que poseen los herbívoros se traduce en un incremento en el tiempo de digestión o en una mayor superficie de absorción, esto para incrementar la eficiencia digestiva.

La actividad relativa de las principales proteasas alcalinas digestivas, como la tripsina y la quimotripsina, se han propuesto como un indicador del estado nutricional de los peces. Por lo tanto, una alta actividad tipo tripsina:quimotripsina se ha correlacionado con la presencia de una dieta con una adecuada constitución proteica, mientras que un valor bajo se correlaciona con el factor hambre o la escasez de alimento (Hjelmeland et al., 1983; Pedersen et al., 1987; Ueberschar, 1995; Blier et al., 2002). Sin embargo, los peces de *O. niloticus* del presente experimento a los cuales se les proporcionó una buena alimentación mostraron el doble de actividad de la quimotripsina en comparación con el presentado por la tripsina. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que todos los estudios antes mencionados se llevaron a cabo sobre las especies carnívoras (principalmente salmónidos), que se caracteriza por un patrón de alimentación muy diferente que la presentada por especies herbívoras, como el *O. niloticus*. Esto último, puede ser una estrategia fisiológica vinculada con la presencia continua de alimentos en el intestino, una mayor producción de enzimas y la excreción continua como consecuencia de la reducción del tiempo en el paso por el intestino. Por lo tanto, al no presentarse picos claros en la actividad de la tripsina puede darse una alta relación tripsina:quimotripsina, donde una importante producción de la quimotripsina puede actuar como la base para la hidrólisis proteica.

### 5.6 Referencias

- Andersen NG (1998) The effect of meal size on gastric evacuation in whiting. *Journal of Fish Biology* 52: 743–755.
- Andersen NG (1999) The effects of predator size, temperature, and prey characteristics on gastric evacuation in whiting. *Journal of Fish Biology* 54: 287–301.

- Andersen NG (2001) A gastric evacuation model for three predatory gadoids and implications of using pooled field data of stomach contents to estimate food rations. *Journal of Fish Biology* 59: 1198–1217.
- Andersen NG, Beyer JE (2005) Mechanistic modelling of gastric evacuation in predatory gadoids applying the square root model to describe surface-dependent evacuation. *Journal of Fish Biology* 67: 1392–1412.
- Andersen NG, Beyer JE (2007) How are prey fishes of multiple meals evacuated from the stomach of a piscivorous fish? *Journal of Fish Biology* 71: 219–234.
- Anderson TA (1991) Mechanisms of digestion in the marine herbivore, the luderick, *Girella tricuspidata* (Quoy & Gaimard). *Journal of Fish Biology* 39: 535–547.
- Applebaum SL, Holt AJ (2003) The digestive protease, chymotrypsin, as an indicator of nutritional condition in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Marine Biology* 42: 1159–1167.
- Bagge O (1977) Meal size and digestion in cod (*Gadus morhua* L.) and sea scorpion (*Myoxocephalus scorpius* L.). *Meddelelser fra Danmarks Fiskeri-og Havundersøgelser* 7: 437–446.
- Bitterlich G (1985) Digestive enzyme pattern of two stomachless filter feeders, silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* Val., and bighead carp, *Aristichthys nobilis* Rich. *Journal of Fish Biology* 27: 103–112.
- Blier PU, Lemieux H, Devlin RH (2002) Is the growth rate of fish set by digestive enzymes or metabolic capacity of the tissues? insight from transgenic coho salmon. *Aquaculture* 209: 379–384.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Cara B, Moyano FJ, Zambonino JL, Fauvel C (2007) Trypsin and chymotrypsin as indicators of nutritional status of post-weaned sea bass larvae. *Journal of Fish Biology* 70: 1798–1808.

- Chakrabarti I, Gani A, Chaki KK, Sur R, Misra KK (1995) Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 112: 167–177.
- Chakrabarti I, Rathore RM, Kumar S (2006) Study of digestive enzyme activities and partial characterization of digestive proteases in a freshwater teleost, *Labeo rohita*, during early ontogeny. *Aquaculture Nutrition* 12: 35–43.
- Chan AS, Horn MH, Dickson KA, Gawlicka A (2004) Digestive enzyme activities in carnivores and herbivores: comparisons among four closely related prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae) from a California rocky intertidal habitat. *Journal of Fish Biology* 65: 848–858
- Clements KD, Rees D (1998) Preservation of inherent contractility in isolated gut segments from herbivorous and carnivorous marine fish. *Journal of Comparative Physiology B* 168: 61–72.
- Daan N (1973) A quantitative analysis of the food intake of the North Sea cod, *Gadus morhua*. *Netherlands Journal of Sea Research* 8: 27–48.
- Drewe KE, Horn MH, Dickson KA, Gawlicka A (2004) Insectivore to frugivore: ontogenetic changes in gut morphology and digestive enzyme activity in the characid fish *Brycon guatemalensis* from Costa Rican rainforest streams. *Journal of Fish Biology* 64: 890–902.
- Einarsson S, Davies PS, Talbot C (1996) The effect of feeding on the secretion of pepsin, trypsin and chymotrypsin in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Fish Physiology and Biochemistry* 15: 439–446.
- Erlanger BF, Kokorsky N, Cohen W (1961) The Preparation and Properties of Two New Chromogenic Substrates of Trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 96: 271–278.
- Fris MB, Horn MH (1993) Effects of diet of different protein content on food consumption, gut retention, protein conversion, and growth of *Cebidichthys violaceus* (Girard), an herbivorous fish of temperate zone marine waters. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 166: 183–202.
- Hjelmeland K, Huse I, Jorgensen T, Molvik G, Raa J (1983) Trypsin and trypsinogen as indices of growth and survival potential of cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Flodevigen Rapportser* 3: 1–17.

- Hofer R, Schiemer F (1981) Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits. *Oecologia* 48: 342–345.
- Horn MH, Gibson RN (1990) Effects of temperature on the food processing of three species of seaweed-eating fishes from European coastal waters. *Journal of Fish Biology* 37: 237–247.
- Horn MH, Messer KS (1992) Fish guts as chemical reactors: a model of the alimentary canals of marine herbivorous fishes. *Marine Biology* 113: 527–535.
- Hurst TP (2004) Temperature and state-dependence of feeding and gastric evacuation in juvenile Pacific halibut. *Journal of Fish Biology* 65: 157–169.
- Jun-sheng L, Jian-lin L, Ting-ting W (2006) Ontogeny of protease, amylase and lipase in the alimentary tract of hybrid Juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 32: 295–303.
- Klumpp DW, Nichols PD (1983) Nutrition of the southern sea garfish *Hyporhamphus melanochir*: gut passage rate and daily consumption of two food types and assimilation of seagrass components. *Marine Ecology Progress Series* 12: 207–216.
- Kuz'mina VV (1996) Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. *Aquaculture* 148: 25–37.
- Liu ZY, Wang Z, Xu SY, Xu LN (2008) Partial characterization and activity distribution of proteases along the intestine of grass carp. *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *Aquaculture Nutrition* 14: 31–39.
- Logothetis EA, Horn MH, Dickson KA (2001) Gut morphology and function in *Atherinops affinis* (Teleostei: Atherinopsidae), a stomachless omnivore feeding on macroalgae. *Journal of Fish Biology* 59: 1298–1312.
- Lundstedt LM, Bibiano MJF, Moraes G (2004) Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 137: 331–339.

- Moyano FJ, Díaz M, Alarcón FJ, Sarasquete MC (1996) Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry* 15: 121–130.
- Nilsson PA, Brönmark CB (2000) The role of gastric evacuation rate in handling time of equal-mass rations of different prey sizes in northern. *Journal of Fish Biology* 57: 516–524.
- Olsson C, Holmgren S (2001) The control of gut motility. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 128: 481–503.
- Pääkkönen J-PJ, Marjomäki TJ (1997) Gastric evacuation rate of burbot fed single-fish meals at different temperatures. *Journal of Fish Biology* 50: 555–563.
- Pääkkönen J-PJ, Myyä R, Marjomäki TJ (1999) The effect of meal size on the rate of gastric evacuation of burbot. *Lota lota* (L.). *Ecology of Freshwater Fish* 8: 19–54.
- Papoutsoglou ES, Lyndon AR (2005) Effect of incubation temperature on carbohydrate digestion in important teleosts for aquaculture. *Aquaculture Research* 36: 1252–1264.
- Papoutsoglou ES, Lyndon AR (2006a) Digestive enzymes of *Anarhichas minor* and the effect of diet composition on their performance. *Journal of Fish Biology* 69: 446–460.
- Papoutsoglou ES, Lyndon AR (2006b) Digestive enzymes along the alimentary tract of the parrotfish *Sparisoma cretense*. *Journal of Fish Biology* 69: 130–140.
- Pedersen BH, Nilssen EM, Hjelmeland K (1987) Variation in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring *Clupea harengus* digesting copepod nauplii. *Marine Biology* 94: 171–181.
- Polunin NVC, Harmelin-Vivien M, Galzin R (1995) Contrasts in algal food processing among five herbivorous coral-reef fishes. *Journal of Fish Biology* 47: 455–465.
- Scocco P, Menghi G, Ceccarelli P (1997) Histochemical differentiation of glycoconjugates occurring in the tilapia intestine. *Journal of Fish Biology* 51: 848–857.

Singh-Renton S, Bromley PJ (1996) Effects of temperature, prey type and prey size on gastric evacuation in small cod and whiting. *Journal of Fish Biology* 49: 702–713.

Smith RL, Paulson AC (1974) Food transit times and gut pH in two Pacific parrotfishes. *Copeia* 1974:796–799.

Storebakken T, Kvien IS, Shearer KD, Grisdale-Helland B, Helland SJ (1999) Estimation of gastrointestinal evacuation rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using inert markers and collection of faeces by sieving: evacuation of diets with fish meal, soybean meal or bacterial meal. *Aquaculture* 172: 291–299.

Targett TE, Targett NM (1990) Energetics of food selection by the herbivorous parrotfish *Sparisoma radians*: roles of assimilation efficiency, gut evacuation rate, and algal secondary metabolites. *Marine Ecology Progress Series* 66: 13–21.

Ueberschär B (1995) The use of tryptic enzyme activity measurement as a nutritional condition index: laboratory calibration data and field application. *ICES-Journal of Marine Science* 201: 119–129.

Zar JH (1996) *Biostatistical analysis*, 3rd edn. Prentice Hall, NJ, p 718.

VI. Evaluación del efecto de harinas de origen vegetal como inhibidores de proteasas digestivas en los tres cíclidos.

### 6.1 Resumen

Se evaluó el efecto de inhibidores de proteasas en diferentes fuentes de origen vegetal sobre la actividad de las proteasas digestivas de *P. splendida*, *M. urophthalmus* y *O. niloticus*. Los extractos enzimáticos se realizaron a partir del estómago e intestino. Para medir la inhibición, se utilizaron cantidades crecientes de extracto de harina vegetal (0.6, 0.13, 0.29, 0.65, 1.13, 1.76, 2.63, 3.95 y 6.14 mg/mL). Los extractos de las enzimas fueron ajustados para proporcionar 38 UA (unidades de actividad). Se realizaron electroforesis de proteínas SDS-PAGE para revelar el efecto de inhibición de las proteasas. Los resultados obtenidos, muestran que los extractos enzimáticos de los peces presentaron sensibilidad ante los antinutrientes presentes en las harinas evaluadas. *P. splendida* fue la que registro los mayores porcentajes de inhibición con respecto a la *M. urophthalmus* y *O. niloticus*. La harina que mostró menor aceptación (alto poder de inhibición de la actividad proteasa) por los peces fue la harina de soja. La electroforesis reveló que las proteasas que fueron inhibidas por las fuentes vegetales corresponden al tipo tripsina y quimotripsina. Por lo que se concluyó que las fuentes vegetales contienen una amplia variedad de antinutrientes inhibidores de proteasas intestinales afectando a las especies en estudio.

Palabras claves: Proteasas, inhibidores, harinas vegetales, antinutrientes

### 6.2 Introducción

Los productos alimenticios con mayor demanda a nivel mundial son los animales y en ello están los peces, estos organismos representan un importante aporte de nutrientes esenciales para la alimentación. Su principal fuente de abastecimiento ha sido la pesca, pero esta se ha visto afectada por la sobreexplotación (Mente et al., 2011; FAO, 2012). En este sentido la FAO, (2018) estimó que una producción histórica para el 2016 de 171 millones de toneladas, el 88% (151 millones de toneladas) se destinan al consumo humano y el 12% (20 millones de toneladas) se designa a la elaboración de harina y aceite de pescado. Asimismo, la acuicultura es una alternativa viable para cubrir la demanda de recurso; es el sector que presenta el mayor ritmo de crecimiento en la producción de alimentos de origen animal con una producción histórica para el 2013 de 97 millones de toneladas (FAO, 2015).

La harina de pescado (HP) es el principal ingrediente utilizado en la formulación de alimentos balanceados para organismos terrestres y acuáticos, especialmente se debe a su atractabilidad, palatabilidad, composición y su valor nutritivo relativamente superior a otras harinas (El-Sayed, 1990; El-Sayed and Tshima, 1991; Dong-Fang et al., 2011). Sin embargo, las bajas producciones de las pesquerías han causado incrementos en los costos de producción, siendo la HP quien aporta los mayores porcentajes de proteína (45 hasta 60%) durante la fabricación de los piensos (Tacon, 1995). Es por ello, que los nutricionistas están evaluado fuentes alternativas de proteínas. No obstante, las proteínas de origen vegetal son una buena alternativa ya que se ha observado que su inclusión en cantidades adecuadas en los piensos; garantizando la disponibilidad y el menor coste que estas presentan en el mercado (Krogdahl, 1986). Existe una gran variedad de ingredientes y subproductos vegetales que pueden ser utilizadas en los alimentos balanceados, aunque primeramente deben de ser analizadas para determinar la cantidad de inclusión más adecuada.

La inclusión de harinas de origen vegetal en la fabricación de piensos reduce costos de producción en los sistemas de cultivo. Sin embargo, el problema que conlleva la utilización de estas fuentes alternativas es el bajo contenido de proteína y ácidos grasos esenciales (Francis et al., 2001; Øverland et al., 2009). La otra limitación principal es la existencia de los factores antinutritivos que reducen la actividad y la cantidad de las enzimas proteolíticas y por lo tanto el crecimiento y la eficiencia de la alimentación reduciendo la digestibilidad en los peces (Huisman y Tolman, 1992; Moyano et al., 1999; Sveier et al., 2001; Maitra y Ray 2003; Kim et al., 2007; Salze et al., 2010). En este caso, para incluir las proteínas de las fuentes vegetales en la fabricación de los piensos se requieren de procesos tecnológicos como el tratamientos termales con el fin de inactivar o reducir el efecto de los antinutrientes (Alarcón et al., 1999).

Hasta la fecha, pocos estudios se han centrado en una evaluación detallada sobre los efectos de los inhibidores de proteasas digestivas en cíclidos. Sin embargo, Moyano et al., (1999) y El-Sayed et al. (2000) han descrito que la tilapia del Nilo (*O. niloticus*) presenta una respuesta de inhibición de proteasas al evaluar diferentes fuentes proteínicas vegetales (salvado de trigo, gluten de maíz y soja). Ya que las proteasas de los peces son altamente sensibles a los inhibidores es importante considerar que estas pueden diferir considerablemente por la diferencia de especies y hábitos alimenticios de estas (Kroghahl y Holm 1983; Tacon 1997; Krogdahl et al., 1994). El objetivo del presente estudio es evaluar el efecto de inhibidores de proteasas en diferentes fuentes proteicas de origen vegetal (soja, trigo, sorgo y salvado de trigo) sobre la actividad de las proteasas digestivas de *P. splendida*, *M. urophthalmus* y *O. niloticus*, la razón de evaluar estas harinas se debe a que son ampliamente utilizadas en la fabricación de piensos y la disponibilidad con la que se encuentran en la zona y de esta forma tener en cuenta las implicaciones que se pueden tener en formulaciones futuras para las especies en estudio.

### 6.3 Materiales y métodos

#### 6.3.1 Organismos

Los ensayos se llevaron a cabo con tractos digestivos liofilizados de tenguayaca (*P. splendida*), castarrica (*M. urophthalmus*) y tilapia (*O. niloticus*) provenientes del Laboratorio de Acuicultura Tropical de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT-DACBIOL). Los peces se mantuvieron en un sistema de circulación cerrada en tanques con una capacidad de 1,000 L. Se mantuvo una temperatura de  $32 \pm 1$  °C y oxígeno disuelto ( $6.40 \pm 0.28$  g/L) estos parámetros fueron determinados utilizando un oxímetro (YSI modelo 55, Yellow Springs, Ohio, USA), la concentración de amonio ( $0.41 \pm 0.16$  g/L), nitratos ( $0.28 \pm 0.15$  g/L) y nitrito ( $0.04 \pm 0.03$  g/L) (Strickland y Parsons, 1972) fueron medidos semanalmente. Los peces fueron alimentados con pienso comercial de la marca Pedregal Silver Cup (45 % de proteína y 16 % de lípidos).

#### 6.3.2 Extractos enzimáticos

Los peces se mantuvieron en ayuno por 24 horas; fueron sacrificados por sobredosis ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) del anestésico MS 222 (Metasulfonato de triclaína, Argent, Chemical Laboratories, Inc., Redmond, WA, U.S.A.), se mantuvieron en hielo hasta el procesado. A continuación, se disectaron los tractos digestivos completos, separando estómago e intestino realizando posteriormente un pool, se homogenizaron con agua milli-Q (1:10 peso/volumen) se utilizó un homogenizador de tejido marca Misonix (modelo Microson Ultrasonic Cell Disruptor, NY). Las muestras se centrifugaron a  $16,000 \times g$  durante 30 min a 4 °C, el sobrenadante se almacenó en tubos eppendorf y se conservaron en refrigeración a -20 °C. La concentración de proteína soluble en los extractos se determinó por el Método de Bradford (Bradford, 1976) usando como estándar una curva patrón de albúmina sérica bovina a razón de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ .

### 6.3.3 Preparación de los extractos de las harinas

Las harinas usadas en este estudio fueron obtenidas de empresas fabricantes de alimentos balanceados en México y del Departamento de Biología Aplicada, de la Universidad de Almería, España. Las harinas que fueron evaluadas son: soja (*G. max*), sorgo (*S. vulgare*), trigo (*T. aestivum*), y salvado de trigo. Los extractos de los inhibidores fueron obtenidos de acuerdo con García-Carreño et al. (1997). Las harinas fueron homogenizadas en agua milli-Q ( $100 \text{ mg/mL}^{-1}$ ) y posteriormente fueron encubadas durante un periodo de 180 minutos a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , el extracto obtenido se centrifugó a  $16,000 \times g$  durante un periodo 30 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . El sobrenadante se conservó en tubos eppendorf a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 6.3.4 Cuantificación de la actividad proteasa

La actividad de las proteasas alcalinas, se evaluó de acuerdo al método propuesto por Walter (1984), se agregaron  $20 \mu\text{L}$  de extracto enzimático,  $0.5 \text{ mL}$  de caseína Hammerstein al 1%, tampón Tris-HCl  $50 \text{ mM}$  a  $\text{pH } 9.0$ , la mezcla se encubó durante  $60 \text{ min}$  a una temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , la reacción se detuvo agregando  $0.5 \text{ mL}$  de TCA al 20%. Posteriormente se mantuvo la mezcla de reacción durante  $10 \text{ min}$  en refrigeración a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , se centrifugó a  $16,000 \times g$  durante  $30 \text{ min}$  a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . La absorbancia de los péptidos solubles liberados por el TCA se midió a  $280 \text{ nm}$  en un espectrofotómetro UV/visible. Una unidad de actividad enzimática, se definió como  $1 \mu\text{g}$  de tirosina liberado en  $1 \text{ min}$ , usando el coeficiente de extinción molar de la tirosina de  $1,290$ , todas las medidas se hicieron por triplicado.

### 6.3.5 Inhibición de la actividad de proteasa con extractos de las harinas.

El efecto inhibitor de las harinas fue evaluado midiendo la reducción de la actividad proteasa alcalina de acuerdo con lo propuesto por García-

Carreño (1996). El ensayo consistió en agregar 20  $\mu$ L del extracto de las harinas y 20  $\mu$ L del extracto enzimático. Una segunda sección de tubos, se utilizó únicamente como control de la actividad donde se incubó solamente con agua destilada, se agregó 0.5 mL de buffer (50 mM TRIS·HCl, pH 9.0) estas relaciones fueron incubadas durante 60 min a 25 °C, la actividad residual de la proteasa fue evaluada usando 0.5 mL de caseína Hammerstein al 1 % y incubando nuevamente durante 30 min a 37 °C, la reacción se detuvo agregando 0.5 mL de TCA al 20%, posteriormente la mezcla de reacción se mantuvo durante 10 min en refrigeración a 4 °C, se centrifugó a 16,000 x g durante 30 min a 4 °C. Cada sección de tubos conto con su respectivo control en el cual se les agregó 0.5 mL de TCA antes de agregar la caseína, de esta manera las absorbancias obtenidas en los blancos fueron restados de los tratamientos de inhibición, todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

El efecto de la inhibición de la proteasa fue determinada con respecto a la reducción de la actividad enzimática en relación con el de los controles, por lo que los resultados se expresan en porcentajes de inhibición. Para observar la inhibición se utilizaron cantidades crecientes de extracto de harina vegetal (0.6, 0.13, 0.29, 0.65, 1.13, 1.76, 2.63, 3.95 y 6.14 mg/mL). Los extractos de la enzima fueron ajustados para proporcionar 38 UA (unidades de actividad).

### 6.3.6 Detección del efecto de inhibidores sobre en enzimas específicas con sustrato-SDS-PAGE

Se realizaron electroforesis de proteínas SDS-PAGE de las preparaciones enzimáticas de acuerdo con Laemmli (1970), usando geles de 8 x 10 x 0.075 cm y 12% de acrilamida. La preparación de las muestras y los zimogramas de las actividades proteasa de las distintas fracciones separadas por electroforesis se realizaron según García-Carreño et al., (1993). Previamente, las muestras fueron filtradas a través de una

columna Sephadex G-25S (1/10, v/v). Se tomó 4.5  $\mu$ L de los extractos enzimáticos (contenían 38 UA) y fueron mezclados con 4.5  $\mu$ L del extracto de las harinas, la mezcla fue incubada durante 60 min a temperatura ambiente; los controles fueron hechos usando 4.5  $\mu$ L de agua destilada sustituyéndola por los extractos de las harinas. Las electroforesis se llevaron a cabo a voltaje constante de 100 V por gel durante 60 min a 5 °C. Posteriormente, los geles fueron lavados e incubados en caseína Hammerstein al 0.5%, pH 9, durante 30 min a 5 °C y después se transfirieron a la misma solución durante 90 min a 37 °C, sin agitación. A continuación, fueron lavados y fijados con TCA al 12% previamente a su tinción con azul Coomassie (BBC R-250) al 0,1% en una solución metanol-ácido acético-agua (50:20:50). El desteñido se llevó a cabo en una solución metanol-ácido acético-agua (35:10:50).

Se usó un marcador de peso molecular de bajo rango (BIO-RAB número de catálogo 161-0304 SDS-PAGE Standards) se incluyó en cada gel (5 mL). El marcador de peso molecular contenía los siguientes marcadores de proteínas: fosforilasa B (97.4 kDa), albúmina de suero bovino (66.2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina de soja (20.5 kDa) y lizoenzima (14.4 kDa).

### 6.4 Resultados

Las actividades proteolíticas totales y la proteína soluble, que se determinaron en los extractos de los peces se muestran en la tabla 3. Los promedios de las actividades de las proteasas alcalinas, muestran que las castarrica presentan mayor actividad enzimática con respecto a las otras especies en estudio, caso similar en la proteína soluble. Estos resultados, proporcionaron la base para el diseño de los experimentos de inhibición, permitiendo preparar las mezclas de la incubación conteniendo las mismas unidades de actividad enzimática (38 UA).

Tabla 3.- Actividad de las proteasas alcalinas y proteína soluble de los extractos intestinales de la *P. splendida*, *M. urophthalmus* y *O. niloticus*. (Valores promedio  $\pm$  desviación estándar).

Especie	Actividad proteasa U mg proteína <sup>-1</sup>	Proteína soluble mg mL <sup>-1</sup>
<i>P. splendida</i>	38.0 $\pm$ 11.9	6.28 $\pm$ 2.26
<i>M. urophthalmus</i>	2,348.0 $\pm$ 25.7	6.96 $\pm$ 2.08
<i>O. niloticus</i>	813.0 $\pm$ 6.5	5.71 $\pm$ 1.33

Las curvas de inhibición con concentraciones crecientes de las harinas evaluadas exhiben que las tres especies presentan respuestas positivas de inhibición de las proteasas, desde concentraciones bajas del extracto vegetal llegando a afectar la actividad enzimática como se presenta en la figura 7. Las especies presentaron mayor sensibilidad para la inhibición de las proteasas ante la presencia de la harina de soja con respecto a las otras harinas, siendo *P. splendida* la que ha exhibió el mayor porcentaje de inhibición desde las bajas concentraciones del extracto (0.13  $\mu$ g harina/unidad de actividad), con respuestas de inhibición desde 24% hasta alcanzar inhibición del 95% a una concentración de 6.16  $\mu$ g harina/unidad de actividad. Respuesta, similar de altos porcentajes de inhibición se hicieron presentes en las harinas de sorgo (90%) y salvado de trigo (95%) a una concentración de 6.16  $\mu$ g harina/unidad de actividad. Esto hace evidente la alta sensibilidad de las proteasas de *P. splendida* a los inhibidores presentes en estas fuentes de proteínas vegetales.

Por otra parte, las proteasas de *O. niloticus* y *M. urophthalmus* mostraron menor sensibilidad al efecto inhibitor de las harinas de sorgo y trigo alcanzando un porcentaje máximo de inhibición del 20% con la mayor

concentración del extracto de las harinas. Sin embargo, en el caso de la fuente proteínica del salvado de trigo presentó un mayor porcentaje de inhibición para las proteasas en *M. urophthalmus* con un 77% a una concentración de 6.16 µg harina/unidad de actividad.

Las respuestas de inhibición de las harinas, sobre los extractos enzimáticos de los peces son contrastadas por zimogramas SDS-PAGE (Figura 8); donde se exhibe el efecto de sensibilidad de las proteasas a la mayor concentración de harinas y gradualmente se va observando una disminución en la intensidad de las bandas activas con respecto al control.

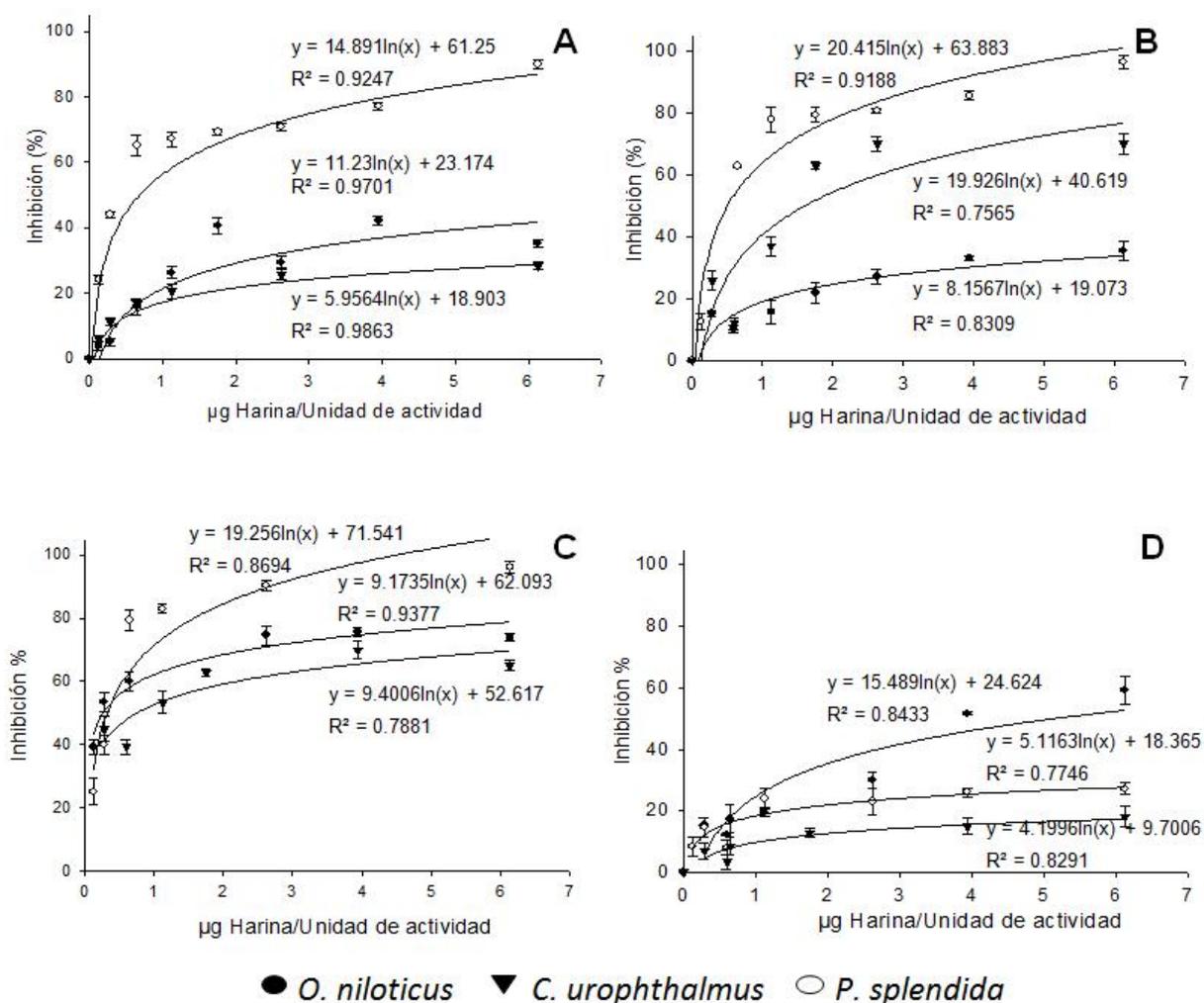
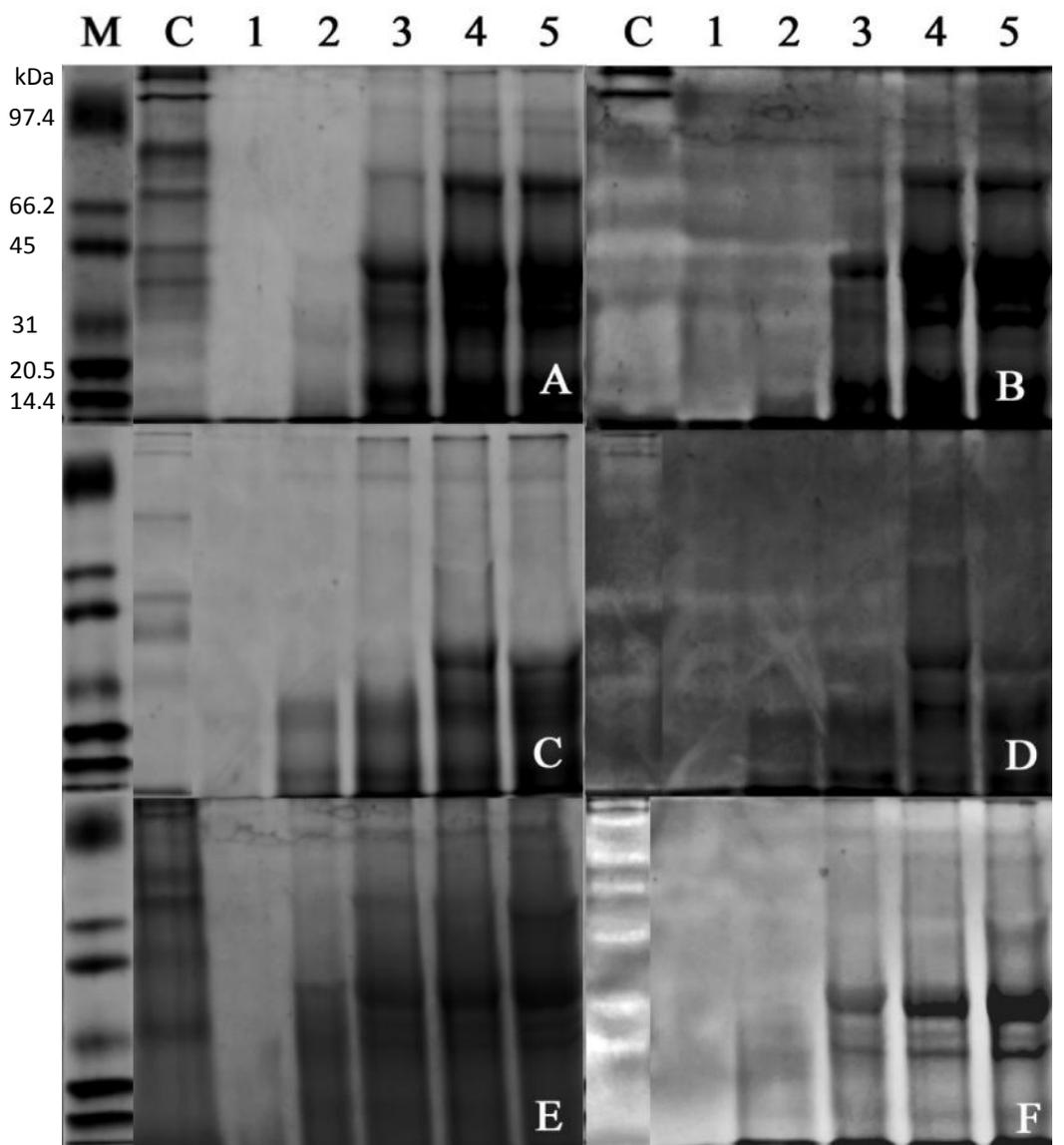


Figura 7.- Inhibición de la actividad proteasa alcalina obtenida después de 1 hora de incubación con extractos enzimáticos de los diferentes peces frente a incrementos de concentración de harina: A) sorgo, B) salvado de trigo, C) soja y D) trigo.



(mg/mL) C 0.6 0.13 1.13 2.63 3.95 C 0.6 0.13 1.13 2.63 3.95

Figura 8.- Zimograma sobre el efecto de inhibición durante la actividad alcalina frente a incrementos de concentración de harina de soja: Tilapia A) proteína extracto, B) harina de soja. Tenguayaca C) proteína extracto, D) harina de soja. Castarrica E) proteína extracto, F) harina de soja. Marcador de peso molecular: fosforilasa B (97.4 kDa), albúmina de suero bovino (66.2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina de soja (20.5 kDa) y lisozima (14.4 kDa).

## 6.5 Discusión

En la acuicultura, es evidente la inclusión de harinas alternativas de origen vegetal o animal para la fabricación de piensos con el objetivo de reducir el aporte de harina de pescado y los costos de producción (Smith et al., 2018; Younis et al., 2018; Zhou et al., 2019). Sin embargo, estas harinas presentan reducción en los valores nutritivos debido a la presencia de factores antinutricionales (García-Carreño et al., 1997; Alarcón et al., 1999, Francis et al., 2001; Kokou y Fountoulaki, 2018). Dicho efecto, fue observado en esta investigación actual donde los juveniles de *P. splendida* mostraron mayor sensibilidad a los efectos de inhibición de las harinas evaluadas (soja, sorgo, trigo y salvado de trigo) con valores desde el 24 hasta un 95%, siendo la harina de soja la que presentó el mayor porcentajes de inhibición para las tres especies, aunque para *O. niloticus* y *M. urophthalmus* la inhibición fue menor (20 a 65% respectivamente). Por lo tanto, la soja al ser una leguminosa presenta factores antinutricionales, particularmente inhibidores de proteasas reduciendo de esta manera la capacidad hidrolítica de las enzimas digestivas de los organismos estudiados (Hendricks y Bailey, 1989; Tacon, 1997; Álvarez-González et al., 2008). Por su parte, el resto de las harinas pertenecen al grupo de las gramíneas y se observó que estos ingredientes también afectan a las enzimas de las *P. splendida* siendo las más sensibles y en menor medida inhibió la actividad de los juveniles de *O. niloticus* y *M. urophthalmus*. Lo anterior coincide con Liener (1980; 1989) donde se manifiesta que las gramíneas también tienen inhibidores de proteasas. Estos mismos efectos han sido confirmados en otras especies como la dorada *Sparus aurata* (Robaina et al., 1995; Alarcón et al., 1999; Benjakul et al., 1999); tilapia *O. niloticus* (Moyano et al., 1999; El-Sayed et al., 2000); lenguado africano *Solea senegalensis* (Moyano et al., 1999); pargos *Lutjanus argentiventris* y *L. novemfasciatus* (Alarcón et al., 2001) y el guapote *Parachromis dovii* (Valverde-Chavarri et al., 2016).

En este mismo orden de ideas, el valor nutricional de las leguminosas y gramíneas, pueden estar limitado por los diversos inhibidores de proteasas, como el caso de la presencia de los inhibidores tipo Kunitz que interactúa principalmente con la tripsina y tipo Bowman-Birk inhibe tanto la tripsina como la quimotripsina (Obara y Watanabe 1971; Krogdahl y Holm 1981; Dabrowski, 1989; Norton, 1991; Graber y Condoret, 1992; El-Sayed et al., 2000). Otra característica adicional, es la deficiencia de aminoácidos estructurales que presentan los ingredientes vegetales con relación a algunas de sus fracciones proteínicas, por lo que tienen que complementar con aminoácidos sintéticos (cisteína y metionina) para equilibrar el perfil de aminoácidos acorde a los requerimientos de cada especie (Liener, 1994; Carter y Hauler, 2000; van Barneveld et al., 2000). Sin embargo, las fuentes vegetales también presentan otro tipo de factores antinutricionales como algunos carbohidratos y las lectinas (Liu, 1997; Jansman et al., 1998; Francis et al., 2001). En este caso, hay estudios donde manifiestan que el exceso de carbohidratos trae problemas de glucemia y baja digestibilidad (Brauge et al., 1994, Wilson, 1994; McGoogan y Reigh, 1996) y las lectinas interfieren en el metabolismo de intestino delgado y presentan afectaciones morfológicas de las vellosidades del tracto intestinal (Grant, 1991). Es importante destacar, que estos factores antinutricionales presentes en las harinas vegetales (leguminosas y gramináceas), pueden reducirse significativamente empleando tratamientos térmicos, generalmente regulados para no alterar la calidad nutricional de las fuentes vegetales por la desnaturalización de las proteínas por el exceso de temperatura (Reinitz et al., 1978; Viola et al., 1983; Tacon y Jackson, 1985; Wee y Shu, 1989).

Por otra parte, los juveniles de *P. splendida* presentaron la mayor sensibilidad ante los inhibidores de proteasas presentes en las harinas evaluadas en comparación con *O. niloticus* y *M. urophthalmus*. En este aspecto, los hábitos alimenticios de las especies en estudio deben considerarse como otro factor al momento de incluir algún ingrediente de

origen vegetal. De esta manera, la *P. splendida* es una especie que presenta hábitos carnívoros (Santiago et al., 1997; Valtierra y Schmitter 2000); mientras *M. urophthalmus* y *O. niloticus* presentan hábitos omnívoros (Pillay, 1993; Martínez-Palacios y Ross, 1994; Fitzsimmons, 1997; Barrientos-Medina, 2003; Bergmann y Motta, 2005; Cuenca-Soria et al., 2013). Es así que se ha prestado poca atención a los efectos de la composición de la dieta sobre la actividad enzimática digestiva de los peces. Por ejemplo, los peces carnívoros presentan mayor capacidad para hidrolizar alimentos que están formulado a base de proteína de origen animal (Uscanga-Martínez et al., 2011a). Sin embargo, los alimentos donde se emplean proteínas vegetales requieren de más tiempo para la hidrólisis (Buddington et al., 1997) Lo anterior ha sido confirmado en el trabajo de Moyano et al. (2001) donde evaluaron la hidrólisis de harinas de origen animal y vegetal utilizando extractos enzimáticos con juveniles de la dorada (*S. aurata*) y se determinó que la harina de pescado presenta 10.89% de hidrólisis con respecto a la soya 5.56%, lupino 6.69% y gluten de maíz 5.76%. Debido a estos resultados, se considera que la *P. splendida* tiene capacidad para digerir alimentos ricos en proteínas de origen animal, principalmente debido al tipo de proteasas presentes en el digestivo (Uscanga-Martínez et al., 2011b). En este mismo sentido, se ha puesto de manifiesto que las respuestas fisiológicas de los peces ante la ingesta de alimentos que presentan inhibidores de proteasas es diversa y deben ser estudiadas por medio de bioensayos in vivo para lograr optimizar las fórmulas de las especies en cultivo (Melito y Tovar, 1995; Moyano 1999). Por su parte, *M. urophthalmus* es una especie que dentro de su paquete enzimático presenta proteasas ácidas y alcalinas de tipo tripsina, quimotripsinas aminopeptidas y carboxipeptidadasa (Cuenca-Soria et al., 2014). En el presente trabajo se detectó un menor porcentaje de inhibición para la *P. splendida* y una respuesta similar para *O. niloticus* que mostró un hábito alimenticio totalmente omnívoro (Uscanga et al., 2010). No obstante, El-Sayed (2000) demostró que la harina de salvado de trigo inhibe las proteasas de *O. niloticus*, lo que se pone de manifiesto

que son sensibles ante estas fuentes de proteína (Martínez et al., 1997). Una explicación ante estos resultados, es que dependiendo de la especie se pueden presentar una menor o mayor inhibición ante las fuentes de proteínas vegetales. Una respuesta fisiológica de los peces, está orientada a compensar la inhibición de la proteasa por una sobreproducción de enzimas y de esta manera minimizar el efecto inhibitorio de las harinas (Dabrowski, 1989; Moyano et al., 1999; El-Sayed 2000; Santiagosa 2008). Esto se ha visto en salmónidos (Harrod et al., 1996); truchas (Dabrowski et al., 1989; Krogh et al., 1994; Santiagosa 2008) y dorada (Santiagosa 2008). Queda en evidencia que, la actividad tipo pepsina, tripsina y quimotripsina serán variables según la especie, y éstas actuarán de acuerdo con el tipo y cantidades de inhibidor presente en las harinas vegetales con las que se formulan los alimentos balanceados.

Los zimogramas revelaron el efecto inhibitorio sobre las proteasas digestivas de la tilapia, tenguayaca y castarrica en la figura 9 (A, C, E) se muestran las bandas proteolíticas activas de los extractos sin harina. Sin embargo, en la figura 9 (B, D, F) se hace evidente el efecto de los inhibidores de la soja a concentraciones de 0.6 mg/mL. Este efecto, se ve reflejado en las bandas con un peso molecular que van de los 20.5 a 31 kDa aproximadamente, correspondiendo a proteasas de tipo tripsina, quimotripsina y pepsina. En trabajos anteriores, se confirma que este efecto de la soja se puede relacionar con una inhibición de tipo específica o Bowman-Birk, ya que inhibe a un grupo de proteasas tipo tripsina y quimotripsina (Alarcón et al., 1999; Moyano et al., 1999).

En el presente trabajo, se concluye que las fuentes alternativas de nutrientes de origen vegetal (sorgo, salvado de trigo, soja y trigo) presentan efecto de inhibición sobre las proteasas de los peces estudiados, siendo *P. spelindida* la que mostró mayor sensibilidad ante los inhibidores de proteasas con respecto a las *M. urophthalmus* y *O. niloticus*; lo que indica que estas fuentes vegetales contienen una amplia

variedad de inhibidores de proteasas intestinales, por lo que se requiere de mejores tratamientos para reducir el contenido de inhibidores y tomar en cuenta la cantidad de inclusión de estas harinas al momento de llevar a cabo formulaciones de alimentos para los peces. A pesar de, lo anterior es recomendable que se confirme con estudios in vivo, lo que permitirá que los organismos expresen todo su potencial enzimático durante la digestión de las fuentes vegetales.

### 6.6 Referencias

- Alarcón FJ, García-Carreño FL, Navarrete del Toro MA (2001) Effect of plant protease inhibitors on digestive proteases in two fish species, *Lutjanus argentiventris* and *L. novemfasciatus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 24: 179–189.
- Alarcón FJ, Moyano FJ, Díaz M (1999) Effect of inhibitors present in protein sources on digestive proteases of juvenile sea bream (*Sparus aurata*). *Aquatic Living Res.* 12(4):233–238.
- Álvarez-González CA, Márquez-Couturier G, Arias-Rodríguez L, Contreras-Sánchez WM, Uscanga-Martínez A, Perales-García N, Moyano-López FJ, Hernández-Jiménez R, Civera-Cerecedo R, Goytortua-Bores E, Isidro-Olán L, Almeida-Madrugal JA, Tovar-Ramírez D, Gutiérrez-Ribera JN, Arévalo-Galán LM, Gisbert E, Treviño L, Morales-Sánchez, B (2008) Avances en la fisiología digestiva y nutrición de la mojarra tenguayaca *Petenia splendida*. En: Cruz Suarez EL, Ricque Marie D, Tapia Salazar M, Nieto López M, Villarreal Cavazos D, Lazo Corvea J, Viana M (eds) Avances en Nutrición Acuícola IX. Memorias del Noveno Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Monterrey, N.L. México, pp. 135–235.
- Barrientos-Medina RC (2003) The Mayan Cichlid, 'Cichlasoma' urophthalmus: an overview. *The Cichlid Room Companion*. Retrieved from <http://cichlidae.com/article.php?id=181> on 1 March 2007.
- Benjakul S, Karoon S, Suwanno A (1999) Inhibitory effects of legume seed extracts on fish proteinases. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79:1875-1881.

- Bergmann GT, Motta PJ (2005) Diet and morphology through ontogeny of the nonindigenous Mayan cichlid *Cichlasoma (Nandopsis) urophthalmus* (Gunther 1862) in southern Florida. *Environmental Biology of Fishes* 72: 205–211.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brauge C, Medale F, Corraze G (1994) Effect of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycaemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater. *Aquaculture* 123: 109–120.
- Carter CG, Hauler RC (2000) Fish meal replacement by plant meals in extruded feeds for Atlantic salmon, *Salmo salar* L.). *Aquaculture* 185: 299–311.
- Cuenca-Soria CA, Alvarez-Gonzalez CA, Ortiz-Galindo JL, Guerrero-Zarate R, Perera-Garcia A, Hernandez-Gomez RE, Nolasco-Soria H (2013) Digestibilidad in vitro de ingredientes proteínicos en la mojarra castarrica *Cichlasoma urophthalmus*. *Universidad y Ciencia* 29(3): 263-275.
- Cuenca-Soria CA, Alvarez-Gonzalez CA, Ortiz-Galindo JL, Nolasco-Soria H, Tovar-Ramirez D, Guerrero-Zarate R, Castillo-Dominguez A, Perera-Garcia MA, Hernandez-Gomez R, Gisbert E (2014) Partial characterisation of digestive proteases of the Mayancichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 40: 689–699.
- Dabrowski K, Poczczynski P, Köiick G, Berger B (1989) Effect of Partially or Totally Replacing Fish Meal Protein by Soybean Meal Protein on Growth, Food Utilization and Proteolytic Enzyme Activities in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *New in Vivo Test for Exocrine Pancreatic Secretion*. *Aquaculture* 77: 29-49.
- Dong-Fang D, Zhi Yong, J, Warren D, Ryan M, Robert PW (2011) Optimal dietary protein levels for juvenile Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) fed diets with two levels of lipid. *Aquaculture* 316: 25–30.
- El-Sayed AM (1990) Long-term evaluation of cotton seed meal as a protein source for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linn.). *Aquaculture* 84: 315–320.

- El-Sayed AM, Martínez I, Moyano FJ (2000) Assessment of the effect of plant inhibitors on digestive proteases of Nile tilapia using in vitro assays. *Aquaculture International* 8: 403-415.
- El-Sayed AM, Teshima S (1991) Tilapia nutrition in aquaculture. *Reviews in Aquatic Sciences* 5: 247–265.
- FAO (2012) El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012. Roma, pp. 231.
- FAO (2015) Food and agriculture organization of the United Nations, statistics division. On line query available at [http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hqp\\_8364409141364265759.xml&outtype=html](http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hqp_8364409141364265759.xml&outtype=html).
- FAO (2018) El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Fernandes Junior AC, Pucci FCPL, Pezzato LE, Albers KJF, Pelegrina TC, Tenório CF, Motta DF, Laufer AR, Padovani CR, Barros MM (2016) The effect of digestible protein to digestible energy ratio and choline supplementation on growth, hematological parameters, liver steatosis and size-sorting stress response in Nile tilapia under field condition. *Aquaculture* 456: 83–93.
- Fitzsimmons K (1997) Introduction to tilapia Sex-Determination and sex reversal. In: *Proceedings from the fourth international symposium on tilapia in Aquaculture*. Vol. 2, Nov. 9-12. pp. 717-718.
- Francis G, Makkar HPS, Becker K (2001) Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199: 197–227.
- García CFL, Dimes LE, Haard NF (1993) Substrate gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases and proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry* 214: 65–69.
- García CFL, Navarrete del TMA, Díaz LM, Hernández CMP, Ezquerro JM (1996) Protease inhibition of fish muscle enzymes using legume seeds extracts. *Journal Food Protection* 59: 312–318

- García-Carreño F, Navarrete del Toro M de los A, Ezquerro BJM (1997) Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility in vitro. I: Effect of protease inhibitors in protein ingredients. *Journal of Marine Biotechnology* 5: 36-40.
- Graber M and Condoret JS (1992) Preparative anion-exchange chromatography of soybean trypsin inhibitor: the alternative of column-overloaded methods. *Journal of Chromatography* 584:115-120.
- Grant G (1991). Lectins. In: D'Mello, F.J.P., Duffus, C.M., Duffus, J.H. Eds. *Toxic Substances in Crop Plants*. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Cambridge CB4 4WF, Cambridge, pp. 49–67.
- Haard NF, Dimes LE, Arndt RE, Dong FM (1996) Estimation of protein digestibility. IV. Digestive proteinases from the pyloric caeca of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) fed diets containing soybean meal. *Comparative Biochemistry and Physiology* 110: 533-540.
- Hendricks JD, Bailey GS (1989) Adventitious toxins. In: Halver JE, editor. *Fish Nutrition*, 2nd ed. New York: Academic Press, pp. 605-651.
- Huisman J, Tolman GH (1992) Antinutritional factors in the plant proteins of diets for non-ruminants. In: Garnsworthy, PC., Haresign, W., Cole, D.J.A. (Eds.) *Recent Advances in Animal Nutrition*. Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford. pp. 3–31.
- Jansman AJM, Hill GD, Huisman J, van der Poel AFB (1998) Eds. *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds*; Wageningen Pers: Wageningen, The Netherlands.
- Jasour MS, Wagner L, Kræmer SU, Katrine LB, Tolderlund RH, Harthøj HN, Hammershøj M, Tang DAJ, Kastrup DT (2018) Fishmeal with different levels of biogenic amines in aquafeed: Comparison of feed protein quality, fish growth performance, and metabolism. *Aquaculture* 488: 80–89.
- Kim J-D, Tibbetts SM, Milley JE, Lall SP (2007) Effect of the incorporation level of dehulled soybean meal into test diet on apparent digestibility coefficients for protein and energy by juvenile haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L. *Aquaculture* 267: 308–314.

- Koch JF, Rawles SD, Webster CD, Cummins V, Thompson KR, Gannam AL, Twibell RG, Hyde NM, Kobayashi Y (2016) Optimizing fish meal-free commercial diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 452: 357–366.
- Kokou F, Fountoulaki E (2018) Aquaculture waste production associated with antinutrient presence in common fish feed plant ingredients. *Aquaculture* 495: 295–310.
- Krogdahl A, Holm H (1983) Pancreatic proteinases from man, trout, rat, pig, cow, chicken, mink and fox. Enzyme activities and inhibition by soybean and lima bean proteinase inhibitors. *Comparative Biochemistry and Physiology* 74: 403–409.
- Krogdahl A, Holm H (1981) Soybean proteinase inhibitors and human proteolytic enzymes: selective inactivation of inhibitors by treatment with human gastric juice. *The Journal of Nutrition* 111: 2045-2050.
- Krogdahl A, Lea TB, Olli JJ (1994) Soybean protease inhibitors affect intestinal trypsin activities and amino acids digestibilities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 107:215–219.
- Krogdahl A (1986) Antinutrients affecting digestive functions and performance in poultry. En: M. Larbier (Eds.) Proc. 7th Eur. Poultry conf. 24-28 Aug Paris Wlds. Poultry Sci. Ass., Branche Francaise, pp. 239-248.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Liener IE (1980) *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*, Academic Press, Sydney, pp. 425.
- Liener IE (1989) Antinutritional factors in legume seeds: state of the art, in: Huisman J., Van Der Poel T.F.B., Liener I.E. (Eds.), *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds*, Pudoc, Wageningen, pp. 6–13.
- Liu K (1997) In: *Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization*. Chapman & Hall, International Thomson Publishing, Singapore, pp. 532.
- Luo G, Gao Q, Wang C, Liu W. Sun D. Li L, Tan H (2014) Growth, digestive activity, welfare, and partial cost-effectiveness of genetically

- improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system. *Aquaculture* 422–423: 1-7.
- Maitra S, Ray AK (2003) Inhibition of digestive enzymes in rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), fingerlings by tannin: an in vitro study. *Aquaculture Research* 34: 93–95.
- McGoogan BB, Reigh RC (1996) Apparent digestibility of selected ingredients in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. *Aquaculture* 141: 233–244.
- Melito C, Tovar J (1995) Cell walls limit in vitro protein digestibility in processed legume seeds. *Food Chemistry* 53: 305-307.
- Mente E, Karalazos V, Karapanagiotidis IT, Pita C (2011) Nutrition in organic aquaculture: an inquiry and a discouser. *Aquaculture nutrition* 17: 798-817.
- Moyano FJ, Martínez I, Díaz M, Alarcón FJ (1999) Inhibition of digestive proteases by vegetable meals in three fish species; seabream (*Sparus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African sole (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 122: 327–332.
- Moyano FJ, Savoie L (2001) Comparison of in vitro systems of protein digestion using either mammal or fish proteolytic enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 128: 359-368.
- Norton G (1991) Proteinase inhibitors. In: D'Mello, F.J.P., Duffus, C.M., Duffus, J.H. Eds., *Toxic Substances in Crop Plants*. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Cambridge CB4 4WF, Cambridge, pp. 68–106.
- Obara T, Watanabe Y (1971) Heterogeneity of soybean trypsin in-hibitors. II. Heat inactivation. *Cereal Chemistry* 34: 33-38.
- Øverland M, Sørensen M, Storebakken T, Penn M, Krogdahl Å, Skrede A (2009) Pea protein concentrate substituting fish meal or soybean meal in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*)—Effect on growth performance, nutrient digestibility, carcass composition, gut health, and physical feed quality. *Aquaculture* 288: 305–311.
- Pillay TV (1993) *Aquaculture: principles and practices*. Great Britian, Fishing New Books. pp. 360-376.

- Reinitz GL, Orme LE, Lemm CA and Hitzel FN (1978) Full-fat soybean meal in rainbow trout diets. *Feedstuffs*. 50: 23-24.
- Robaina L, Izquierdo MS, Moyano FJ, Socorro J, Vergara JM, Montero D, Fernandez-Palacios H (1995) Soybean and lupin seed meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. *Aquaculture* 130: 219–233.
- Salze G, McLean E, Battle PR, Schwarz MH, Craig SR (2010) Use of soy protein concentrate and novel ingredients in the total elimination of fish meal and fish oil in diets for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* 298: 294–299.
- Santiago LMC, Jardono J, Jaramillo SG, Reyes AJE, Sanchez VA (1997) Edad, crecimiento y hábitos alimenticios de *Cichlasoma salvini* (Günther), *Cichlasoma urophthalmus* (Günther), *Oreochromis niloticus* (Linneo), y *Petenia splendida* (Günther) presa Miguel de la Madrid H. "Cerro de Oro" Tuxtepec, Oaxaca. En: Ramírez R. G. (Eds.) Memoria V Congreso Nacional de Ictiología del 3 al 5 de Febrero 1997. Mazatlán Sinaloa. pp. 38.
- Santigosa E, Sánchez J, Médale F, Kaushik S, Pérez-Sánchez J (2008) Modifications of digestive enzymes in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bream (*Sparus aurata*) in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources. *Aquaculture* 282: 68–74.
- Smith AA, Dumas A, Yossa R, Overturf KE, Bureau DP, (2018) Effects of soybean meal and high- protein sunflower meal on growth performance, feed utilization, gut health and gene expression in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) at the grow- out stage. *Aquaculture Nutrition* 24: 1540–1552.
- Sveier H, Kvamme BO, Raae AJ (2001) Growth and protein utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) given a protease inhibitor in the diet. *Aquaculture Nutrition* 17: 255-264.
- Tacon AGJ (1997) Fish meal replacers: review of anti-nutrients within oil seeds and pulses – a limiting factor for the aquafeed green revolution? In: Tacon A., Basurca B. (Eds.) *Feeding Tomorrow's fish. Cahiers options Mediterranean's* 22: 154–182.
- Tacon AGJ and Jackson AJ (1985) Utilization of conventional and unconventional protein sources in practical fish feeds. In *Nutrition*

- and Feeding in Fish (eds C.B. Cowey, A.M. Mackie and J.G. Bell). Academic Press, London, pp. 119–145.
- Tacon AGJ (1995) Feed ingredients for carnivorous fish species: alternatives to fishmeal and other fishery resources. In: Reinertsen, H., Haaland, H. (Eds.), *Sustainable Fish Farming*, pp. 89–114.
- Uscanga A, Moyano FJ, Álvarez CA (2010) Assessment of enzymatic efficiency on protein digestion in the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 36: 1079–1085.
- Uscanga-Martínez A, Perales-García N, Álvarez-González CA, Moyano FJ, Tovar-Ramírez D, Gisbert GE, Márquez-Couturier G, Contreras-Sánchez W, M. Arias-Rodríguez L, Indy JR (2011b) Changes in digestive enzyme activity during initial ontogeny of bay snook *Petenia splendida*. *Fish Physiology and Biochemistry* 37(3): 667-80.
- Uscanga-Martínez A, Moyano-López, FJ, Álvarez-González, CA, Perales-García, N (2011a) Aplicaciones a la mejora de la utilización nutritiva del alimento en cíclidos cultivados en México. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Villarreal-Cavazos DA, Gamboa-Delgado J, Hernández-Hernández L (Eds), *Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 46-104.
- Valtierra VMT, Schmitter SJJ (2000) Hábitos alimentarios de las mojarras (Perciformes: Cichlidae) de la laguna Caobas, Quintana Roo, México. *Revista Biología Tropical* 8: 2-3.
- Valverde-Chavarri S, Calvo-Elizondo E, Álvarez-González CA, Brais-Medina M, Ulloa-Rojas JB (2016) In vitro digestibility and proteases inhibitory effect of several feedstuffs for *Parachromis dovii* juveniles and *P. dovii* hybrid larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* 42: 1767–1776.
- van Barneveld RJ, Edwards AC, Huisman J (2000) Chemical and physical factors influencing the nutritional value and subsequent utilisation of food legumes by livestock. In: Knight, R. (Ed.), *Linking Research and Marketing Opportunities for Pulses in the 21st Century*. Proceedings of the Third International Food Legumes Research Conference, 22–26 September 1997, Adelaide, Australia. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, vol 34. Kluwer Academic Publishers, London, pp. 661–670.

- Viola S, Mokady S, and Arieli Y (1983) Effects of soybean processing methods on the growth of carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 32: 27-38.
- Walter HE (1984) Proteinases: methods with haemoglobin, casein and azocoll as substrates. En: BERGMEYER HJ (ed). *Methods of Enzymatic Analysis*, vol V. Weinheim: Verlag Chemie 270-277.
- Wee KL, Shu SW (1989) The nutritive value of boiled full-fat soybean in pelleted feed for Nile tilapia. *Aquaculture* 81: 303-314.
- Wilson RP (1994) Utilisation of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture* 124: 67–80.
- Younis ESM, Al-Quffail AS, Al-Asgah NA, Abdel-Warith AWA, Al-Hafedh YS. (2018) Effect of dietary fish meal replacement by red algae, *Gracilaria arcuata*, on growth performance and body composition of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Saudi Journal of Biological Sciences* 25: 198–203.
- Zhou Z, Yao W, Ye B, Wu X, Li X, Dong Y (2019) Effects of replacing fishmeal protein with poultry by-product meal protein and soybean meal protein on growth, feed intake, feed utilization, gut and liver histology of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus lanceolatus*) juveniles. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734503>.

VII. Digestibilidad in vitro de fuentes alternativas de proteínas para la alimentación de peces tropicales

### 7.1 Resumen

Se llevó a cabo la evaluación in vitro de fuentes de proteínas alternativas de origen animal y vegetal frente a extractos enzimáticos obtenidos de estómagos e intestinos de tilapias (*O. niloticus*), tenguayacas (*P. splendida*) y castarricas (*M. urophthalmus*). Se determinó la actividad proteasa por medio de la técnica descrita por Walter (1984). El modelo gastrointestinal de la celda de digestión se empleó una fase ácida con una cantidad de sustrato de 500 g kg<sup>-1</sup> de proteína cruda:extracto de estómago de 1,500 U mL<sup>-1</sup> y posteriormente, una fase alcalina con extracto de intestino de 2,500 U mL<sup>-1</sup>, durante un periodo de hidrólisis de 180 minutos. Los aminoácidos liberados y acumulados totales se determinaron por el método de o-ftaldialdehído como se detalla por Church et al., (1983). La harina de pescado fue la que mostró mayor grado de hidrólisis y liberación de aminoácidos y en consecuencia el valor más elevado del total de aminoácidos acumulados 39.5 mg que el resto de las harinas evaluadas. Se obtuvo, la ecuación lineal a partir del de las líneas de tendencias de los aminoácidos liberados de cada una de las harinas para el cálculo del tiempo de hidrólisis (50% de la proteína) mostrando rango que van desde 1.99 hasta 6.03 h. Por lo que se concluye, que el empleo de la técnica in vitro es una herramienta útil para llevar a cabo las predicciones de la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de las fuentes de nutrientes que son evaluados para la su incorporación en futuras formulaciones para el diseño de alimentos en cíclidos comerciales del Sureste de México.

Palabras claves: digestibilidad, hidrólisis, in vitro, fuentes de proteínas

### 7.2 Introducción

El gran reto actual para la alimentación en especies acuáticas es encontrar un equilibrio óptimo entre dos aspectos esenciales: I) Maximizar el rendimiento técnico de la producción, mediante el desarrollo de los alimentos más adecuados a las necesidades fisiológicas de cada especie en sus diferentes etapas de crecimiento y II) Mejorar el rendimiento económico, mediante el desarrollo de los alimentos óptimos desde una perspectiva tecnológica, considerando tanto el valor nutritivo como el coste, la disponibilidad y facilidad del procesado de las diferentes materias primas (Tacon et al., 2011; Rahmah et al., 2016). En este aspecto, la proteína es el ingrediente dietario más importante en la fabricación de alimentos para peces, siendo la harina de pescado la principal fuente proteica utilizada en mayor proporción (Córdova-Murueta, 2002; New y Wijkström, 2002); por lo tanto, la alimentación es el rubro que más gasto genera en la producción de peces (Ng et al., 2003; Meyer y Machado, 2004; Cho et al., 2005). Actualmente, los estudios nutricionales están dirigidos a la búsqueda de ingredientes proteínicos alternativos, tanto de origen animal como vegetal, con los que se pretende sustituir la harina de pescado (Burr et al., 2011) y reducir el costo de producción; de esta manera, se logrará asegurar el abastecimiento de alimentos de calidad. A pesar del potencial de estos ingredientes dependen de la digestibilidad, composición nutricional y disponibilidad en el mercado.

El verdadero valor nutritivo de las distintas fuentes proteínicas depende de la biodisponibilidad de sus nutrientes y no simplemente de su composición de esta forma se obtiene mayor eficiencia en la absorción intestinal (Cho, 1992; Cruz-Suarez, 1996). La digestibilidad es uno de parámetros utilizados para evaluar la calidad nutricional de los distintos ingredientes e insumos destinados para la alimentación acuícola (Chong et al., 2002; Lee, 2002; Biswas et al., 2007; Tonheim et al., 2007; Smith et al., 2007; Reis et al., 2008). Los métodos empleados para la determinación de la digestibilidad se basan en estudios in vivo (Alpers, 1994). Sin embargo,

tales ensayos son caros, requieren de tiempo y grandes instalaciones, sin asumir la variabilidad de digestibilidad que se pueden obtener por este método a causa de la densidad de peces en los tanques (Biswas et al., 2007); diferentes formas de extracción o recolección de heces (Stone et al. 2008); variabilidad de marcadores en los piensos (Vandenberg y De La Noue, 2001). Por lo tanto, se han desarrollado varias metodologías in vitro que se utilizan como alternativas a los ensayos in vivo (Boisen y Eggum, 1991; Savoie, 1994; Bassompierre et al., 1997). Así mismo, el empleo de estas técnicas permite realizar un estudio detallado de la evolución de la hidrólisis de la proteína durante el proceso de digestión por cuantificación de los aminoácidos y péptidos liberados (Nugent et al., 1983; Alarcón et al., 2002). En este sentido, la aplicación de técnicas in vitro proporciona una alternativa rápida, a bajo costo de fácil ejecución y rápida disponibilidad de los resultados (Lazo, 1998; Moyano y Savoie, 2001; Vasiluk et al., 2008). En los métodos in vitro se realiza la simulación de las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal de los organismos, donde la digestión se realiza en dos fases: I) fase ácida (organismos con estómagos funcionales); II) fase intestinal del proceso digestivo (etapa alcalina). Para ello, se utilizan mezclas de enzimas intestinales (extractos crudos/enzimas purificadas), como son tripsina, quimotripsina y peptidasas (Dimes, 1994; Rungruangsak-Torrissen et al., 2002). El objetivo del presente estudio fue evaluar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de diferentes fuentes proteicas de origen animal y vegetal por medio de estudios in vitro en las tres especies de cíclidos, simulando la digestión gástrica e intestinal para su inclusión en el diseño de alimentos especializados durante el cultivo de estos peces.

### 7.3 Materiales y métodos

#### 7.3.1 Peces experimentales

El estudio se realizó con los tractos digestivos de tilapias (*O. niloticus*) que fueron obtenidos bajo las condiciones de cultivo en las instalaciones de la

empresa VALAQUA; Valencia, España. Las tenguayacas (*P. splendida*) y castarrica (*M. urophthalmus*) se obtuvieron del Laboratorio de Acuicultura Tropical de la UJAT-DACBIOL, México. Las unidades experimentales donde se obtuvieron los peces consiste en un sistema cerrado de 10 tanques de 1000 L c/u de capacidad, con sistema de recirculación continua y temperatura constante en promedio de  $32.0 \pm 1.1$  °C, el nivel de oxígeno disuelto fue de  $6.40 \pm 0.28$  mg/L, se determinó usando un oxímetro marca YSI modelo 55 (precisión de 0.1°C y 0.01 mg/L respectivamente). Se realizaron recambios de volúmenes de agua del 10%. Al sistema se le suministró aireación continua mediante un blower durante todo el tiempo del ensayo. Todos los peces se mantuvieron en ayunas durante 24 h; posteriormente fueron sacrificados por una sobredosis ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) de anestésico MS-222 (Metasulfonato de tricaina, Argent, Chemical Laboratories, Inc., Redmond, WA, USA) y se mantuvieron en agua con hielo hasta su procesamiento. Los procedimientos de manipulación de los peces cumplieron con los requerimientos del Comité para el Uso Ético de los Animales Experimentales. Los tractos digestivos de tenguayaca y castarrica fueron procesados en una liofilizadora LABCONCO modelo FreeZone6plus para su posterior uso.

### 7.3.3 Harinas experimentales.

En el presente estudio se evaluaron seis fuentes de proteínas (tres animales y tres vegetales), estas muestras se obtuvieron de las empresas locales en México y evaluados en el Laboratorio de Acuicultura Tropical, de la División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México (DACBIOL-UJAT), como se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4.- Fuentes de proteínas evaluadas en el sistema in vitro.

Fuente	Harina	proteína (mg/100 mg)
Animal	Restos de pollo <sup>1</sup>	65
	Sangre de res <sup>1</sup>	82
	Sardina <sup>1</sup>	77
Vegetal	Sorgo (S. bicolor, Moench) <sup>2</sup>	10.11
	Gluten de trigo (T. aestivum) <sup>3</sup>	75
	Salvado de trigo (T. aestivum) <sup>2</sup>	15

1. Proteínas Marinas y Agropecuarias S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, México.

2. Galmex S.A. de C.V., Villahermosa, Tabasco, México.

3. Glútenes de México S.A. de C.V. Edomex, México.

#### 7.3.4 Preparación de los extractos enzimáticos.

Para la preparación de los extractos, los digestivos (estómago e intestino) de *P. splendida* y *M. urophthalmus* se rehidrataron con agua milli-Q. Mientras que los digestivos de *O. niloticus* se procesaron en fresco, los extractos fueron utilizados como fuentes de enzimas. Posteriormente, se homogenizaron con agua milli-Q (1:10 w/v) con un homogeneizador de tejido marca Misonix (modelo Microson Ultrasonic Cell Disruptor, NY). Las muestras se centrifugaron a 16,000 x g durante 30 min a 4 °C, el sobrenadante se almacenó en tubos Eppendorf de 2 mL y se conservaron en refrigeración a -20 °C.

### 7.3.5 Determinación de actividad proteasa

La actividad de proteasas alcalinas en los extractos se determinó con el método propuesto por Walter, (1984) utilizando como sustrato la caseína Hammerstein ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ), en  $50 \text{ mmol Tris-HCl}$ , pH 9.0. Las mezclas se incubaron durante 60 min a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , la reacción se detuvo por adición de  $0,5 \text{ ml}$  de ácido tricloroacético (TCA) ( $120 \text{ g L}^{-1}$ ), y la absorbancia de los péptidos solubles en TCA se registró a  $280 \text{ nm}$ . La actividad proteasa ácida se evaluó según el método de Anson (1938), utilizando  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  de hemoglobina en  $0.1 \text{ mol glicina-HCl}$  (pH 2.0). Una unidad de actividad enzimática se define como  $1 \text{ } \mu\text{g}$  de tirosina liberado por minuto, utilizando el coeficiente de extinción molar para la tirosina de 1,290. Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado. La concentración de proteína soluble en los extractos de los peces se determinó según Bradford (1976), usando el procedimiento de microensayo estándar.

### 7.3.6 Condiciones generales del sistema in vitro

La hidrólisis de la proteína en todos los experimentos se determinó utilizando una celda de digestión descrito por Hamdan et al., (2009). La celda de digestión, está formada por una cámara de reacción interna que contiene la mezcla deseada de los extractos enzimáticos y sustrato, separada de una cámara exterior por una membrana semi-permeable (SpectraPor 6, molecular weight cutoff  $1000 \text{ Da}$ , Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA). El extracto enzimático y el sustrato se mezclaron manteniéndose bajo agitación continua mediante un agitador magnético a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  usando un baño térmico.

La fase ácida se simuló mediante la suspensión de una cantidad dada de sustrato ( $500 \text{ g kg}^{-1}$  de proteína cruda) en  $\text{HCl } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$  a pH 2.0 seguido por la adición de extracto crudo de estómago ( $1,500 \text{ U mL}^{-1}$ ) se incubaron durante 30 min. Después de este tiempo, el pH se elevó a 9.0 mediante la adición de  $\text{NaOH } (1 \text{ mol L}^{-1})$  y la mezcla se transfirió a la

celda de digestión, donde se realizó la fase alcalina, en la cual se agrega extracto crudo de intestino ( $2,500 \text{ U mL}^{-1}$ ), la reacción se mantuvo durante 180 min. Los productos de digestión pasan a través de la membrana y se retiraron en diferentes puntos de muestreo (0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 min), estos tiempos se establecieron para medir la liberación de los productos de hidrólisis liberados al tampón de borato circulante ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) a pH 9. La concentración de los aminoácidos totales en las muestras se determinó usando el método de o-ftaldialdehído como se detalla por Church et al. (1983), que se mide por fluorescencia (Fluoroskan Ascent, Lab Thermo; Finlandia). Los resultados se expresaron ya sea como cantidad total de aminoácidos liberados en cada punto de muestreo o como valores acumulados de aminoácidos liberados hasta el momento de la toma de muestras. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### 7.3.7 Análisis estadísticos

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre el total de aminoácidos liberados durante el tiempo de hidrólisis y los aminoácidos acumulados se representaron en figuras para mostrar las variaciones en su producción a lo largo del tiempo. Se compararon estadísticamente mediante un ANOVA. Cuando se detectaron diferencias significativas los datos fueron sometidos a la prueba de Kruskal-Wallis (prueba de comparación grupo independiente) (Zar, 1996) para los valores acumulativos y liberados de aminoácidos totales. Todos los análisis se realizaron con Statistica V.7 y un valor de significación de 0.05.

## 7.4 Resultados

Después de haber realizado los ensayos in vitro donde se simuló la digestión ácida y alcalina del sistema digestivo de los peces en estudio. Los resultados mostraron que durante la hidrólisis con los extractos de *O. niloticus*, la harina de pescado presentó diferencias significativas al exhibir

el mayor grado de biodisponibilidad de los aminoácidos totales  $4.60 \pm 0.29 \text{ g kg}^{-1}$ ; con respecto al gluten de trigo que reveló el menor grado de hidrólisis  $1.03 \pm 0.07 \text{ g kg}^{-1}$ . En *P. splendida*, se presentaron diferencias significativas durante la liberación de aminoácidos con la caseína alcanzando un valor de  $4.57 \pm 0.09 \text{ g kg}^{-1}$ , siendo la harina de salvado de trigo la que mostró la menor liberación de aminoácidos ( $2.71 \pm 0.23 \text{ g kg}^{-1}$ ). En lo que respecta, a las *M. urophthalmus* no se encontraron diferencias significativas como se puede observar en la figura 9.

En la tabla 5, se observan los resultados obtenidos del total de aminoácidos liberados después de 180 minutos de hidrólisis de las harinas de origen animal y vegetal. Se realizaron las ecuaciones de las líneas de tendencia de tipo lineal con valores de  $r^2$  que van desde 0.91 hasta 0.99 con una probabilidad de  $P < 0,05$ . Los datos obtenidos nos indican que se presentaron diferencias significativas entre la harina de pescado, la cual fue la que mostró mayor acumulación de aminoácidos libres (39.5 mg), en comparación con el gluten de trigo. *P. splendida* presentó diferencias significativas con relación a la liberación de aminoácidos entre la caseína 39.2 mg comparando con el salvado de trigo 23.3 mg, mientras que *M. urophthalmus* no mostró diferencias significativas en la liberación de aminoácidos entre las harinas evaluadas.

Se determinó el cálculo de la digestibilidad in vitro, donde la harina de pescado resultó ser más digerible (79.02%) que el resto de las harinas evaluadas para *O. niloticus*. Así mismo, se logró determinar el tiempo que le podría llevar a las especies realizar el 50% de la hidrólisis en horas lo que puede fluctuar desde 1.99 hasta 6.03 h como se detalla en la tabla 5.

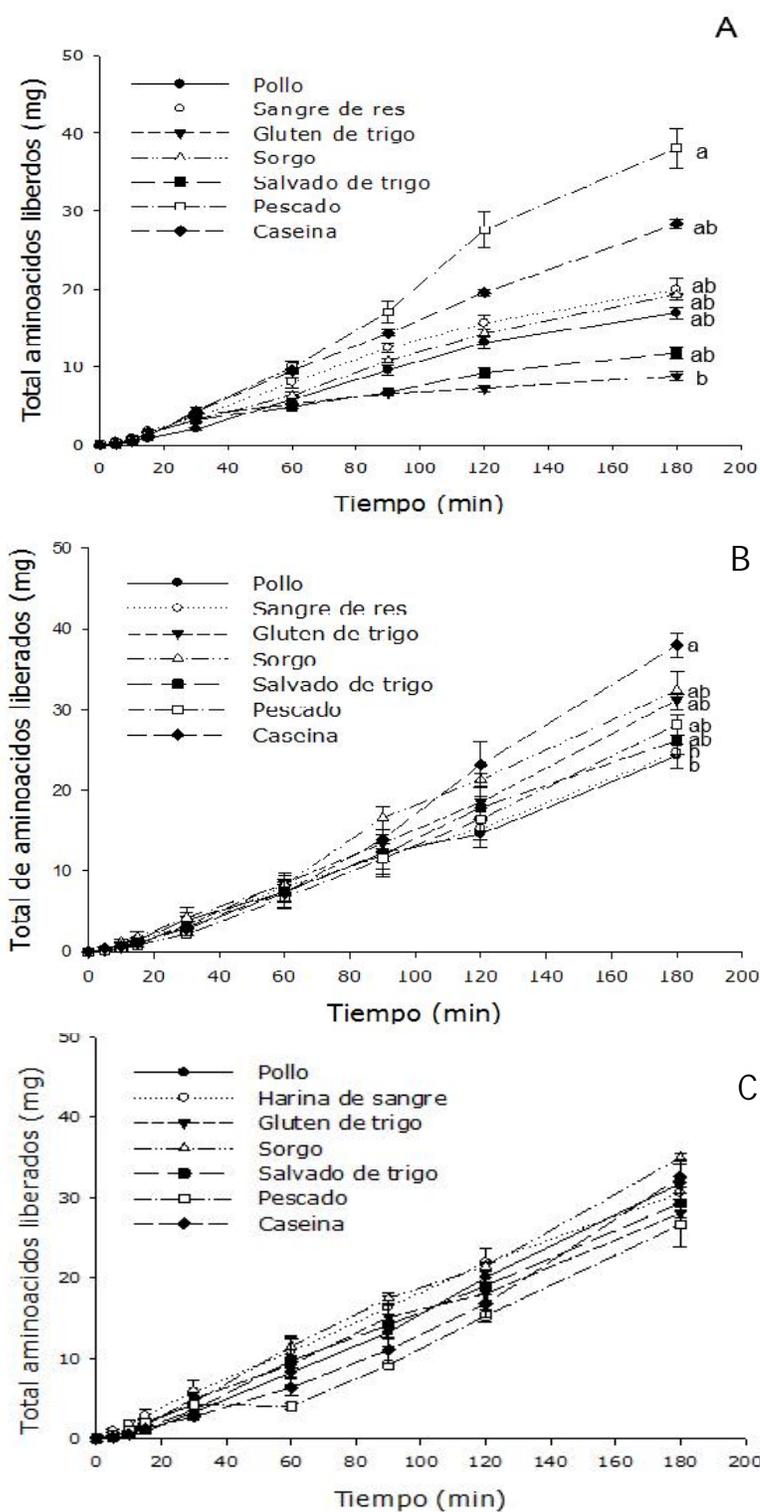


Figura 9.- Curvas de hidrólisis de la liberación de aminoácidos durante un periodo de 180 min como fuente de proteínas las harinas de pollo, sangre de res, pescado, sorgo, gluten de trigo, salvado de trigo y casina, por extracto enzimático de A) tilapia; B) tenguyaca y C) castarrica.

Tabla 5.- Resultados obtenidos de la hidrólisis de las diferentes fuentes de proteína de origen animal y vegetal con extractos enzimáticos de tilapia, tenguayaca y castarrica (Promedio  $\pm$  desviación estándar). Superíndices desiguales indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Harinas	Total de aminoácidos liberados 180 min (mg)	Aminoácidos liberados (g kg <sup>-1</sup> proteína inicial)	Digestibilidad de la proteína (%)	Línea de tendencia <sup>a</sup>	Tiempo de 50% hidrólisis (h)
<i>Oreochromis niloticus</i>					
Pollo	16.9 $\pm$ 0.8 ab	1.97 $\pm$ 0.09	33.79 $\pm$ 1.52	y = 0.1021x - 0.3179	4.15
Sangre de res	19.9 $\pm$ 1.3 ab	2.32 $\pm$ 0.16	39.83 $\pm$ 2.67	y = 0.1186x + 0.2308	3.48
Pescado	39.5 $\pm$ 0.1 a	4.60 $\pm$ 0.29	79.02 $\pm$ 0.19	y = 0.2222x - 1.6342	1.99
Sorgo	19.3 $\pm$ 0.2 ab	2.25 $\pm$ 0.02	38.54 $\pm$ 0.33	y = 0.1126x - 0.1427	2.93
Gluten de trigo	8.8 $\pm$ 0.6 b	1.03 $\pm$ 0.07	17.58 $\pm$ 1.12	y = 0.0513x + 0.8437	7.84
Salvado de trigo	11.8 $\pm$ 0.7 ab	1.37 $\pm$ 0.08	23.53 $\pm$ 1.39	y = 0.0683x + 0.3678	6.03
Caseína	28.3 $\pm$ 0.6 ab	3.31 $\pm$ 0.07	56.70 $\pm$ 1.27	y = 0.1641x - 0.6974	2.61
<i>Petenia splendida</i>					
Pollo	23.6 $\pm$ 1.3 b	2.74 $\pm$ 0.15	47.11 $\pm$ 2.60	y = 0.1227x - 0.6803	3.48
Sangre de res	25.1 $\pm$ 0.4 ab	2.91 $\pm$ 0.04	49.96 $\pm$ 0.71	y = 0.1351x - 0.9354	3.19
Pescado	28.7 $\pm$ 1.1 ab	3.34 $\pm$ 0.13	57.41 $\pm$ 2.15	y = 0.1501x - 1.2741	2.91
Sorgo	29.6 $\pm$ 1.1 ab	3.45 $\pm$ 0.13	59.16 $\pm$ 2.21	y = 0.1739x - 0.6193	2.45
Gluten de trigo	31.5 $\pm$ 0.7 ab	3.68 $\pm$ 0.08	63.08 $\pm$ 1.34	y = 0.1663x - 1.0826	2.61
Salvado de trigo	23.3 $\pm$ 2.0 b	2.71 $\pm$ 0.23	46.58 $\pm$ 4.01	y = 0.1421x - 0.6697	3.01
Caseína	39.2 $\pm$ 0.7 a	4.57 $\pm$ 0.09	78.49 $\pm$ 1.49	y = 0.2265x - 2.6535	2.03
<i>Mayaheros urophthalmus</i>					
Pollo	31.1 $\pm$ 3.2	3.63 $\pm$ 0.37	62.24 $\pm$ 6.41	y = 0.1758x - 1.3334	2.49
Sangre de res	30.9 $\pm$ 3.6	3.60 $\pm$ 0.42	61.82 $\pm$ 7.15	y = 0.1628x - 0.4046	2.60
Pescado	30.9 $\pm$ 1.7	3.60 $\pm$ 0.19	61.81 $\pm$ 3.32	y = 0.1703x - 0.7333	2.61
Sorgo	33.3 $\pm$ 2.3	3.88 $\pm$ 0.27	66.56 $\pm$ 4.56	y = 0.1774x - 0.2156	2.36
Gluten de trigo	24.7 $\pm$ 0.2	2.88 $\pm$ 0.02	49.48 $\pm$ 0.39	y = 0.1581x - 0.3739	3.11
Salvado de trigo	33.4 $\pm$ 0.1	3.34 $\pm$ 0.18	57.36 $\pm$ 3.15	y = 0.1504x - 1.1678	2.89
Caseína	33.6 $\pm$ 3.4	3.61 $\pm$ 2.28	67.16 $\pm$ 6.78	y = 0.1934x - 1.8625	2.31

<sup>a</sup>Ecuaciones de tipo lineal obtenidas después de graficar los valores acumulados de liberación de aminoácidos contra el tiempo.

## 7.5 Discusión

El método *in vitro* empleado (celda de digestión) para determinar la hidrólisis de las fuentes de proteínas evaluadas nos permite identificar la eficiencia digestiva de los organismos. El modelo gastrointestinal basado en la simulación de una hidrólisis de predigestión ácida y posteriormente la digestión alcalina de los extractos enzimáticos de peces y/o enzimas comerciales, dio como resultado un aumento en la liberación de péptidos y polipéptidos de acuerdo al tamaño de salida de las membranas empleadas (Clements y Raubenheimer, 2006; Yasumaru y Lemos 2014). Los resultados obtenidos en el presente estudio son congruentes con lo reportado para *Argyrosomus regius*, *O. niloticus*, *Oncorhynchus mykiss* y *Sparus aurata*, donde se ha utilizado una digestión de doble fase ácido–alcalina, lo que permitió determinar que la liberación de aminoácidos es significativamente mayor que al usar solamente la digestión alcalina. Se debe resaltar que las modificaciones en la técnica permiten simular con mayor eficiencia el sistema fisiológico digestivo de las especies de peces con estómago. Este órgano es capaz de realizar la hidrólisis ácida por la acción de la pepsina, para luego realizar la simulación en el intestino donde se lleva a cabo la hidrólisis alcalina de los nutrientes ingeridos (Moyano y Savoie, 2001; Hamdan et al., 2009; Morales y Moyano, 2010; Gilannejad et al., 2018).

En el presente estudio, como extracto enzimático para la fase ácida se utilizó la cantidad de  $1,500 \text{ U mL}^{-1}$ , y en la fase alcalina de  $2,500 \text{ U mL}^{-1}$  sobre  $500 \text{ g kg}^{-1}$  de proteína cruda de las harinas vegetales. Durante el proceso de la hidrólisis se determinó que la harina de pescado resultó ser significativamente mayor al gluten de trigo durante la solubilización de las proteínas, para el caso de la *P. splendida*, la caseína fue diferente a la harina de salvado de trigo, mientras que para *M. urophthalmus* no presentaron diferencias significativas con relación a la hidrólisis y por ende, una mayor liberación de aminoácidos durante el desarrollo del ensayo.

Para este estudio, los resultados obtenidos se pueden explicar debido a que la solubilización de las proteínas o bioaccesibilidad de los nutrientes están influenciados por varios factores como los describe Sathe et al. (2018), clasificándolos de la siguiente forma: los intrínsecos (la composición y secuencia de los aminoácidos, estructura de la proteína y tipo de proteína) y los extrínsecos (pH, fuerza iónica, temperatura del medio y componentes no proteicos). Por lo tanto, Nair et al. (1976) han demostrado que el valor nutritivo de las proteínas depende exclusivamente del contenido de aminoácidos presentes. Es por ello, que la harina de pescado al tener una composición más adecuada de aminoácidos como lisina, arginina, metionina, valina, leucina, ácido glutámico, alanina y ácido aspártico (Ousterhout et al., 1957; Carpenter y Opstvedt, 1976; Zhou et al., 2004). En contraste, en el caso de las harinas vegetales se caracterizan por presentar ácido glutámico, asparagina, ácido aspártico y glutamina principalmente (Abdel-Aal y Sosulski, 2001; Abdel-Aal y Hucl 2002; Pownall et al., 2010). Por esta razón, las fuentes de harinas vegetales presentan generalmente un menor grado de hidrólisis. Consecuentemente, este desequilibrio de aminoácidos esenciales que presentan las harinas vegetales genera retrasos en el crecimiento y una disminución en la eficiencia alimentaria de los peces (Anderson et al., 1995). Por lo tanto, tienen que ser enriquecidas con aminoácidos sintéticos o en su caso con mezclas de harinas cárnicas para cubrir los requerimientos de aminoácidos necesarios por los peces (Bai et al. 2005).

Se tiene bien documentado que el emplear una fase ácida y posteriormente una alcalina durante el proceso de digestión in vitro trae consigo el aumento en el grado de solubilización-hidrólisis de las proteínas y por ende una mayor liberación de aminoácidos (Cheftel et al., 1971; Okaka y Potter, 1979; Dzudie y Hardy, 1996; Ozer, 1997). De acuerdo, a los resultados la harina de pescado presentó altos porcentajes de solubilización-hidrólisis en comparación con el gluten de trigo, además

está última fue la que mostró el menor valor de liberación de aminoácidos con los extractos de los juveniles de *O. niloticus*. Este aspecto ha sido explicado ya que generalmente durante la hidrólisis se produce una neutralización de las cargas aumentando la solubilidad con una mayor magnitud de carga neta (Cheftel et al., 1971; Labucas et al., 2018). En este sentido, los estudios de Morales y Moyano (2010) concuerdan con los resultados obtenidos en esta investigación, donde reportan que la harina de pescado presenta mayor solubilización-hidrólisis en comparación con la harina de soja, lo que se debe principalmente al punto isoeléctrico donde las cargas negativas y positivas existentes determinan la solubilidad de las moléculas de las proteínas a un determinado pH.

Por su parte, las harinas vegetales y animales evaluadas en el presente trabajo mostraron porcentajes de digestibilidad muy variados aun entre cada una de las especies analizadas como se muestra en la tablas 5. Cabe destacar que el método in vitro empleado (celda de digestión) para determinar la digestibilidad es eficiente, lo que permite determinar la bioaccesibilidad de los nutrientes presentes en las harinas evaluadas y determinar la biodisponibilidad de estas (Parada y Aguilera, 2007; Hamdan et al., 2009; Morales y Moyano, 2010; Rahmah et al., 2016). Los resultados obtenidos en este estudio se pueden explicar de la siguiente manera; las harinas empleadas, además de ser de origen diferentes varían en función del métodos de procesamiento y almacenamientos; por lo que estos factores intervienen en la digestibilidad de las proteínas (Glencross et al., 2007; Yasumaru y Lemos, 2014). Las harinas de origen animal, en este caso la harina de pescado, está constituida principalmente por tejido muscular lo que trae consigo proteínas como actina, miosina, globulinas y otras como colágeno (NRC, 1993). En el caso de los cereales cuentan con proteínas principalmente de almacenamiento de tipo albúminas, globulinas, prolaminas y glutaminas (Hamada, 1997; Saenz et al., 2011). Por lo que se considera, que la composición de los ingredientes proteínicos empleados en las formulaciones de los piensos puede influir

sobre la digestibilidad (Glencross et al., 2007). Por lo tanto, la harina de pescado es la mejor fuente de proteínas en la formulación de alimentos para peces (NRC, 1993; Allan et al., 2000). Un aspecto a resaltar es la baja digestibilidad que mostraron las tilapias con el gluten de trigo 17.58% y el salvado de trigo 23.53% con relación a los extractos de *O. niloticus* (omnívoro), lo que se puede atribuir a su alto contenido de carbohidratos que también pueden afectar la biodisponibilidad (Lupatsch et al., 1997). Sin embargo, también los factores antinutricionales presentes en las harinas vegetales influyen significativamente sobre la digestibilidad, lo que trae consigo un descenso en la eficiencia alimenticia y en el crecimiento de los peces (García-Carreño et al., 1997; Alarcón et al., 1999, Francis et al., 2001; Kokou y Fountoulaki, 2018). Estos resultados, han sido corroborados por Moyano et al. (1999), quienes evaluaron el grado de inhibición presente en harinas vegetales, mostrando que las proteasas de las tilapias presentaron los mayores porcentajes de sensibilidad a los inhibidores presentes en las fuentes vegetales evaluadas. Así mismo, El-Sayed et al., (2000) analizaron el efecto de los inhibidores sobre las proteasas digestivas en *O. niloticus*. Sus resultados indican que los peces que fueron alimentados con la dieta control (harina de pescado) fueron significativamente mayores al resto de las dietas que incluían harina de origen vegetal, presentando un porcentaje del 60% de inhibición. Adicionalmente, la dieta control mostró una inhibición del 37%, esto es atribuible al porcentaje de salvado de trigo incluido en la formulación de la dieta.

En esta investigación, a partir de las líneas de tendencia del total de aminoácidos liberados, se pudo determinar el 50% de la hidrólisis de los nutrientes evaluados, lo que permitió observar las variaciones que van desde 1.99 hasta 7.84 h como se muestra en la tabla 5. Estos resultados son muy similares a los presentados por Hamdan et al. (2009), donde emplearon una digestión ácida + alcalina, obteniendo como resultado el doble de la concentración total de aminoácidos liberados en comparación

al emplear solamente la fase alcalina. Además, se mostró que se requiere de 3.40 h para hidrolizar el 50% de la cantidad de la proteína evaluada (70 mg). De forma contraria, cuando se emplea solo la fase alcalina esta requiere de 7.57 h. Estos mismos resultados, se hicieron presentes cuando se evaluó la biodisponibilidad y accesibilidad de la harina de pescado y soja frente a extractos enzimáticos de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Morales y Moyano, 2010). Así como, en el pulpo de roca (*Octopus vulgaris*) donde se determinó el grado de hidrólisis de diferentes fuentes de proteínas empleadas para el diseño de alimentos para estas especies (Hamdan et al., 2014).

En conclusión, el sistema in vitro de celda de digestión de la membrana semipermeable resulta eficiente para la determinación de la bioaccesibilidad de los nutrientes, así como la biodisponibilidad de los aminoácidos liberados durante el proceso de la digestión. Asimismo, la *O. niloticus* y *M. urophthalmus* presentaron mayor digestibilidad por las harinas animales. Sin embargo, la *P. splendida* exhibió mayor afinidad por las harinas vegetales. Esto nos permite determinar que la digestibilidad puede variar en función de la especie en estudio. La información generada es importante para formular alimentos a partir de ingredientes altamente digestibles, de menor costo y amigables con el medio ambiente.

### 7.6 Referencias

- Abdel-Aal E-S M, Hucl, P (2002) Amino Acid Composition and In Vitro Protein Digestibility of Selected Ancient Wheats and their End Products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(6): 737–747.
- Abdel-Aal, E-S M, Sosulski FW (2001) Bleaching and fractionation of dietary fiber and protein from wheat-based stillage. *Lebensm. Wiss. U. Technol.* 34: 159–167.

- Alarcón FJ, Moyano FJ, Díaz M (1999) Effect of inhibitors present in protein sources on digestive proteases of juvenile sea bream (*Sparus aurata*). *Aquatic Living Resources* 12(4): 233–238.
- Alarcón JF, Moyano FJ, Díaz M (2002) Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH-Stat system. *Journal Science of Food and Agriculture* 82: 697-704.
- Allan GL, Parkinson S, Booth MA, Stone DAJ, Rowland SJ, Frances J, Warner-Smith R (2000) Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: I. Digestibility of alternative ingredients. *Aquaculture* 186: 293– 310.
- Alpers DH (1996) Digestion and absorption of carbohydrates and proteins. En: Johnson L.R. (ed). *Physiology of Gastrointestinal Tract*. 3rd ed. New York: Raven Press, 1994: 1723-1749.
- Anderson JS, Lall SP, Anderson DM, McNiven MA (1995) Availability of amino acids from various fish meals fed to Atlantic salmon (*Salmo solar*). *Aquaculture*, 138(1-4): 291–301.
- Anson M (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of General Physiology* 22: 79-89.
- Bai SC, Wang XJ, Shin IS (2005) Dietary dehulled soybean meal as a replacement for fishmeal in fingerling and larger olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *World Aquaculture* 36: 14–16.
- Bassompierre M, Børessen T, Sandfeld P, Rønsholdt B, Zimmermann W, McLean E (1997) An evaluation of open and close systems for in vitro protein digestion of fish meal. *Aquaculture Nutrition* 3: 153-159.
- Biswas KA, Seoka M, Takii K, Kumai H (2007) Comparison of apparent digestibility coefficient among replicates and different stocking density in red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science* 73: 19–26.
- Boatright WL, Hettiarachchy NS (1995) Effect of lipids on soy protein isolate solubility. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 72(12): 1995-1996.
- Boisen S, Eggum BO (1991) Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutrition Research Reviews* 4: 141-162.

- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Burr GS, Barrows FT, Gaylord G, Wolters WR (2011) Apparent digestibility of macro-nutrients and phosphorus in plant-derived ingredients for Atlantic salmon *Salmo salar*, and Arctic charr *Salvelinus alpinus*. *Aquaculture nutrition* 17: 570-577.
- Carpenter KJ, Opstvedt J (1976) Application of chemical and biological assay procedures for lysine to fish meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24(2): 389–393.
- Cheftel C, Aher, M, Wang DIC, Tannenbaum SR (1971) Enzymic solubilization of fish protein concentrate: batch studies applicable to continuous enzyme recycling processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 19(1): 155–161.
- Cho CY (1992) Feeding for rainbow trout and other salmonids. With reference to current estimates of energy and protein requirements. *Aquaculture* 100: 107–123.
- Chong ASC, Hashim R, Ali AB (2002) Assessment of dry matter and protein digestibilities of selected raw ingredients by discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) using in vivo and in vitro methods. *Aquaculture Nutrition* 8: 229-238.
- Church FC, Swaisgood HE, Porter DH and Catignani G (1983) Spectrophotometric assay using o-phthaldehyde for determination of proteolysis in milk proteins. *Journal of Dairy Science*. 66: 1219–1227.
- Clements KD, Raubenheimer D (2006) Feeding and nutrition, In: Evans, D.H., Claiborne, J.B. (Eds.), *The Physiology of Fishes*, 3rd ed. CRC Press, pp. 47–82.
- Cruz SLE (1996) Digestión en camarón y su relación con formulación y fabricación de alimentos balanceados.p 207-232. En: Cruz Suárez, L. E., Ricque Marie, D., Mendoza, R. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 11 al 13 de Noviembre del 1996. Monterrey, Nuevo León, México.

- Dimes LE, Haard NF (1994) Estimation of protein digestibility: I. Development of an in vitro method for estimating protein digestibility in salmonids. *Comparative Biochemistry and Physiology* 108: 349-362.
- Dzudie T, Hardy J (1996) Physicochemical and functional properties of flours prepared from common beans and green mung beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 3029–3032.
- EL-Sayed A-FM, Nmartínez I, Moyano FJ (2000) Assessment of the effect of plant inhibitors on digestive proteases of Nile tilapia using in vitro assays. *Aquaculture International* 8: 403–415.
- Francis G, Makkar HP, Becker K (2001) Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199(3): 197-227.
- García-Carreño F, Navarrete del Toro M de los A, Ezquerro BJM (1997) Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility in vitro. I: Effect of protease inhibitors in protein ingredients. *Journal of Marine Biotechnology* 5: 36-40.
- Gilannejad N, Martínez-Rodríguez G, Yúfera M, Moyano FJ (2018) Modelling digestive hydrolysis of nutrients in fish using factorial designs and desirability function. *PLoS ONE* 13(11): e0206556. <https://doi.org/10.1371/journal>.
- Glencross BD, Booth M, Allan GL (2007) A feed is only as good as its ingredients – a review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. *Aquaculture Nutrition* 13: 17–34.
- Hamdan M, Moyano FJ, Schuhardt D (2009) Optimization of a gastrointestinal model applicable to the evaluation of bioaccessibility in fish feeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 1195–1201.
- Hamdan M, Tomás-Vidal A, Mart S, Cerezo-Valverde J, Moyano FJ (2014) Development of an in vitro model to assess protein bioavailability in diets for common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture Research* 45(12): 2048-2056.
- Harrison LJ, Cunningham FE. (1986) Influence of frozen storage time on properties of salted yolk and its unctuality in mayonnaise. *J. Food Quality* 9: 167-174.

- Jiang ZQ, Sontag-Strohm T, Salovaara H, Sibakov J, Kanerva P, Lojonen J (2015) Oat protein solubility and emulsion properties improved by enzymatic deamidation. *Journal of Cereal Science* 64:126–132.
- Kinsella JE (1979) Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 56 (3Part1): 242–258.
- Kokou F, Fountoulaki E (2018) Aquaculture waste production associated with antinutrient presence in common fish feed plant ingredients. *Aquaculture* 495: 295–310.
- Kong XZ, Zhou HM, Qian HF (2007) Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chemistry* 101: 615–620.
- Labuckas DO, Bongianino A, Galíndez M, Velez AR, Rovetto LJ, López AG, Moretta W (2018) Macrocomponentes y solubilidad proteica de expeller de soja de la provincia de Córdoba. IV Congreso Argentino de Ingeniería – X Congreso Argentino de Enseñanza de la Ingeniería 19 al 21 de septiembre de 2018 – Córdoba, Argentina.
- Lazo JP, Romaine RP, Reigh RC (1998) Evaluation of three in vitro enzyme assays for estimating protein digestibility in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 29: 441–449.
- Lee SM (2002) Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for juvenile and grower rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Aquaculture* 207: 79-95.
- Lupatsch I, Kissil GW, Sklan D, Pfeffer E (1997) Apparent digestibility coefficients of feed ingredients and their predictability in compound diets for gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Aquaculture Nutrition* 3: 81– 89.
- Meyer G, Machado FD (2004) Protein requirement of jundiá fingerlings *Rhamdia quelen*, at two dietary energy concentrations. *Aquaculture* 240: 331-343.
- Morales GA, Moyano FJ (2010) Application of an in vitro gastrointestinal model to evaluate nitrogen and phosphorus bioaccessibility and bioavailability in fish feed ingredients. *Aquaculture* 306: 244–251.

- Moyano FJ, Savoie L (2001) Comparison of in vitro systems of protein digestion using either mammal or fish proteolytic enzymes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 128: 359-368.
- Moyano LFJ, Martínez DI, Díaz LM, Alarcón LFJ (1999) Inhibition of digestive proteases by vegetable meals in three fish species; seabream (*Sparus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African sole (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 122: 327-332.
- Nair BM, Oste R, Asp NG, Dahlqvist A (1976) Enzymic hydrolysis of food protein for amino acid analysis. I. Solubilization of the protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24(2): 386–389.
- National Research Council (NRC) (1993) *Nutrient Requirements of Fish*. National Academy Press, Washington, DC. pp.114.
- New MB, Wijkström UN (2002) Use of fishmeal and fish oil in aquafeeds: further thoughts on the fishmeal trap. FAO Fisheries Circular No. 975, FIPP/C975. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp. 61.
- Ng NK, Lim PK, Boey PL (2003) Dietary lipid and palm oil source affects growth, fatty acid composition and muscle  $\alpha$ -tocopherol concentration of African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture* 215: 229-243.
- Nugent JHA, Jones WT, Jordan DJ, Mangan JL (1983) Rates of proteolysis in the rumen of the soluble proteins casein, fraction I (18S) leaf protein, bovine serum albumin and bovine submaxillary mucoprotein. *British Journal of Nutrition* 50: 357-368.
- Okaka, JC, Potter NN (1979) Physicochemical and functional-properties of cowpea powders processed to reduce beany flavor. *Journal of Food Science*, 44: 1235–1240.
- Osborne TB (1924) *The vegetable proteins*. London: Longmans Green and Co. pp. 13–20.
- Ousterhout LE, Grau CR, Lundholm BD (1959) Biological Availability of Amino Acids in Fish Meals and Other Protein Sources. *The Journal of Nutrition* 69(1): 65–73.
- Ozer E (1997) Acid Solubilization of Fish Protein for Production of Protein Hydrolysate. LSU Historical Dissertations and Theses. 6399.

- Parada J, Aguilera JM (2007) Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science* 72: 21–32.
- Pownall TL, Udenigwe CC, Aluko RE (2010). Amino Acid Composition and Antioxidant Properties of Pea Seed (*Pisum sativum* L.) Enzymatic Protein Hydrolysate Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(8): 4712–4718.
- Puppo MC, Añon MC. (1999) Soybean protein dispersions at acid pH termal and rheological properties. *Journal of Food Science* 64: 50-56.
- Rahmah S, Aliyu-Paiko M, Hashim R (2016) In vivo and in vitro protein digestibility in juvenile bagrid catfish *Mystus nemurus* (Cuvier and Valenciennes 1840) fed soybean meal-based diets. *Aquaculture Research* 47: 1392–1401.
- Reis AP, Valente MPL, Almeida RCM (2008) A fast and simple methodology for determination of yttrium as an inert marker in digestibility studies. *Food Chemistry* 108: 1094–1098.
- Rungruangsak TK, Rustad A, Sunde J, Eiane SA, Jensen HB, Opstvedt JC (2002). In vitro digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: 644-654.
- Sathe SK (2012) Protein solubility and functionality. In N. S. Hettiarachchy (Ed.), *Food proteins and peptides* Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group. pp. 95–124.
- Sathe SK, Zaffran VD, Gupta S, Li T (2018) Protein Solubilization. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 95(8): 883–901.
- Savoie L (1994) Digestion and absorption of food: usefulness and limitations of in vitro models. *Canadian Journal Physiology and Pharmacology* 72: 407-414.
- Shenstone FS (1968) The gross composition, chemistry, and physicalchemical basis organization of the yolk and white, en Carter TC. (Eds.) *Egg Quality: A study of the Hen's Egg*, 26-66. Oliver and Boyd., Edinburgh.
- Smith DM, Tabrett SJ, Glencross BD, Irvin SJ, Barclay MC (2007) Digestibility of lupin kernel meals in feeds for the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 264: 353–362.

- Stone AJD, Gibson GT, Johansen AK, Overturf K, Sealey MW, Hardy WR (2008) Evaluation of the effects of repeated fecal collection by manual stripping on the plasma cortisol levels, TNF- gene expression, and digestibility and availability of nutrients from hydrolyzed poultry and egg meal by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture* 275: 250–259.
- Tacon AGJ, Hasan MR, Metian M (2011) Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects. Rome, Italy, FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 564 pp. 87.
- Tonheim SK, Nordgreen A, Høgøy I, Hamre K, Rønnestad I (2007) In vitro digestibility of water-soluble and water-insoluble protein fractions of some common fish larval feeds and feed ingredients. *Aquaculture* 262: 426–435.
- Vandenberg GW, De La Noue J (2001) Apparent digestibility comparison in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) assessed using three methods of faeces collection and three digestibility markers. *Aquaculture Nutrition* 7: 237-245.
- Vasiluk L, Pinto JL, Tsang WS, Gobas APCF, Eickhoff C, Moore MM (2008) The uptake and metabolism of benzo[a]pyrene from a sample food substrate in an in vitro model of digestion. *Food and Chemical Toxicology* 46: 610–618.
- Walter HE (1984) Proteinases: methods with haemoglobin, casein and azocoll as substrates. En: Bergmeyer HJ (ed). *Methods of Enzymatic Analysis*, vol V. Weinheim: Verlag Chemie 270-7.
- Yasumaru F, Lemos D (2014) Species specific in vitro protein digestion (pH-stat) for fish: method development and application for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), cobia (*Rachycentron canadum*), and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 426–427: 74–84.
- Zar JH (1996) *Biostatistical analysis*, 3rd edn. Prentice Hall, NJ, p 718
- Hamada JS (1997) Characterization of Protein Fractions of Rice Bran to Devise Effective Methods of Protein Solubilization. *Cereal Chemistry* 74(5): 662–668

Zheng XQ, Wang JT, Liu XL, Sun Y, Zheng YJ, Wang XJ, Liu Y (2015) Effect of hydrolysis time on the physicochemical and functional properties of corn glutelin by Protamex hydrolysis. *Food Chemistry* 172: 407–415.

Zhou QC, Tan BP, Mai KS, Liu YJ (2004) Apparent digestibility of selected feed ingredients for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* 241: 441–451.

## VIII. Discusión general

En la actualidad la población humana afronta retos muy importantes al tener que proveer de alimentos a una comunidad que crece desmesuradamente, aunando esto a los efectos que se generan por el cambio climático y por las perturbaciones del ambiente. Todo ello determina que los recursos naturales se vean afectados y condicionen bajas producciones. Para cumplir las metas trazadas por los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) para el 2030, la FAO indica la necesidad de llevar a cabo un programa integral donde la alimentación y la agricultura sean parte importante y ello implica un manejo sustentable de la pesca y la acuicultura (FAO, 2019).

La producción acuícola mundial se ha expandido rápidamente en las últimas décadas para satisfacer la creciente demanda de productos acuáticos que ya no puede ser satisfecha solo por las pesquerías de captura (FAO, 2014). Es por ello que el desarrollo de la acuicultura ha evolucionado a un ritmo vertiginoso con la finalidad de generar mejoras en todas las cadenas de la producción de organismos acuáticos. En este contexto, el objetivo de la presente Tesis es desarrollar investigaciones sobre diferentes aspectos de la fisiología y la bioquímica digestiva de tres cíclidos (*P. splendida*, *O. niloticus* y *M. urophthalmus*) que permitan su aplicación práctica al desarrollo de fórmulas y pautas de alimentación de dichas especies y por tanto redunden en la optimización de su cultivo en México.

Uno de los puntos más importantes durante el cultivo de organismos acuáticos es la producción de larvas, por ser la etapa que va a proveer de organismos para llevar a cabo la producción de peces a una escala comercial. Sin embargo, el problema más frecuente que afrontan los cultivos larvarios es la calidad nutricional de los alimentos, ya que

condiciona el crecimiento y la supervivencia. Entre los aspectos más importantes que se tienen que conocer durante el desarrollo de los cultivos larvarios destacan las transformaciones morfológicas y fisiológicas que presentan las larvas durante las etapas iniciales de ciclo de vida (Yauson, 1988; Balon, 2001; Helfman et al., 2009). Por esta razón, en el Capítulo IV de la presente Tesis se determinaron los cambios en la actividad de las enzimas digestivas durante las etapas iniciales del desarrollo de la tenguayaca (*P. splendida*). Esta investigación proporcionó resultados acerca de los tipos de enzimas presentes y los tiempos en que estas aparecen durante el desarrollo ontogénico-fisiológico de dicha especie. Es de esperar que la información generada ayude a establecer un esquema de alimentación de las larvas basado en alimentos artificiales que permita maximizar el uso nutricional del alimento de acuerdo a las distintas etapas de desarrollo, lo que se verá reflejado en un mejor crecimiento. Esta investigación estaría en línea con la idea expuesta hace algunos años por Kolkovski (2001), quien destacaba la necesidad de desarrollar estudios orientados a profundizar en las condiciones fisiológicas de los peces durante la digestión de los nutrientes de las dietas desde un enfoque basado en el conocimiento de su capacidad enzimática digestiva.

El éxito en los cultivos acuícolas está ligado a una adecuada nutrición, siendo uno de los principales factores que pueden hacer rentable esta actividad a escala comercial (Wang et al., 2016; Saavedra et al., 2018; Ren et al., 2019). Estos procesos nutricionales observan en gran medida en la mejora de la eficiencia digestiva basada en el contenido de los nutrientes que ofrecen los alimentos balanceados (Lemieux et al., 1999). Asimismo, Lazo et al. (2007), describen que la cantidad de nutrientes y los ingredientes en las dietas deben estar formuladas en función de la actividad de las enzimas presentes en el tracto digestivo de los peces. Sin embargo, el resultado neto de la función de la enzima digestiva depende de otros factores importantes, como su concentración relativa presente en

el intestino del pez, así como el tiempo disponible para la hidrólisis. Por lo antes mencionado, en el Capítulo V se llevó a cabo el estudio de la eficiencia enzimática, donde se estableció que la *O. niloticus* requieren de 7.15 h para que el alimento ingerido realice el recorrido por el interior del tubo digestivo hasta que los desechos sean expulsados en forma de heces. Por lo tanto, se calculó la actividad de las enzimas (tripsina y quimotripsina) y el tiempo promedio de residencia de la ingesta en cada sección intestinal (proximal, distal) el cual se le denominó eficiencia enzimática. Con base en lo anterior, se cree que la eficiencia digestiva que presentan los organismos al momento de llegar los nutrientes del alimento al sistema digestivo, se logra cuando se produce una cantidad adecuada de enzimas y un tiempo de interacción suficiente que permita la hidrólisis para la asimilación de los nutrientes (Scocco et al., 1997; Olsson y Holmgren, 2001; Yúfera, 2017). Otros de los puntos importantes a destacar, es el tránsito digestivo el cual modifica los tiempos de interacción nutrientes/enzimas condicionando directamente la eficiencia digestiva y con ello el grado de hidrólisis de los nutrientes. Esta interacción, se ve afectada por factores como se describen en el Capítulo V, en este caso se clasificaron en intrínsecos (talla del pez, presencia o ausencia de estómago, longitud total del intestino, etc.) y los extrínsecos (temperatura del agua, tamaño del alimento, tipo y calidad de ingredientes utilizados en los alimento), siendo determinantes en la eficiencia del proceso digestivo de los peces (Klumpp y Nichols 1983; Targett y Targett 1990; Boujard y Leatherland 1992; Horn y Messer 1992; Bagge 1977; Pääkkönen y Marjomäki 1997; Andersen 1999; Madrid et al., 2001; Hurst, 2004).

El tracto digestivo tiene como función primordial los procesos de digerir (hidrolizar) los nutrientes presentes en los alimentos, con la finalidad de llevar a cabo la transformación mediante hidrólisis y la absorción para ser incorporados a los procesos metabólicos de los organismos (Rønnestad et al., 2007). Además, los alimentos son el medio de transporte para proveer

de nutrientes (proteínas, lípidos, carbohidratos vitaminas y minerales etc.) al organismo. En las formulaciones de los piensos el principal ingrediente empleado es la harina y aceite de pescado, los cuales son utilizados como fuentes de proteínas y lípidos en los alimentos comerciales, una situación que es insostenible tanto ambiental como económicamente (McCoy, 1990; Tacon y Metian, 2008; Hardy, 2010; Dong-Fang et al., 2011). Sin embargo, el crecimiento acuícola, los costes de producción, el recurso limitado y la disponibilidad de los proveedores, han generado que las investigaciones se dirijan en la búsqueda de fuentes alternativas de proteínas y aceites (Naylor et al., 2009). Por lo tanto, las harinas de origen vegetal son una de las mejores alternativas para ser empleadas en las formulaciones de alimentos, por la disponibilidad en el mercado y costes muy accesibles (Bureau y Hua, 2010). No obstante, las harinas vegetales traen consigo inconvenientes como lo son los bajos contenidos de proteínas y limitación de aminoácidos, bajos niveles de ácidos grasos esenciales, menor digestibilidad y el contenido de factores antinutritivos que inhiben la actividad de algunas enzimas (Francis et al., 2001; Kim et al., 2007; Øverland et al., 2009; Salze et al., 2010; Glencross et al., 2012).

Es por ello, que en el Capítulo VI se evaluó el efecto de los inhibidores de proteasas presentes en diferentes fuentes proteínicas de origen vegetal (soja, trigo, sorgo y salvado de trigo) sobre la actividad de las proteasas digestivas de *P. splendida*, *M. urophthalmus* y *O. niloticus*. Además, en este estudio se evaluó la capacidad de inhibición, al observar que a mayor concentración de las harinas mayor fue la sensibilidad de las proteasas presentes en los extractos enzimáticos. Sin embargo, la *P. splendida* es la especie que mostró una mayor sensibilidad a la inhibición proteolítica, que el resto de los organismos en estudio. Este efecto de inhibición de las proteasas, puede ser debido a las diferencias entre las especies y los hábitos alimenticios que estas presentan (Krogdahl y Holm 1983; Tacon 1997; Krogdahl et al., 1994). Debe considerarse que la *P. splendida* es

una especie que tiene hábitos carnívoros (Valtierra y Schmitter 2000) y las *M. urophthalmus* y *O. niloticus* hábitos omnívoros (Fitzsimmons, 1997; Cuenca-Soria et al., 2013). Por esta razón, las enzimas digestivas presentes en las especies omnívoras son más afines a los nutrientes presentes en las harinas vegetales, lo que se compensa con un tiempo mayor para la hidrólisis al tener intestinos más largos. En contraste con organismos carnívoros que muestran mayor afinidad por la proteína de origen animal (Buddington et al., 1997; Uscanga-Martínez et al., 2011). Estudios nutricionales anteriores, se han demostrado que las fuentes vegetales que pertenecen al grupo de las leguminosas y gramíneas presentan en su composición sustancias antinutricionales como los inhibidores de proteasas, lo que reduce la eficiencia enzimática de los organismos que lo consumen (Hendricks y Bailey, 1989; Liener, 1989; Álvarez-González et al., 2008). Asimismo, a estas harinas se les atribuyen otros tipos de antinutrientes a los que se les clasifican como termoestables, como los oligosacáridos, polisacáridos, fitatos, saponinas, estrógenos, cianógenos y los termo-lábiles como las lectinas, inhibidores de proteasas, goitrogenos y antivitaminas (Liu, 1997; Jansman et al., 1998; Belmar y Nava, 2000; Belmar, 2001; Francis, 2001). Teniendo en cuenta que a las harinas vegetales se les realizan tratamientos más adecuados (como el tratamiento térmico) para eliminar la mayor cantidad de los factores antinutricionales, por lo que en general son una excelente alternativa para su inclusión en las formulaciones de alimentos para peces.

Considerando lo anterior, la alimentación es esencial para llevar a cabo con éxito el cultivo de organismos acuáticos. No obstante, es donde se presentan los mayores gastos de operación superando el 50% de los costes totales durante la explotación acuícola (Dong-Fang et al., 2011; Ye et al., 2017). Los pellets alimenticios son la vía de acceso de proteínas y energía para los peces, a partir de una serie de transformaciones estos nutrientes son empleados para un crecimiento óptimo de los organismos

(Cruz-Suarez et al., 2006). Sin embargo, la calidad de los piensos dependerá de los ingredientes que los forman; se sabe que en las formulaciones donde se utiliza la harina de pescado son altamente eficientes por su adecuada composición de aminoácidos esenciales, atractabilidad, palatabilidad, contenido de ácidos grasos, contenido de vitaminas, minerales esenciales y el alto porcentaje de digestibilidad que presentan (Chamberlain, 1993). A pesar de las propiedades de la harina de pescado para las formulaciones de dietas, la variabilidad de las extracciones pesqueras ha generado un mayor precio de adquisición (Higgs et al., 1988; Romero et al., 1994) y la incertidumbre de cubrir la demanda requerida para la fabricación de alimentos (Fontainhas-Fernandes, et al., 1999). En este sentido, las investigaciones en el campo de la nutrición acuícola están dirigidas en buscar opciones proteicas de fuentes de origen animal y vegetal (Watanabe y Pongmaneerat, 1993; Steffens, 1994); y principalmente que no compitan con el uso humano para garantizar las producciones futuras.

El empleo de las fuentes proteicas antes de su inclusión en la fabricación de los pellets deberá de ser evaluados para determinar la calidad de estos ingredientes. Por ello, en el Capítulo VII se llevó a cabo la determinación de la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de las diferentes fuentes proteicas de origen animal y vegetal, por medio de estudios in vitro. En la actualidad existen varios métodos in vitro que simulan la digestión de los organismos y permitan predecir la digestibilidad de los nutrientes. Entre los más usados, es el pH-STAT (Alarcón et al., 2002), pH-DROP (Queiroz et al., 2016), pH-SHIFT (Dimes y Haard, 1994) estos métodos podrían no dar una predicción precisa de la digestibilidad debido al cálculo indirecto de la hidrólisis de las proteínas (Boison y Eggum, 1991). Sin embargo, en la mayoría de los estudios con los métodos descritos anteriormente solo simulan la digestión alcalina (intestinal) sin pasar por la digestión ácida (estómago) (Dimes y Haard, 1994; Bassompierre et al., 1997; Carter et al., 1999; Alarcón et al., 1999). No obstante, en el Capítulo VII para la

simulación se hizo uso del modelo gastrointestinal (celda de digestión) donde la modelización del sistema digestivo se llevó a cabo, en la fase ácida-alcalina obteniendo como resultado un aumento en la liberación de aminoácidos (Hamdan et al., 2009; Morales y Moyano, 2010; Yasumaru y Lemos 2014). Sin embargo, los métodos in vitro están predispuestos para determinar la digestibilidad de los nutrientes, lo cual es una predicción errónea. Por ello, Moyano (2013) puntualiza que el método in vitro se puede modelizar a un nutriente en específico, así como las transformaciones físicas y químicas que pueden presentar por la interacción con el medio acuoso (solubilización).

En el Capítulo VII se evaluó la liberación total de aminoácidos a partir de la digestibilidad in vitro de los extractos de *P. splendida* frente a las harinas animales y vegetales. Los resultados mostraron que la harina de pescado fue significativamente diferente al considerar el total de aminoácidos liberados con respecto al gluten de trigo. Por su parte, para la *O. niloticus* la caseína fue quien mostró la mayor liberación total de aminoácidos con respecto a la harina de pollo y el salvado de trigo. En *M. urophthalmus* no se presentaron diferencias significativas entre las harinas evaluadas. En este aspecto la solubilización de las proteínas o bioaccesibilidad de los nutrientes están siendo influenciados por varios factores clasificados en intrínsecos y extrínsecos (Sathe et al., 2018). Factores 1) intrínsecos: a) la Composición y secuencia de los aminoácidos, la harina de pescado contiene la mayoría de los aminoácidos esenciales (Ousterhout et al., 1957; Carpenter y Opstvedt, 1976; Zhou et al., 2004) y las fuentes vegetales presentan ácido glutámico, asparagina, ácido aspártico y glutaminas (Abdel-Aal y Sosulski, 2001; Abdel-Aal y Hucl 2002; Pownall et al., 2010), De esta forma, los aminoácidos se clasifican de acuerdo a la polaridad de sus radicales; por lo tanto, se agrupan en apolar o hidrofóbicos (ricos en harinas vegetales) menor solubilización y los polares o hidrofílicos (ricos en harinas animales) presentan mayor solubilización (Lehninger et al., 1995), b) estructura de

la proteína, las proteínas tienden a tener una conformación que favorece una mayor interacción con el medio y por ende favorece su solubilización; así como el área de contacto, forma tridimensional, granulometría y el diámetro hidrodinámico de las proteínas (Kong et al., 2007; Sathe, 2012; Zheng et al., 2015; Jiang et al., 2015); c) tipo de proteína, este aspecto depende de la solubilidad que presentan las proteínas, así como la presencia de otras moléculas como las sales diluidas, alcohol, ácidos y álcalis. En los cereales se pueden encontrar proteínas de tipo albúminas, globulinas, prolaminas y glutaminas que las hacen difíciles de hidrolizar (Hamada, 1997); 2) factores extrínsecos: a) pH, el emplear las fases ácida (2-3) y alcalina (9-12) se obtiene el mayor porcentaje de solubilización e hidrólisis (Cheftel et al., 1971; Okaka y Potter, 1979; Dzudie y Hardy, 1996; Ozer, 1997). Por lo tanto, esto se debe principalmente a que se produce una neutralización de las cargas aumentando la solubilidad con una mayor magnitud de carga neta (Cheftel et al., 1971; Morales y Moyano 2010); b) fuerza iónica, es la capacidad de los iones libres para intervenir en la conformación de las proteínas, por lo que a una fuerza iónica menor a la requerida con base en la composición de la proteína puede modificar su estructura y solubilidad debido a cambios en las interacciones de las cargas eléctricas en su conformación nativa. Consecuentemente, a fuerzas iónicas altas, las sales pueden neutralizar grupos iónicos de las proteínas, además que los iones salinos se hidratan ejerciendo competencias por el agua que cubre a la proteína por lo que esta acción reduce la solubilización de la misma (Shenstone, 1968; Kinsella, 1979; Harrison y Cunningham 1986; Puppo y Añon, 1999); c) temperatura del medio, conforme al aumento progresivo de la temperatura será mayor la velocidad de reacción y en consecuencia la solubilización. Sin embargo, temperaturas altas se generan una desnaturalización térmica de las proteínas y/o enzimas (Cheftel et al., 1971; Ozer, 1997) y d) componentes no proteicos, este aspecto se determina por las interacciones que tienen las proteína con otras biomoléculas y elementos. Un ejemplo es el estudio de Boatright y

Hettiarachchy (1995) quienes describen los procesos de desengrasar la harina de soja con hexano, glicerol e isopropanol y por otro lado solamente hexano, el resultado obtenido fue significativamente mayor usando el primer tratamiento mostrando mayor solubilización, en contraste con el empleo del hexano por lo que se hace presente el efecto negativo de los lípidos en la solubilización de las proteínas.

Se empleó el método in vitro (celda de digestión) para medir la digestibilidad de las proteínas presentes en las harinas vegetales empleando una predigestión ácida y posteriormente una alcalina con las condiciones enzimáticas presentes en el Capítulo VII simulando las condiciones del tracto gastrointestinal de los peces en estudio. Se obtuvieron digestibilidades muy variables entre las harinas y las especies en rangos que van de los 17 hasta 79% de digestibilidad. Sin embargo, Moyano (2013) determina que emplear el término de digestibilidad sería un tema que se pondría en discusión, proponiendo el uso de los términos de bioaccesibilidad y biodisponibilidad. Por lo tanto, la modelización del biorreactor empleado en el Capítulo VII nos indica que durante el estudio se llevó a cabo la biodisponibilidad de los nutrientes presentes en las fuentes vegetales. Es así que, la biodisponibilidad se puede definir como la serie de transformaciones metabólicas donde se emplean los procesos de la eficiencia enzimática, absorción y el uso de los nutrientes (Gregory et al. 2005).

En otro orden de ideas, se estimó el tiempo que se emplea para llevar a cabo el 50% de la hidrólisis los resultados obtenidos en Capítulo VII lo que indicó que *O. niloticus* requiere de 1.99 h para hidrolizar (500 g kg<sup>-1</sup> de proteína cruda) de harina de pescado; en contraste con el gluten de trigo se requieren 7.84 h para hidrolizar la misma cantidad de sustrato. Estos resultados son atribuibles, a que los aminoácidos presentes en la harina de pescado pertenecen al grupo de los polares o hidrofílicos presentan mayor solubilización y accesibilidad, en contraste es posible que

los aminoácidos que conforman al gluten de trigo son ricos en los tipos apolares o hidrofóbicos, que tienen una menor solubilidad y en consecuencia, en parte, presentan un menor grado de hidrólisis (Lehninger et al., 1995). No obstante, otro factor que interviene es la presencia de factores antinutricionales como se indica en el Capítulo VI donde los nutrientes presentes en las harinas vegetales requieren de un tiempo mayor para la hidrólisis (Buddington et al., 1997; Uscanga-Martínez et al., 2011).

Los resultados obtenidos en esta Tesis contribuyen a generar información para mejorar las formulaciones dietarias y con ello, optimizar el cultivo de los cíclidos en México (*P. splendida*, *M. urophthalmus* y *O. niloticus*); genero experiencias en las diferentes áreas de producción por medio del control y conocimiento exhaustivo del estudio de la bioquímica digestiva, proceso de alimentación y nutrición durante el desarrollo fisiológico de los peces con el fin de aplicar los conocimientos adquiridos en la optimización de las fórmulas y pautas de alimentación de dichas especies que permitan garantizar su cultivo.

### 8.1 Referencias

- Abdel-Aal E-S M, Hucl, P (2002). Amino Acid Composition and In Vitro Protein Digestibility of Selected Ancient Wheats and their End Products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(6): 737–747.
- Abdel-Aal E-SM, Sosulski, FW (2001) Bleaching and fractionation of dietary fiber and protein from wheat-based stillage. *Lebensm. Wiss. U. Technol.* 34: 159–167.
- Alarcón FJ, Moyano FJ, Díaz M (1999) Effect of inhibitors present in protein sources on digestive proteases of juvenile sea bream (*Sparus aurata*). *Aquatic Living Resources* 12(4): 233–238.
- Alarcón FJ, Moyano J, Díaz M (2002) Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimized pH-stat system. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: 697–704.

- Álvarez-González CA, Márquez-Couturier G, Arias-Rodríguez L, Contreras-Sánchez WM, Uscanga-Martínez A, Perales-García N, Moyano-López FJ, Hernández-Jiménez R, Civera-Cerecedo R, Goytortua-Bores E, Isidro-Olán L, Almeida-Madrugal JA, Tovar-Ramírez D, Gutiérrez-Ribera JN, Arévalo-Galán LM, Gisbert E, Treviño L, Morales-Sánchez, B (2008) Avances en la fisiología digestiva y nutrición de la mojarra tenguayaca *Petenia splendida*. En: Cruz Suarez EL, Ricque Marie D, Tapia Salazar M, Nieto López M, Villarreal Cavazos D, Lazo Corvea J, Viana M (eds) Avances en Nutrición Acuícola IX. Memorias del Noveno Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Monterrey, N.L. México, pp. 135–235.
- Andersen NG (1999) The effects of predator size, temperature, and prey characteristics on gastric evacuation in whiting. *Journal of Fish Biology* 54: 287–301.
- Bagge O (1977) Meal size and digestion in cod (*Gadus morhua* L.) and sea scorpion (*Myoxocephalus scorpius* L.). *Meddelelser fra Danmarks Fiskeri-og Havundersøgelser* 7: 437–446.
- Balon EK (2001) Saltatory ontogeny and the life-history model: neglected processes and patterns of evolution. *J. Bioecon.*, 3(1): 1-26.
- Bassompierre M, Børresen T, Sandfeld P, Rønsholdt B, Zimmermann W, McLean E (1997) An evaluation of open and closed systems for in vitro protein digestion of fish meal. *Aquaculture Nutrition* 3(3): 153-159.
- Belmar R (2001) Importancia de los factores antinutricionales en la alimentación de animales no rumiantes. En: congreso de veterinaria. (10°: 2001: Trujillo) Memorias del X congreso de veterinaria. Yucatán. Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia. pp. 34-54.
- Belmar R, Nava R (2000) Factores antinutricionales en la alimentación de animales monogástricos [en línea]. Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán y Centro Regional Universitario Península de Yucatán. Universidad Autónoma Chapingo.
- Boatright WL, Hettiarachchy NS (1995) Effect of lipids on soy protein isolate solubility. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 72(12): 1995-1996.

- Boisen S, Eggum BO (1991) Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutrition Research Reviews* 4: 141-162.
- Boujard T, Leatherland JF (1992) Circadian rhythms and feeding time in fishes. *Environmental Biology of Fishes* 35: 109-131.
- Buddington RK, Krogdahl A, Bakke-Mckellep AM (1997) The intestines of carnivorous fish: structure and functions and relationships with diet. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum* 638: 67-80.
- Bureau DP, Hua K (2010) Towards effective nutritional management of waste outputs in aquaculture, with particular reference to salmonid aquaculture operations. *Aquaculture Research* 41: 777–792.
- Carpenter, KJ, Opstvedt, J (1976) Application of chemical and biological assay procedures for lysine to fish meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24(2): 389–393.
- Carter CG, Bransden MP, Van Barneld RJ, Clarcke SM (1999) Alternative methods for nutrition research on the southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*: in vitro digestibility. *Aquaculture* 179: 57–70.
- Chamberlain GW (1993) Aquaculture trends and feed projections. *World Aquaculture*, 24(1): 19-29.
- Cheftel C, Aher, M, Wang DIC, Tannenbaum SR (1971) Enzymic solubilization of fish protein concentrate: batch studies applicable to continuous enzyme recycling processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 19(1): 155–161.
- Cruz-Suarez LE, Ruiz-Díaz PP, Cota-Cerecer EM, Nieto-Lopez G, Guajardo-Barbosa C, TapiaSalazar M, Villarreal-Cavazos D, y Ricque-Marie D (2006) Revisión sobre algunas características físicas y control de calidad de alimentos comerciales para amarón en México. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. *Avances en Nutrición Acuícola VIII .VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 15 - 17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

- Cuenca-Soria CA, Alvarez-Gonzalez CA, Ortiz-Galindo JL, Guerrero-Zarate R, Perera-Garcia A, Hernandez-Gomez RE, Nolasco-Soria H (2013) Digestibilidad in vitro de ingredientes proteínicos en la mojarra castarrica *Cichlasoma urophthalmus*. *Universidad y Ciencia* 29(3): 263-275.
- Dimes LE, Haard NF (1994) Estimation of protein digestibility—I. Development of an in vitro method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 108(2–3): 349-362.
- Dong-Fang D, Zhi Yong J, Warren D, Ryan M, Robert PW (2011) Optimal dietary protein levels for juvenile Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) fed diets with two levels of lipid. *Aquaculture* 316: 25–30.
- Dzudie T, Hardy J (1996) Physicochemical and functional properties of flours prepared from common beans and green mung beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 3029–3032.
- FAO (2014) El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014. Roma. pp. 253.
- FAO (2018) El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- FAO (2109) El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo. Protegerse frente a la desaceleración y el debilitamiento de la economía. Roma.
- Fitzsimmons K (1997) Introduction to tilapia Sex-Determination and sex reversal. In: *Proceedings from the fourth international symposium on tilapia in Aquaculture*. Vol. 2, Nov. 9-12. pp. 717-718.
- Fontainhas-Fernandes A, Gomes E, Reis-Henriques MA, Coimbra J (1999) Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of Nile tilapia: digestibility and growth performance. *Aquaculture International* 7: 5767.
- Francis G, Makkar HPS, Becker K (2001) Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199: 197-227.

- Glencross B, Rutherford N, Bourne N (2012) The influence of various starch and nonstarch polysaccharides on the digestibility of diets fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 356–357: 141–146.
- Gregory JF, Quinlivan EP, Davis SR (2005) Integrating the issues of folate bioavailability, intake and metabolism in the era of fortification. *Trends Food Sci Tech* 16: 229-240.
- Hamada JS (1997) Characterization of Protein Fractions of Rice Branto Devise Effective Methods of Protein Solubilization. *Cereal Chemistry*. 74(5): 662–668
- Hamdan M, Moyano FJ, Schuhardt D (2009) Optimization of a gastrointestinal model applicable to the evaluation of bioaccessibility in fish feeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 1195–1201.
- Hardy RW (2010) Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research* 41(5): 770-776.
- Harrison LJ, Cunningham FE. (1986) Influence of frozen storage time on properties of salted yolk and its unctinality in mayonnaise. *Journal of Food Quality* 9: 167-174.
- Helfman GS, Collette BB, Facey DE & Bowen BW (2009) *The Diversity of Fishes: Biology, Evolution, and Ecology*. 2 ed. Hoboken, Wiley-Blackwell.
- Hendricks JD, Bailey GS (1989) Adventitious toxins. In: Halver JE, editor. *Fish Nutrition*, 2nd ed. New York: Academic Press, pp. 605-651.
- Higgs DA, McBride JR, Dosanjh BS., Clarke WC, Archdekin C, Hammons AM (1988) Nutritive value of plant protein sources for fish with special emphasis on canola products. En: *Aquaculture International Congress and Exposition, Aquaculture International Congress, British Columbia Pavilion Corp.*, B.C. Vancouver, British Columbia, Canada, pp. 427-435.
- Horn MH, Messer KS (1992) Fish guts as chemical reactors: a model of the alimentary canals of marine herbivorous fishes. *Marine Biology* 113: 527–535.

- Hurst TP (2004) Temperature and state-dependence of feeding and gastric evacuation in juvenile Pacific halibut. *Journal of Fish Biology* 65: 157–169.
- Jansman AJM, Hill GD, Huisman J, van der Poel AFB (1998) Eds. *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds*; Wageningen Pers: Wageningen, The Netherlands.
- Jiang ZQ, Sontag-Strohm T, Salovaara H, Sibakov J, Kanerva P, Loponen J (2015) Oat protein solubility and emulsion properties improved by enzymatic deamidation. *Journal of Cereal Science* 64:126–132.
- Kim J-D, Tibbetts SM, Milley JE, Lall SP (2007) Effect of the incorporation level of dehulled soybean meal into test diet on apparent digestibility coefficients for protein and energy by juvenile haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L. *Aquaculture* 267: 308–314.
- Kinsella JE (1979) Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 56 (3Part1): 242–258.
- Klumpp DW, Nichols PD (1983) Nutrition of the southern sea garfish *Hyporhamphus melanochir*: gut passage rate and daily consumption of two food types and assimilation of seagrass components. *Marine Ecology Progress Series* 12: 207–216.
- Kong XZ, Zhou HM, Qian HF (2007) Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chemistry* 101: 615–620.
- Krogdahl A, Holm H (1983) Pancreatic proteinases from man, trout, rat, pig, cow, chicken, mink and fox. Enzyme activities and inhibition by soybean and lima bean proteinase inhibitors. *Comparative Biochemistry and Physiology* 74:403–409.
- Krogdahl A, Lea TB, Olli JJ (1994) Soybean protease inhibitors affect intestinal trypsin activities and amino acids digestibilities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 107:215–219.
- Lazo JP, Mendoza R, Holt GJ, Aguilera C, Arnold CR (2007) Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 265: 194-205.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (1995) *Principios de bioquímica*. Segunda edición. Editorial Ediciones Omega. Barcelona, España. pp.

1013. Lemieux H, Blier P, Dutil JD (1999) Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)?. *Fish Physiology and Biochemistry* 20(4): 293-303.
- Liener IE (1980) *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*, Academic Press, Sydney, pp. 425.
- Liu K (1997) In: *Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization*. Chapman & Hall, International Thomson Publishing, Singapore, pp. 532.
- Madrid JA, Boujard T, Sánchez-Vázquez FJ (2001) Feeding rhythms. In: *Food Intake in Fish*. (ed. by D. Houlihan, T. Boujard and M. Jobling) Blackwell Science, London, pp. 189-215.
- McCoy HD (1990) Fishmeal-The critical ingredient in aquaculture feeds. *Aquaculture Magazine* 16 (21): 43-50.
- Morales GA, Moyano FJ (2010) Application of an in vitro gastrointestinal model to evaluate nitrogen and phosphorus bioaccessibility and bioavailability in fish feed ingredients. *Aquaculture* 306: 244–251.
- Moyano F (2013) Modelizando el Biorreactor; o cómo Conocer Mejor el Digestivo de sus Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), *Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola*, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.356-375.
- Naylor RL, Hardy RW, Bureau DP, Chiu A, Elliott M, Farrell AP, Nichols PD (2009) Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 15103–15110.
- Okaka, JC, Potter NN (1979) Physicochemical and functional-properties of cowpea powders processed to reduce beany flavor. *Journal of Food Science*, 44: 1235–1240.
- Olsson C, Holmgren S (2001) The control of gut motility. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 128: 481–503.

- Ousterhout, L. E., Grau, C. R., & Lundholm, B. D. (1959). Biological Availability of Amino Acids in Fish Meals and Other Protein Sources. *The Journal of Nutrition*, 69(1): 65–73.
- Øverland M, Sørensen M, Storebakken T, Penn M, Krogdahl Å, Skrede A (2009) Pea protein concentrate substituting fish meal or soybean meal in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*)—Effect on growth performance, nutrient digestibility, carcass composition, gut health, and physical feed quality. *Aquaculture* 288: 305–311.
- Ozer E (1997) Acid Solubilization of Fish Protein for Production of Protein Hydrolysate. *LSU Historical Dissertations and Theses*. 6399.
- Pääkkönen J-PJ, Marjomäki TJ (1997) Gastric evacuation rate of burbot fed single-fish meals at different temperatures. *Journal of Fish Biology* 50: 555–563.
- Pownall TL, Udenigwe CC, Aluko RE (2010). Amino Acid Composition and Antioxidant Properties of Pea Seed (*Pisum sativum* L.) Enzymatic Protein Hydrolysate Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4712–4718.
- Puppo MC, Añon MC. (1999) Soybean protein dispersions at acid pH: thermal and rheological properties. *Journal of Food Science* 64: 50-56.
- Queiroz MF, De Almeida OMGi, Brunoro CNM, Vieira PC, Passos RF (2016) Capability of in vitro digestibility methods to predict in vivo digestibility of vegetal and animal proteins. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 66: 1.
- Ren M, He J, Liang H, Ji K, Ge X, Sun A, Pan L, Masagounder K (2019) Use of supplemental amino acids on the success of reducing dietary protein levels for Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) *Aquaculture Nutrition* 25: 567–576.
- Romero JJ, Castro E, Díaz AM, Revenco M, Zaldívar J (1994) Evaluation of methods to certify the “premium” quality of Chilean fish meals. *Aquaculture*. 124:351-358.
- Rønnestad I, Kamisaka Y, Conceição LEC., Morais S, Tonheim SK (2007) Digestive physiology of marine fish larvae: Hormonal control and processing capacity for proteins, peptides and amino acids. *Aquaculture*, 268(1-4): 82–97.

- Saavedra M, Pereira TG, Candeias-Mende A, Carvalho L, Pousão-Ferreira P, Conceição LEC (2018) Effect of increased dietary protein level in meagre (*Argyrosomus regius*) juvenile growth and muscle cellularity. *Aquaculture Nutrition* 24: 1153–1159.
- Salze G, McLean E, Battle PR, Schwarz MH, Craig SR (2010) Use of soy protein concentrate and novel ingredients in the total elimination of fish meal and fish oil in diets for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* 298: 294–299.
- Sathe SK (2012) Protein solubility and functionality. In N. S. Hettiarachchy (Ed.), *Food proteins and peptides* Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group. pp. 95–124.
- Sathe SK, Zaffran VD, Gupta S, Li T (2018) Protein Solubilization. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 95(8): 883–901.
- Scocco P, Menghi G, Ceccarelli P (1997) Histochemical differentiation of glycoconjugates occurring in the tilapia intestine. *Journal of Fish Biology* 51: 848–857.
- Shenstone FS (1968) The gross composition, chemistry, and physicalchemical basis organization of the yolk and white, en Carter TC. (Eds.) *Egg Quality: A study of the Hen's Egg*, 26-66. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Steffens W (1994) Replacing fish meal poultry by-product meal in diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mikiss*. *Aquaculture*, 124: 27-34.
- Tacon AGJ, Metian M (2008) Global over view on the use of fishmeal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* 285: 146–158.
- Tacon AGJ (1997) Fish meal replacers: review of anti-nutrients within oil seeds and pulses – a limiting factor for the aquafeed green revolution? In: Tacon A., Basurca B. (Eds.) *Feeding Tomorrow's fish. Cahiers options Mediterranean's* 22: 154–182.
- Targett TE, Targett NM (1990) Energetics of food selection by the herbivorous parrotfish *Sparisoma radians*: roles of assimilation efficiency, gut evacuation rate, and algal secondary metabolites. *Marine Ecology Progress Series* 66: 13–21.

- Uscanga-Martínez A, Moyano-López, FJ, Álvarez-González, CA, Perales-García, N (2011) Aplicaciones a la mejora de la utilización nutritiva del alimento en cíclidos cultivados en México. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 46-104.
- Valtierra VMT, Schmitter SJJ (2000) Hábitos alimentarios de las mojarras (Perciformes: Cichlidae) de la laguna Caobas, Quintana Roo, México. *Revista Biología Tropical* 8: 2-3.
- Wang J, Jiang Y, Li X, Han T, Yang Y, Hu S, Yang M (2016) Dietary protein requirement of juvenile red spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Aquaculture* 450: 289–294.
- Watanabe T, Pongmaneerat J (1993) Potential of soybean as a protein source in extruded pellets for rainbow trout. *Nipp. Suis. Gakkaishi*, 59(8): 1415-1423.
- Yasumaru F, Lemos D (2014) Species specific in vitro protein digestion (pH-stat) for fish: method development and application for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), cobia (*Rachycentron canadum*), and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 426–427: 74–84.
- Ye W, Han D, Zhu X, Yang Y, Jin J, Xie S (2017) Comparative study on dietary protein requirements for juvenile and pre-adult gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III). *Aquaculture nutrition* 23: 755–765.
- Youson JH (1988) 2 First Metamorphosis. *Fish Physiol Part B*. 11: 135-96.
- Yúfera, M (2017) El Ciclo Diario de la Digestión en Peces Cultivados. Aspectos Funcionales y Metodológicos. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., NietoLópez, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., López Acuña, L.M. y Galaviz-Espinoza, M. (Eds), Investigación y Desarrollo en Nutrición Acuícola Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 55-77.

Zheng XQ, Wang JT, Liu XL, Sun Y, Zheng YJ, Wang XJ, Liu Y (2015) Effect of hydrolysis time on the physicochemical and functional properties of corn glutelin by Protamex hydrolysis. *Food Chemistry* 172: 407–415.

Zhou QC, Tan BP, Mai KS, Liu YJ (2004) Apparent digestibility of selected feed ingredients for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* 241: 441–451.

## IX. Conclusiones

1. El estudio de la ontogenia enzimática durante el desarrollo larvario de *Petenia splendida* permite establecer que las principales enzimas digestivas están presentes a partir del día 6 después de la eclosión y que sus actividades se desarrollan con rapidez, lo que permitiría la alimentación con dietas artificiales a partir de los 10 días después de la eclosión.
2. El tiempo medio de tránsito digestivo en juveniles de *Oreochromis niloticus* se estableció en poco más de 7 h. Este bajo tiempo de permanencia, característico de un pez omnívoro, se vio compensado por una elevada producción de proteasas intestinales, particularmente tripsina, que garantizaban la máxima eficiencia en la digestión de la proteína del alimento.
3. Se ha puesto de manifiesto que diferentes ingredientes de origen vegetal, tales como sorgo, soja y harina y salvado de trigo presentan inhibidores de las proteasas digestivas alcalinas de las 3 especies de cíclidos estudiadas. Aunque se observan importantes diferencias en función del ingrediente y la especie, se demostró una elevada sensibilidad general de las proteasas de *Petenia splendida*. La utilización de cualquiera de estos ingredientes en piensos para estas especies debe tener en cuenta este efecto indeseado sobre la eficacia de la digestión proteínica.

4. El uso de modelos digestivos in vitro permitió establecer diferencias en la aptitud de diferentes ingredientes proteicos para ser hidrolizados por las proteasas de las 3 especies estudiadas. Los resultados mostraron una mayor homogeneidad en el caso de las especies que presentan digestión gástrica (castarrica y tenguayaca) frente a la que sólo tiene digestión intestinal (tilapia)
  
5. Tanto los estudios de inhibición como de modelización de la hidrólisis, basados en enfrentar ingredientes con las enzimas digestivas en condiciones controladas, permiten obtener información muy útil para la selección de los ingredientes más adecuados a emplear en los piensos de las especies objetivo.

