



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

***“EL PAPEL DE LOS NUTRIENTES Y LA CAPACIDAD DE DIGERIRLOS
EN LAS CARACTERÍSTICAS DE LA PROGENIE, DESARROLLO DE
DIETAS ESPECÍFICAS PARA OCTOPUS MAYA RECIÉN
ECLOSIONADOS”***

TESINA

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

AMAURY CERÓN PÉREZ



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: M. en C. RAÚL GENARO ÁGUILA CABALLERO
VOCAL: M. en C. LUCIA CORNEJO BARRERA
SECRETARIO: Dr. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES
1ER. SUPLENTE: Dra. ILIANA ELVIRA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ
2° SUPLENTE: Dra. LILIANA ROCÍO GONZÁLEZ OSNAYA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE BIOPROSPECCIÓN COSTERA
UNIDAD DE QUÍMICA- SISAL YUCATÁN
FACULTAD DE QUÍMICA UNAM**

ASESOR DEL TEMA:

DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES

SUSTENTANTE:

AMAURY CERÓN PÉREZ

ÍNDICE TEMÁTICO		Página
1. Resumen		1
2. Introducción		2
3. Marco Teórico		5
3.1. Situación actual de <i>Octopus maya</i>		5
3.2. Diseño de dietas experimentales y requerimientos nutrimentales de <i>Octopus maya</i>		6
3.3. Proteínas y su calidad		8
3.3.1. Métodos Químicos de evaluación de la calidad de la proteína		9
3.3.2. Métodos Biológicos de evaluación de la calidad de la proteína		10
3.3.3. Métodos Enzimáticos de evaluación de la calidad de la proteína		10
3.4. Descripción de las características de la dieta ideal de <i>O. maya</i>		11
3.5. Evaluación de la dieta		15
4. Justificación		16
5. Objetivo general		17
5.1. Objetivos particulares		17
6. Metodología (Diagrama general de la Investigación)		18
6.1. Diseño de una dieta adecuada para <i>Octopus maya</i>		19
6.1.1. Revisión bibliográfica de la calidad de los insumos disponibles		19
6.1.2. Elaboración de la propuesta		19
6.2. Realización del hidrolizado de calamar		20
6.2.1. Cuantificación del colágeno en el manto de calamar		20
6.2.2. Hidrólisis enzimática		21
6.3. Mezcla de Ingredientes		22
6.4. Análisis Bromatológico de las dietas		22
6.5. Selección de los organismos de la especie <i>Octopus maya</i>		23
6.5.1. Aclimatación de <i>Octopus maya</i>		24
6.6. Evaluación de la dieta de los organismos		26
7. Resultados y Análisis de resultados		27
8. Conclusiones		44
9. Prospectivas		45
10. Bibliografía		46

ABREVIATURAS

Aminoácidos Esenciales	(AAE)
Aminoácido Limitante	(AAL)
%Amino Ácido Esencial Relativo	(%AAER)
Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	(CLAR, HPLC)
Coeficiente de Digestibilidad Aparente	(CDA)
Coeficiente de Digestibilidad Verdadera	(CDV)
Cuenta Química	(CQ)
Cuenta Química Corregida por Digestibilidad de la Proteína	(CQC DP)
Índice de Oser	(IO)
Mezcla de Residuos de los Mataderos	(MRM)
<i>Octopus maya</i>	(<i>O. maya</i>)
Relación de Eficiencia Proteínica	(REP)
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación	(SAGARPA)
Tasa de Conversión de Alimentos	(TCA)
Tasa Específica de Crecimiento	(TEC)
Tasa de Crecimiento	(TC)
Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación	(UMDI)
Utilización Neta de la Proteína	(UNP)
Valor Biológico	(VB)

ÍNDICE DE FIGURAS

N° Figura	Título	Página
1.	<i>Remoción mecánica del colágeno.</i>	19
2A.	<i>Muestras en tubos Durham.</i>	20
2B.	<i>Tubos Durham en el reactor de hidrólisis.</i>	20
2C.	<i>Estación de trabajo Pico Tag.</i>	20
3A.	<i>Huevecillos de O. maya.</i>	23
3B.	<i>Individualización de las crías de O. maya.</i>	23
4.	<i>Caracol Megalongena corona bispinosa usado a manera de refugio.</i>	23
5.	<i>Tarjas adaptadas al sistema de recirculación de agua de mar.</i>	24
6.	<i>Contenedores plásticos distribuidos en la tarja adaptada al sistema de recirculación de agua de mar.</i>	24
7.	<i>Conchas de mar con la comida para las crías de O. maya.</i>	25,34
8.	<i>Calidad de las proteínas de los insumos.</i>	30
9.	<i>Requerimientos nutrimentales de O. maya.</i>	31
10.	<i>Estándar de Aminoácidos.</i>	40
11.	<i>Estándar de Hidroxiprolina.</i>	40
12.	<i>Muestra de manto de calamar.</i>	41
13.	<i>Resultados de la hidrólisis enzimática con diferentes condiciones y procesamiento de la muestra.</i>	42

ÍNDICE DE TABLAS

N° Tabla	Título	Página
1.	<i>Composición de las dietas experimentales; la dieta 1 se tomara como control, las dietas 2 y 3 son las propuestas experimentales.</i>	26
2.	<i>Grupos experimentales de O. maya.</i>	26
3.	<i>Insumos disponibles en la UMDI para la elaboración de una dieta experimental de O. maya.</i>	27
4.	<i>Contenido de aminoácidos (g / 100 g Proteína) de los diferentes insumos disponibles para la elaboración de la dieta para las crías de O. maya, así como el perfil de aminoácidos de huevos de hembras alimentadas con jaibas (patrón a usar).</i>	28
5.	<i>Contenido relativo de aminoácidos de los Insumos (g Amino ácidos Relativos / 100 g Proteína), Cuenta Química (CQ) e Índice de Oser (IO) de los Insumos.</i>	29
6.	<i>Ventajas y desventajas de los tratamientos hidrolizado enzimático, químico y concentrado proteínico.</i>	37
7.	<i>Resultados del análisis bromatológico de la dieta control.</i>	43

1. Resumen

El pulpo rojo (*Octopus maya*) es una especie endémica de Yucatán y constituye uno de los recursos pesqueros más importantes de la Península, con una captura anual de 10, 000 toneladas (CONAPESCA, 2012), la cual se ha reducido recientemente, debido a problemas de sobreexplotación, mareas rojas, entre otros fenómenos. Una de las soluciones a esta problemática es la acuicultura, que en el caso de *O. maya* ha demostrado ser factible dada su biología. Sin embargo, hasta la fecha el principal problema para el desarrollo de la acuicultura del pulpo rojo, es la falta de una dieta económica para los principales estadios.

En el presente trabajo se realizó una búsqueda bibliográfica extensiva acerca de la elaboración de las dietas para las crías recién eclosionadas de *O. maya*; de manera que se logró plantear una propuesta de dieta con base a la literatura consultada.

En el análisis de las dietas anteriores se incluyeron los parámetros de calidad nutricional de los insumos, así como las características y procesos que pueden ser perjudiciales para el crecimiento de *Octopus maya*; de manera que se eligieron los que tenían una mayor calidad nutricional, y posteriormente se sugirió un tratamiento previo a la elaboración de la dieta, con la finalidad de ver el efecto de dicha propuesta.

El objetivo de la propuesta consiste aumentar las tasas de crecimiento mediante la mejora de la absorción de los principales nutrientes (proteína), realizando un hidrolizado proteínico enzimático, lo que permite mantener la calidad de la proteína y a su vez aumentar la velocidad de absorción. La propuesta consiste en someter a una hidrólisis enzimática (con Colagenasa) al manto de calamar (componente principal) de la dieta propuesta, de tal manera que se pueda evaluar si el tratamiento enzimático logró mejorar la absorción, la cual se verá reflejada en mayores tasas de crecimiento del organismo en cuestión.

En ésta tesina también se sugieren las técnicas para evaluar el efecto de la dieta experimental mediante un ensayo biológico, así como la estandarización del manejo de los animales y el sistema de cultivo, la elaboración de la dieta experimental, de manera que se pueda establecer un proceso controlado y fácil de analizar. Por último se abordan las perspectivas de continuar con la acuicultura del pulpo rojo de Yucatán, así como sus posibles beneficios

2. Introducción.

El pulpo es un cefalópodo carnívoro y caníbal, presente en aguas de climas templados y tropicales de todo el mundo, tiene un cuerpo blando con un cerebro bien desarrollado y ocho brazos, cada uno de los cuales posee dos filas de ventosas (Munguía, *et. al.* 2007). En la península de Yucatán se puede encontrar una especie endémica, *Octopus maya*, la cual está distribuida desde la bahía de Campeche hasta el norte de la península de Yucatán (Domingues, *et. al.* 2012). Dicha especie ha adquirido un creciente interés comercial por diversas razones como nutrimentales, económicas y ambientales:

Dentro de las razones nutrimentales se contempla que *O. maya* posee un alto valor nutricional, ya que contienen vitaminas A, B, C y D; compuestos glicero-fosfóricos; cloruros; hidratos de carbono, y proteínas en cantidades adecuadas y de fácil digestión. Las proteínas que están presentes en los cefalópodos son digeribles casi en un 100%, contra el 63% de las de carne de res (Munguía, *et. al.* 2007), lo cual representa una buena opción para cuidar la salud de los consumidores.

Dentro de las razones económicas se contempla que es una especie con buena aceptación en mercado internacional, y sus principales consumidores son España, Japón e Italia (Munguía, *et. al.* 2007). Con lo cual dicha pesquería representa para la zona costera de Yucatán el principal ingreso, debido a los volúmenes de captura y el nivel de precio. Ésta actividad económica tiene tal relevancia que habitantes de los municipios no costeros se vuelven pescadores en los meses de pesca del pulpo *O. maya* para obtener un ingreso clave en su economía (Munguía, *et. al.* 2007).

Dentro de las razones ambientales se encuentra la situación actual de las pesquerías en el mundo, se han capturado volúmenes importantes de las especies comestibles, llevándolas a su sobreexplotación (F.A.O., 2010), la pesquería de *Octopus maya* no ha sido la excepción ya que se ha incrementado a tal grado que han causado su sobreexplotación, en años recientes se han observado grandes fluctuaciones en los volúmenes de captura (Munguía, *et. al.* 2007). Por otra parte, se han realizado proyecciones por parte de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), donde se muestra una tendencia a la disminución drástica en la captura de *O. maya*.

Esto ha fomentado la toma de acciones que permitan cubrir la demanda existente y a su vez permitan cuidar los recursos naturales, como son la acuicultura y diversificación de los productos marinos, entre otras.

La diversificación de la pesca convirtió a *O. maya* en una de las especies más explotadas en la pesquería mexicana con 10,000 toneladas anuales de captura (CONAPESCA, 2012), se ha comercializado en gran medida gracias a que presentan varias ventajas biológicas como altas tasas de crecimiento (TC), lo que implica un gran potencial para competir con el mercado de los pescados (Iker, *et al.*, 2011).

Debemos considerar que ambientalmente la sobreexplotación de *O. maya* implica la afectación de otras especies y por ende la alteración drástica del ecosistema. Por ejemplo la jaiba azul (*Callinectes sapidus*), es usada como carnada en la pesquería del pulpo, sin mencionar que dicha especie es comúnmente usada en la alimentación humana.

Ante las alteraciones del ecosistema se ha tratado de aumentar la producción acuícola, aunque aún existen grandes retos para poder industrializar la producción de *O. maya*. De acuerdo a los estudios realizados en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en Sisal, Yucatán, se han encontrado las condiciones controladas para la reproducción de *O. maya* en cautiverio (Rodríguez y Carmona, 2008).

Sin embargo, uno de los principales dilemas para poder industrializar la producción de pulpos mediante la acuicultura reside en la habilidad de crear una dieta económica y nutricionalmente adecuada (Quintana, *et al.* 2010), que permita sustituir la alimentación con presas vivas. La alimentación es un elemento decisivo que forma parte de todo sistema de producción animal, está presente en todas las fases del proceso, afectando directamente el crecimiento, engorda, maduración y reproducción de los organismos (Martínez Y. 2010), así como el costo de producción. Éste es un punto vital en el sistema de producción ya que se ha reportado que el costo del alimento llega a representar hasta el 60% de los gastos operativos de las granjas que cultivan pulpos (Rodríguez y Carmona, 2008).

Para intentar industrializar la producción de *O. maya* se han desarrollado diversas dietas artificiales las cuales no han logrado el desarrollo óptimo de *O. maya*, sin embargo han demostrado que es posible el desarrollo de una dieta inerte para su alimentación.

Por lo cual el presente trabajo reúne la mayor cantidad de información posible acerca de la elaboración de las dietas para *O. maya* de tal modo que sirva como guía para continuar con el desarrollo de las dietas y lograr la industrialización de dicha especie.

3. Marco teórico

3.1 Situación actual del pulpo rojo *Octopus maya*

El reciente interés por cultivar *O. maya* está guiado por los aspectos: económico y biológico.

En el aspecto biológico son buenos prospectos para la acuicultura, debido a sus elevadas TC, (Quintana, *et.al.* 2010), la alta supervivencia de las crías y ciclos de vida cortos, aproximadamente de tres años (Rodríguez y Carmona, 2008), sin embargo alcanza su peso máximo (3.5 kg en promedio) a los 9 meses después de la eclosión (Domingues, *et. al.*, 2012), lo cual lo hace ideal para la comercialización, *O. maya* presenta otras particularidades como su desarrollo directo de la eclosión sin tener fases larvianas, lo que disminuye la mortandad.

Al considerar el impacto económico y social de la pesquería de *O. maya* se encontró que ocupa el cuarto lugar a nivel nacional de captura en el litoral del Golfo de México y el Caribe, generando aproximadamente la mitad del valor agregado de esta región, tal es la importancia y concurrencia de la actividad pesquera de *O. maya* que ha llegado a ser sobreexplotada. Para evitar esta situación se ha intentado regular mediante la aplicación de las normas oficiales NOM-008-PESC-1993 y NOM-009-PESC-1993 en las cuales se establece la talla mínima de captura, artes de pesca y la temporada de veda de *O. maya*.

Sin embargo dichas medidas no han sido suficientes para asegurar la preservación del recurso, diversos factores como la sobreexplotación, desastres naturales como las mareas rojas, entre otros (pesca ilegal), han generado constantes fluctuaciones en los volúmenes de pesca.

Estas circunstancias han impulsado el estudio de las condiciones de cultivo, fisiología, crecimiento y reproducción de *O. maya*, con los cuales se ha demostrado que pueden ser cultivados en condiciones de laboratorio (Iker, *et al.*, 2011). Sin embargo, aún no ha sido posible la industrialización debido a la falta de conocimiento sobre las características de los alimentos habitualmente ingeridos y los requerimientos nutrimentales de los individuos, a fin de realizar una adecuada elaboración de dietas artificiales para el crecimiento, reproducción y engorda de los organismos en cuestión.

3.2 Diseño de dietas experimentales y requerimientos nutrimentales de *Octopus maya*

El diseño de las dietas experimentales se ha guiado con base en su forma de vida, en general los pulpos son cazadores solitarios, exploradores y versátiles con adaptaciones morfológicas y conductuales que les permiten manipular diversos tipos de presas, como poliquetos, bivalvos, gasterópodos, cangrejos e incluso presas de desplazamiento rápido como los peces (Portela, 2011). Al tener una amplia gama de presas, los pulpos son considerados como oportunistas, de manera que su dieta depende de su preferencia y disponibilidad del alimento, lo cual es una ventaja para poder crear una dieta artificial y lograr la industrialización de la producción de dicha especie.

A su vez es necesario el estudiar los requerimientos nutrimentales de *O. maya*, dentro de estos estudios se ha encontrado que su metabolismo es acelerado (Martínez Y. 2010) y esencialmente proteínico, a diferencia de los peces o crustáceos (Valero, 2009).

Una de las formas que se ha utilizado comúnmente para estudiar el metabolismo de los individuos es la detección de los principales órganos de digestión, sus cambios histológicos y cinéticos.

Para *O. maya* dicho órgano es la glándula digestiva, así mismo se reportan los cambios que ésta presenta en función de la edad del pulpo, descubriendo de esta manera, una importante utilización de lípidos endógenos en los primeros días de vida (hasta el día 12 después de eclosionados), los cuales son consumidos como principal fuente de energía (Martínez, *et.al.* 2010), esto se debe a que a pesar de que las crías de *O. maya* poseen aparentemente el cuerpo de un adulto, aun no desarrollan la habilidad de ser cazadores eficientes, de manera que las reservas les son de vital importancia para poder desarrollar sus habilidades como cazadores y poder subsistir.

De igual forma, se ha encontrado que la principal biomolécula para el mantenimiento de las funciones vitales, la producción de energía, reproducción y crecimiento, son las proteínas, encontrándose también una consecuente baja utilización de los hidratos de carbono y lípidos.

También se demostró que dietas con elevadas cantidades de lípidos es perjudicial para el crecimiento de *O. maya*; se tiene la hipótesis de que los lípidos saturan o taponan los sitios de absorción de las proteínas. A su vez se ha demostrado que *O. maya* tiene una baja capacidad de digerir los polímeros de hidratos de carbono (Rosas, et al., 2012), e incluso pueden llegar a limitar la absorción de las proteínas, ya que el uso de polímeros de hidratos de carbono como aglutinantes (Alginatos), tiene un efecto negativo en crecimiento del pulpo.

Por lo tanto, es de vital importancia que la proteína presente en la dieta del pulpo tenga una adecuada calidad nutricional; esta importancia se ve reflejada en la composición corporal de *O. maya*, ya que mayoritariamente se compone de proteínas, éstas representan cerca del 16.6%, los hidratos de carbono representan cerca del 1% y los lípidos <2% de su peso húmedo.

3.3 Proteínas y su calidad

Las proteínas son sustancias orgánicas complejas y de elevado peso molecular, formadas por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, los cuales son los principales elementos estructurales de las células (Soriano, J. 2006). Cada especie animal o vegetal está conformada por su propio tipo de proteínas.

Las proteínas del cuerpo se encuentran siempre en un continuo proceso de renovación, es decir, por un lado se degradan hasta sus aminoácidos constituyentes y por otro se utilizan estos aminoácidos junto con los obtenidos en la dieta, para sintetizar nuevas proteínas, de acuerdo a las necesidades del organismo, ya que las proteínas tienen una muy amplia gama de funciones.

Para poder llevar a cabo la síntesis de proteína, las células necesitan que estén presentes todos los aminoácidos que compondrán la futura proteína y además en una cantidad suficiente. De entre todos los aminoácidos que puede contener una proteína los más importantes son los aminoácidos esenciales (AAE), se les llaman esenciales pues deben ser provistos por la dieta, ya que el organismo no es capaz de sintetizarlos o bien su síntesis es muy lenta, comparada con los requerimientos (Soriano, J. 2006).

Comúnmente se les llama proteínas de baja calidad a aquellas proteínas que contienen uno o más AAE en proporciones bajas, es decir, que tiene poco contenido de uno o más aminoácidos comparados con un patrón, al aminoácido que se encuentra en menor cantidad en la proteína comparado con el patrón, se le denomina Aminoácido Limitante. De manera que se puede definir a la calidad de una proteína como el grado de aproximación química de la proteína de estudio con respecto a las proteínas de un organismo o individuo.

A lo largo del tiempo se han desarrollado una gran variedad de índices y métodos para evaluar la calidad de las proteínas, los cuales pueden ser clasificados en métodos químicos, biológicos y métodos enzimáticos (Soriano, J. 2006).

3.3.1 Métodos químicos de evaluación de la calidad de la proteína:

Aminograma (perfil de aminoácidos). Es la cuantificación de los aminoácidos presentes en una proteína, se realiza por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR, HPLC, por sus siglas en inglés High-performance liquid chromatography), con una previa hidrólisis de la proteína y se expresa en gramos de aminoácidos por 100 gramos de proteína.

Cuenta química. Es una comparación del contenido de AAE de una proteína con respecto a una proteína control, expresado en porcentaje, dicha comparación se realiza aminoácido por aminoácido usando la siguiente ecuación:

Ecuación 1:

$$\%AAER = \frac{\left(\frac{g AA}{100 g Muestra}\right)_{Insumo a evaluar}}{\left(\frac{g AA}{100 g Muestra}\right)_{Patrón}}$$

Donde %AAER= g Aminoácidos Esenciales Relativos / 100 g Insumo

Se considera el aminoácido limitante es el que otorga la calificación química, es decir, el valor mínimo de dicha comparación se considera como la calificación química o cuenta química de la proteína en evaluación.

Índice de AAE (Índice de Oser). Es la media geométrica de las relaciones de cada AAE en la proteína problema con respecto de la referencia. Dicho índice puede calcularse con la siguiente ecuación:

Ecuación 2:

$$IO = \left(10^{\left[\frac{1}{n} \times (\log(AAER1) + \log(AAER2) + \dots + \log(AAERn))\right]}\right)$$

Donde:

IO= Índice de Oser

n= número de aminoácidos detectados en el aminograma o perfil de aminoácidos

AAER_n= Aminoácido Esencial Relativo n

3.3.2 Métodos biológicos de evaluación de la calidad de la proteína:

Se realizan en animales de experimentación y tienen en cuenta la utilización de la proteína de la dieta experimental. Los más utilizados son el Valor Biológico (VB), Utilización de Proteína Neta (UPN), Cuenta Química Corregida por Digestibilidad de la Proteína (CQCDP). Éstos Índices no evalúan la proteína de forma intacta, sino que se digieren químicamente y se cuantifica el nitrógeno ingerido de la dieta, proteínico, fecal, urinario, etc.

A continuación se hará una breve descripción de algunos métodos (Soriano J. 2006):

- Relación de Eficiencia Proteínica (REP). Es el aumento de peso corporal dividido por el peso de proteínas consumidas.
- Coeficiente de Digestibilidad Aparente (CDA). Es la proporción de nitrógeno proteínico del alimento absorbido respecto al ingerido.
- Coeficiente de Digestibilidad Verdadera (CDV). Es muy semejante al Coeficiente de Digestibilidad Aparente, sin embargo en éste método se toma en cuenta que parte del nitrógeno eliminado por las heces es de origen endógeno y no procede exclusivamente del absorbido desde la dieta.
- Valor Biológico (VB). Es la proporción de nitrógeno absorbido que queda retenido en el organismo, en éste método la proteína en estudio es la única fuente de nitrógeno de la dieta. Se requiere de la previa evaluación de las pérdidas de nitrógeno fecal y urinario endógeno.
- Utilización Neta de la Proteína (UNP). Es la proporción del nitrógeno consumido que queda retenido por el organismo. Se puede obtener multiplicando el valor biológico por la digestibilidad, en cuyo caso se denomina calculada.
- Cuenta Química Corregida por Digestibilidad de la Proteína (CQCDP). Compara la concentración del aminoácido limitante en la proteína de ensayo con la concentración de ese mismo aminoácido en la referencia, teniendo en cuenta la digestibilidad verdadera.

3.3.3 Métodos enzimáticos de la evaluación de la calidad de la proteína:

Son métodos *in vitro* donde se mide la digestibilidad de las proteínas, consisten en digerir a las proteínas de ensayo con enzimas como tripsina pancreática, quimiotripsina y peptidasa intestinal porcina, bajo condiciones normalizadas, comúnmente es usado para detectar los cambios de la calidad nutritiva de la proteína producidos por el procesamiento de los insumos (Fennema, O. 2000).

3.4 Descripción de las características de la dieta ideal de *O. maya*

Una vez conocidos los requerimientos nutrimentales, así como los principales puntos de cuidado en el diseño de la dieta de *O. maya* procedemos a dar una descripción de las características ideales de su dieta.

Si bien a lo largo de los años se han encontrado las características ideales, también se logra identificar el principal problema con las dietas elaboradas, éste es el excesivo costo, ya que la mayoría de ellas se basan en alimento vivo, o bien insumos sumamente caros como la jaiba azul (*C. sapidus*). Para solucionar este problema, se propone continuar la búsqueda de los principales nutrimentos que favorecen el crecimiento del organismo, de manera que se puedan utilizar insumos más económicos.

Dentro de las características ideales se requiere que sea una pasta semihúmeda para cubrir las características de palatabilidad (Domingues P.*et.al.*, 2007), no se sugiere el uso de proteínas de origen vegetal, ya que puede generar un decremento en el peso (Aguila, et al., 2007).

Al ser una pasta requiere de un agente aglomerante adecuado, como la grenetina ya que promueve el crecimiento del organismo sin limitar la absorción de nutrientes (Rosas, et al., 2008), mientras que el empleo de aglomerantes de origen no proteínico genera una disminución de la absorción de los nutrientes de la dieta, debido a que *O. maya* al ser una especie carnívora es incapaz de metabolizar los aglomerantes de origen no proteínico (Rosas, et al., 2012).

Sin embargo no todas las fuentes proteínicas de origen animal cumplen con los requerimientos nutrimentales para *O. maya*. Se han reportado bajos crecimientos con surimi de pescado y alimento balanceado para camarón (Rodriguez y Carmona, 2008).

Considerando que *O. maya* es una especie carnívora, la mayor porción de la dieta debe estar constituida de proteína. Debido a lo anterior es de suma importancia la calidad de las proteínas presentes en la dietas, pues un alto contenido proteínico, no implica necesariamente una calidad adecuada. Una manera adecuada de definir la calidad de una dieta puede ser el balance adecuado de los aminoácidos, dicho balance se pueden determinar mediante el uso de parámetros químicos como el Índice de Oser.

Para poder conocer el balance de los aminoácidos, se debe realizar un perfil de aminoácidos, dicha determinación es de gran utilidad ya que además permite evaluar la calidad de las proteínas de la dieta, puede ser usado como una guía, ya que los organismo de estudio adoptan el perfil de aminoácidos de la dieta que está consumiendo (Domingues P. *et.al.*, 2007).

De manera que, con la realización de un perfil de aminoácidos en un individuo sano se puede encontrar los principales aminoácidos a suministrar en la dieta para obtener un óptimo crecimiento. Por otro lado, resulta de gran utilidad el medir la digestibilidad de las proteínas, ya que hay reportes que indican que los cambios conformacionales en las proteínas producidos por la desnaturalización, pueden disminuir la digestibilidad de los insumos para el caso de *O. maya* (Rosas, et al., 2012).

Estos cambios conformacionales en las proteínas se deben al procesamiento térmico de los insumos, los tratamientos térmicos ligeros 60 a 80°C suelen ser benéficos para el aprovechamiento de la proteína, principalmente las de origen vegetal, ya que se inactivan enzimas, se destruyen inhibidores de proteasas, se promueve la desnaturalización de la proteína (Badui, 1993), con lo cual aumenta el aprovechamiento de la proteína, ya que ésta es más accesible al ataque de las enzimas digestivas (Fennema O, 2000).

Con tratamientos térmicos de 80 a 100°C, se inactivan enzimas termorresistentes y se propicia la reacción de Maillard, esta reacción suele ser buscada en los alimentos, ya que es responsable de una gran cantidad de sabores y aromas, sin embargo también presentan efectos negativos, ya que se producen pérdidas de los AAE (Fennema O. 2000), además de reducir la digestibilidad de la proteína y por ende pérdida del valor nutrimental.

Los tratamientos térmicos de 100 a 150°C favorecen la caramelización de los hidratos de carbono y la síntesis de enlaces isopeptídicos (Badui, 1993), la formación de dichos enlaces se da por lo general en el tratamiento drástico en las industrias que procesan alimentos, aunque se ha demostrado que pueden formarse en cantidades menores con los tratamientos usuales del procesamiento de los alimentos; un ejemplo de este tipo de insumos son los hidrolizados de proteína vegetal (Fennema O. 2000). Es importante el considerar que los alimentos con un alto contenido de proteína y bajo contenido de hidratos de carbono son susceptibles a este tipo de reacción, ya que éstas deben ser las características de la dieta.

Es importante mencionar que naturalmente existen proteínas que tienen enlaces cruzados como son las proteínas globulares, fibrosas como queratina, elastina, colágeno, etc.; una de las funciones de estas proteínas con enlaces entre cruzados es la de frenar la proteólisis metabólica (Fennema O. 2000).

Con lo cual se puede inferir que si los insumos tienen una gran cantidad de proteínas con enlaces entrecruzados, aunado a tratamientos térmicos fuertes, puede generar una cantidad considerable de estos enlaces y por lo tanto disminuir considerablemente la digestibilidad y valor nutrimental de la dieta, esto se debe principalmente a la incapacidad de las enzimas digestivas de escindir el enlace peptídico de los enlaces cruzados, además de las dificultades estéricas que generan los enlaces entrecruzados evitando que los enlaces peptídicos aledaños puedan ser hidrolizados (Fennema O. 2000).

Finalmente los tratamientos térmicos con temperaturas $>150^{\circ}\text{C}$ inducen la ciclación, racemización de aminoácidos (transformación L-aminoácidos en el isómero D) (Badui, 1993). Ésta última reacción tiene un gran impacto, ya que la mayoría de los organismos no utilizan los D-aminoácidos para la síntesis de proteínas, si no que se aprovechan únicamente como fuente de energía, e incluso se ha considerado que con los isómeros D llegan a sintetizar compuestos tóxicos que reducen aún más la calidad del alimento (Badui, 1993).

Éstos hechos explican porque las proteínas de origen vegetal y aun las proteínas de origen animal que han sido concentradas mediante la evaporación del agua con la aplicación de una fuente de calor, no han dado buenos resultados en el crecimiento de *O. maya*, de manera que se sugiere la liofilización como proceso alternativo para secar o concentrar proteínas, ya que éste proceso no afecta las características nutrimentales de los insumos (Rosas, et al., 2012).

Los estudios indican que *O. maya* tiene un alto requerimiento de proteínas, también esto se puede observar en el tipo de presas con las que se han obtenido los mayores crecimientos (cangrejos, camarones) (Martínez Y. , 2010). Basados en estos resultados se ha encontrado que los requerimientos nutrimentales de *O. maya* son aproximadamente: 80-86% de Proteína, 5.1-5.6% de Lípidos y 10% de Hidratos de carbono (Rosas, et al., 2012).

Si bien en dietas anteriores se había incluido el manto de calamar en bajas concentraciones (< 20%) (Aguila, et al., 2007) (Rosas C. et al., 2010), existen reportes donde se utiliza en gran abundancia dicha proteína (50%), la combinación de dicha fuente proteínica y jaibas ha dado buenos resultados (Martinez, R. et al, 2012), sin embargo, se ha reportado que la proteína de calamar tiene una menor digestibilidad comparada con la proteína del cangrejo (dieta natural de *Octopus maya*) (Martinez, R. et al, 2012).

De acuerdo a los reportes bibliográficos, el calamar contiene colágeno, en cantidades considerables, ya que lo utiliza como sostén muscular, dado que carecen de esqueleto; esta molécula (Colágeno) disminuye la digestibilidad de la proteína; por esta razón se propone un método enzimático para la hidrólisis del colágeno, de manera que permita demostrar si es que éste componente del insumo es el responsable de la baja digestibilidad y observar si éste proceso puede mejorar las tasas de crecimiento del organismo en estudio.

Existen reportes de que una mezcla de manto de calamar con camarón da buenos resultados para el crecimiento de *Octopus vulgaris* (Rosas, et al., 2012), de manera que se probará la implementación de dicha mezcla con un proceso enzimático para mejorar tanto la digestibilidad del manto de calamar, así como las tasas de crecimiento.

3.5 Evaluación de la dieta

La manera más efectiva de evaluar el desempeño de la dieta propuesta es realizar un ensayo biológico, de tal manera que se pueda evaluar su aprovechamiento, algunos métodos se basan en la ganancia del peso como es el la tasa específica de crecimiento, otros como la tasa de conversión alimenticia relacionan la cantidad de alimento ingerido con la cantidad de peso ganado.

La Tasa específica de crecimiento (TEC) se define como la ganancia en peso corporal del individuo expresado como porcentaje, por día; se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$TEC = \left(\frac{\ln Pf - \ln Pi}{t} \right) \times 100$$

Ecuación 3:

TEC= Tasa Específica de Crecimiento Pf = peso final del organismo;
 Pi = peso inicial del organismo; t = tiempo en días

La tasa de Conversión alimenticia (TCA) se define como la relación entre la cantidad de alimento consumido y la cantidad de peso ganado del organismo; se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$TCA = \left(\frac{Ai - Af}{Pf - Pi} \right)$$

Ecuación 4:

TCA =Tasa de Conversión Alimenticia
 Ai = Peso del Alimento suministrado; Af = Peso del Alimento final;
 Pf = Peso final del organismo; Pi = Peso inicial del organismo.

Otro posible parámetro de comparación es la realización de un perfil de aminoácidos, ya que nos dará una idea de que tan cercana es la composición de los aminoácidos en los diferentes grupos experimentales tratados con las diferentes dietas propuestas. Además, proporciona información acerca de los cambios de aminoácidos que tiene *O. maya* a lo largo de su vida, es decir, observar los diferentes requerimientos de los aminoácidos de esta especie conforme a sus diferentes estadios.

Con el uso de estos parámetros, podemos realizar comparaciones entre las distintas dietas ofrecidas a *O. maya*, y determinar que dieta tuvo un mejor desempeño, además proporcionará una valiosa información para la mejora continua en la elaboración de dietas para el pulpo rojo de Yucatán.

4. Justificación

Octopus maya es una especie muy importante para la costa de Yucatán, ya que representa una gran oportunidad económica de crecimiento para dicha región, ésta especie tiene un gran potencial para ser cultivada en condiciones controladas.

El cultivo de dicha especie tiene muchos aspectos benéficos, significa un paso hacia el consumo responsable de uno de sus principales recursos, manteniendo en equilibrio su ecosistema y haciendo posible una participación activa y constante en el mercado internacional, así como lograr mantener uno de los principales ingresos para las comunidades costeras de Yucatán.

A su vez, la investigación de *O. maya* puede permitir su aprovechamiento integral, sin embargo, para que todas estas metas sean alcanzadas, se debe trabajar arduamente en lograr la industrialización de la producción en acuicultura de *Octopus maya*, aunque el principal problema para lograrlo es el excesivo costo de la alimentación.

Actualmente se han desarrollado diversas dietas que no han dado buenos resultados en el crecimiento de *O. maya*; sin embargo, de dichos estudios se puede obtener información muy valiosa con la que se puede sentar las bases del desarrollo de una dieta adecuada para esta especie; de manera que el presente documento pretende recopilar la mayor cantidad de información disponible del tema, estableciendo una guía en el desarrollo de las dietas de *Octopus maya* y con base en ella generar una propuesta para lograr la industrialización de la especie en cuestión.

5. Objetivo general

Realizar una propuesta de una dieta, fundamentada en el conocimiento obtenido a lo largo de los años en que se ha estudiado la producción de pulpo rojo de Yucatán (*Octopus maya*), la cual sea equilibrada, y eficiente, permitiendo reducir los costos de producción, de manera que se pueda ir alcanzando la industrialización del cultivo de dicha especie.

5.1 Objetivos particulares

- ✓ Selección de los insumos de mayor calidad para la elaboración de una dieta optima para el crecimiento de *Octopus maya* en la fase juvenil, principalmente de la eclosión a 60 días.

- ✓ Realizar los análisis de los insumos correspondientes, primordialmente del colágeno en el manto de calamar

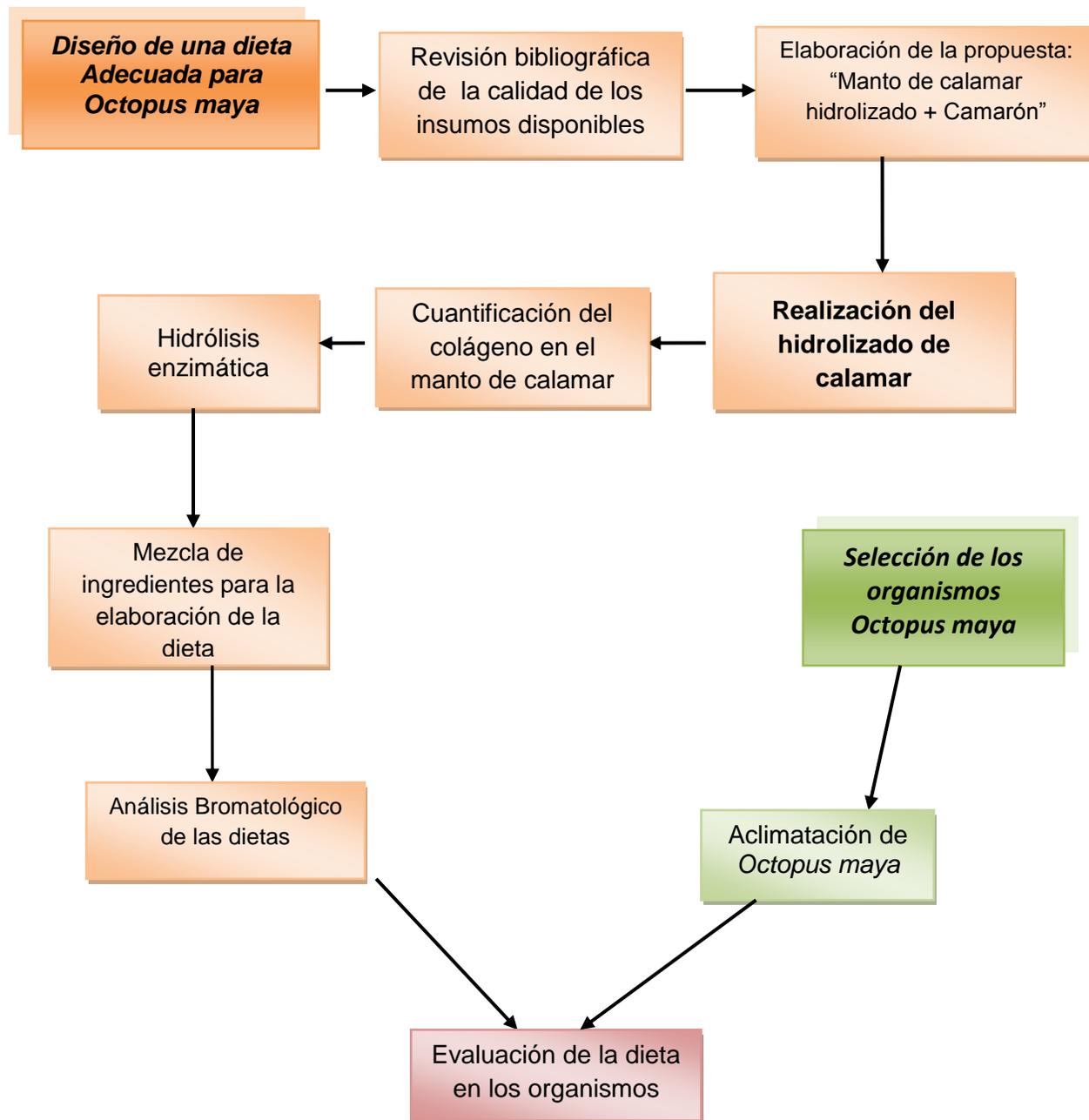
- ✓ Utilizar un método para la eliminación del colágeno presente en el manto de calamar para su uso en acuicultura.

- ✓ Realizar el análisis bromatológico de las dietas experimentales

- ✓ Realizar una evaluación de las dietas experimentales propuestas mediante un ensayo biológico.

6. Metodología

Diagrama general de la Investigación



6.1 Diseño de una dieta adecuada para *Octopus maya*

6.1.1. Revisión bibliográfica de la calidad de los insumos disponibles:

De acuerdo a la información obtenida acerca del diseño de dietas para *O. maya*, se seleccionaron del total de insumos disponibles los que podrían ofrecer mejores resultados, eliminando los que se ha demostrado que tienen una repercusión en el desarrollo de *O. maya*.

Posteriormente se realizó una búsqueda de los perfiles de aminoácidos de los insumos seleccionados, así como el contenido de proteína por cada insumo, de manera que se siguieron seleccionando las mejores opciones para la elaboración de la propuesta de dieta.

6.1.2 Elaboración de la dieta propuesta:

Una vez seleccionados los insumos ideales (Manto de calamar hidrolizado enzimáticamente y camarón), se procede a realizar la elaboración de las dietas; se debe remover mecánicamente la mayor cantidad posible de colágeno al manto de calamar congelado (Figura 1), posteriormente se debe moler la muestra aún congelada con un extrusor, una vez molido se debe guardar una porción de la muestra en congelación para su posterior liofilización y cuantificación del colágeno, el resto de la muestra deberá mantenerse de igual forma en congelación (-70°C) hasta determinar la cantidad adecuada de enzima para realizar el proceso de hidrólisis enzimática.

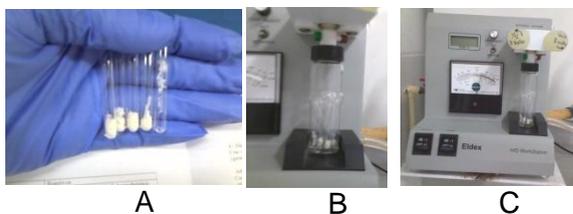


Figura 1. Remoción mecánica del colágeno.

6.2 Realización del hidrolizado de manto de calamar

6.2.1 Cuantificación del colágeno en manto de calamar, por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR, HPLC por sus siglas en inglés)

Se debe trabajar con la muestra liofilizada, se pesan por el método de cuarteo 10 mg de muestra (por duplicado) en tubos Durham (Figura 2A.), se colocan en el reactor de hidrólisis, se añaden 200 μ L de HCl (6N, 0.006 % fenol) por muestra, y se montan en una estación de hidrólisis para proteína Pico Tag (Waters, Inc) (Figura 2B), donde se desplaza el oxígeno presente en el reactor remplazándolo con nitrógeno (Figura 2C.), posteriormente se cierra el reactor y se calienta a 108°C/18 h.



*Figuras 2A. Muestras en tubos Durham.
2B. Tubos Durham en el reactor de hidrólisis.
2C. Estación de trabajo Pico Tag.*

Las muestras hidrolizadas se secan mediante corriente de nitrógeno, y se rehidratan en 1 mL de agua grado HPLC, para enseguida filtrar la muestra a través de un acrodisco con membrana GHP (0.45 mm, 13 mm de diámetro, en una jeringa con embolo TFE).

Derivatización de las muestras para el perfil de aminoácidos

Para realizar el perfil de aminoácidos, se sugiere utilizar el sistema Waters AccQ•Tag™ (Waters, Inc), que tiene como ventajas una rápida preparación de la muestra, así como la estabilidad de la muestra ya derivatizada (1 semana).

Preparación de las muestras controles.

Línea base del sistema: se miden 100 μ L de la solución blanco de la hidrólisis ácida, mas 900 μ L de agua grado HPLC y se transfirieren a un vial de 2 mL.

Estándar Interno: se miden 40 μ L del estándar interno (Acido 2-aminobutírico, AABA, 2.5mM) y se transfirieren a un vial para auto muestreador, añadiendo 960 μ L de agua grado HPLC.

Punto medio de la curva estándar: Se toman 40 µL de la solución estándar de hidrolizado de aminoácidos (2.5 mM de 18 aminoácidos, y 1.25 de cisteína), se transfirieren a un vial de 2 mL, con 40 µL del estándar interno (Acido 2-aminobutírico, AABA, 2.5mM,) y 820 µL de agua grado HPLC.

Preparación de las muestras para analizar.

Se transfieren 70 µL del buffer de boratos (2C, AQC Flour Reagent Kit) a un vial de 2 mL para automuestreador. Luego, se añaden 10 µL de la muestra o control a derivatizar; y 20 µL de derivatizante AQC (2-amino-quinolin-carbamato de metilo). La mezcla se agita 10 segundos en vórtex, el vial se colocó en un calentador de bloques a 55°C por 10 minutos, tiempo en el cual se transfiere el contenido del vial a un inserto de 200 µL y regresándolo al mismo vial.

Obtención del perfil de aminoácidos mediante CLAR

Las muestras derivatizadas se eluyen a través de una columna de fase reversa (3.9 X 150 mm) 4µm Nova Pak™ C-18, utilizando el gradiente recomendado por Waters en el sistema Accq-Tag (Milford, MA, USA), en el sistema cromatográfico con una bomba binaria 1525, un detector de fluorescencia 2475 multi, degasificador en línea y un inyector automático Jasco AS 1559. La longitud de onda de excitación es de 250 nm y la de emisión 395 nm. Los análisis se llevan a cabo a temperatura constante de 37 °C. Las señales de calibración y las curvas estándares se obtendrán mediante el uso de soluciones estándares con un rango de trabajo de 18.7 a 150 pmol de cada aminoácido.

6.2.2 Hidrólisis enzimática

Se probaron diferentes tratamientos de la muestra (manto de calamar fresco y liofilizado), con diferentes condiciones de reacción (4 y 37°C). Se pesaron 5 y 1.35g de manto de calamar fresco y Liofilizado, de manera que contienen la misma cantidad de materia seca, se adicionaron 30 mL de agua destilada para ambas muestras, posteriormente se ajustaron las condiciones de trabajo de propuestas, pH (7), $[Ca^{2+}] = 5 \text{ mM}$, T (°C) = 37 y 4°C, se dosificó la enzima en una relación de 5g de Manto de calamar humedo: 375 µm Colagenasa, se incubó la reacción durante 5 hrs a 37°C y 24 hrs a 4°C, posteriormente la muestra fue analizada mediante la técnica SDS-PAGE con el protocolo de Laemmli protocol (1970), para observar la hidrólisis enzimática.

6.3 Mezcla de ingredientes para la elaboración de la dieta

Posteriormente a la reacción enzimática, el hidrolizado enzimático debe concentrarse para posteriormente mezclarse con los demás ingredientes y elaborar la pasta semihúmeda que conforma la dieta experimental, una vez elaborada debe de confirmarse el adecuado balance de las biomoléculas, por lo cual se debe realizar un análisis bromatológico, de manera que se pueda confirmar dicho balance.

6.4 Análisis bromatológico de las dietas

Para la realización de éste análisis se deben seguir las metodologías de la AOAC:

Humedad (AOAC 934.01), Cenizas (AOAC N° 942.05), Grasas (4.5.01 AOAC N° 920.39), Proteína (AOAC 990.03), los Hidratos de carbono fueron calculados por diferencia.

6.5 Selección de los organismos de la especie *Octopus maya*:

Se deben seleccionar 120 pulpos recién eclosionados de un desove sincronizado de varios pulpos cultivados en cautiverio del Laboratorio Experimental de Producción de Pulpo de la UMDI, las crías deberán ser individualizadas en contenedores plásticos de 300 mL adaptados con una malla para permitir un flujo constante de agua (Figura 3A. y 3B.).

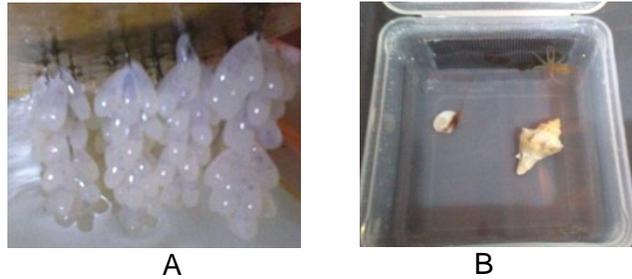


Figura 3A. Huevecillos de *O. maya*;
3B. Individualización de las crías de *O. maya*.

A manera de refugio se puede proporcionar un caracol (*Megalongena corona bispinosa*) (Figura 4).



Figura 4. Caracol *Megalongena corona bispinosa* usado a manera de refugio.

6.5.1 Aclimatación de *Octopus maya*:

Sistema de experimentación:

Se requieren tarjas adaptadas a un sistema de recirculación de agua de mar, la cual es tratada mediante un filtro biológico (Figura 5), el agua se mantiene a temperatura de 23°C, con un flujo constante y una aireación realizada con una bomba de aire (8.76 mg O₂/L), el % sal disuelta en el agua debe mantenerse de 37 a 38 %, y el pH=8.2



Figura 5. Tarjas adaptadas al sistema de recirculación de agua de mar.

En cada tarja se colocan de 8 a 10 contenedores plásticos que resguardan a un respectivo pulpo individualizado (Figura 6). Se debe dejar que los pulpos se adapten al sistema de alimentación entre 7 a 15 días, previos al experimento.



Figura 6. Contenedores plásticos distribuidos en la tarja adaptada al sistema de recirculación de agua de mar.

Alimentación:

Los pulpos se deben alimentar 2 veces al día a las 10:00 y a las 20:30 h, la comida se les proporciona en conchas de mar. (Figura 7), asemejando a un molusco bivalvo como presa.



Figura 7. Conchas de mar con la comida para las crías de O. maya

La comida debe suministrarse en un 30% del peso corporal húmedo del individuo (Quintana, D. *et al.* 2010). Un número representativo de pulpos deben ser elegidos al azar y ser pesados semanalmente para ajustar la porción de alimento a utilizar (Domingues P. *et. al*, 2012).

Se debe dispensar 15% del peso corporal en la primera ingesta y 15% del peso corporal en la segunda ingesta del día (Valero, 2009).

6.6 Evaluación de la dieta en los organismos

Diseño experimental:

Se probará el efecto de 3 diferentes dietas en el crecimiento de las crías recién eclosionadas de *O. maya*.

A continuación se presenta el diseño de las dietas experimentales (Tabla 1):

Tabla 1. Composición de las dietas experimentales; la dieta 1 se tomara como control, las dietas 2 y 3 son las propuestas experimentales.

Dietas Insumos	1 Control	2	3
Manto de calamar (g)	67.5	---	---
Camarón (g)	27.5	---	27.5
Manto de calamar hidrolizado (g)	---	95	67.5
Grenetina (g)	5	5	5
Total (g)	100	100	100

Para evaluar dichas dietas se utilizaran 120 crías de *O. maya* recién eclosionadas, formando 3 grupos, a su vez subdivididos en las tres dietas, como se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2. Grupos experimentales de *O. maya*

		Dietas		
		1 Control	2	3
N° de individuos	Grupo 1	60	0	0
	Grupo 2	10	10	10
	Grupo 3	10	10	10

El primer grupo será tomado como referencia, de manera que se sacrificaran a los 60 individuos para realizar un perfil de aminoácidos como punto inicial o punto de partida ($t_1=0$ días). Con el grupo 2 se realizará el perfil de aminoácidos a los 30 días después de la alimentación con las diferentes dietas ($t_2 = 30$ días), de igual forma con el grupo 3 se realizara otro perfil de aminoácidos a los 60 días ($t_3=60$ días).

La evaluación de las dietas será realizada mediante la medición de la ganancia de peso en los individuos por día (Tasa Específica de Crecimiento), el cálculo de la tasa de conversión alimenticia y la realización de perfiles de aminoácidos de los organismos.

7. Resultados y discusión de resultados

Calidad de los insumos disponibles:

A continuación se presenta una lista de los insumos disponibles en la UMDI, así como una marca de si se considera o no apto al insumo para su uso en la elaboración de la dieta experimental.

Tabla 3. Insumos disponibles en la UMDI para la elaboración de una dieta experimental de *O. maya*.

N°	INSUMO		N°	INSUMO	
1	Aceite de hígado de bacalao	X	16	Grenetina	√
2	Aceite de pescado Emulsión de Scott	X	17	Harina camarón	√
3	Almidón de maíz	X	18	Harina de mejillon	√
4	Almidón de trigo	X	19	Harina de calamar	√
5	Calamar fresco	√	20	Harina de pescado	√
6	Camarón fresco	√	21	Harina de sardina	√
7	Camarón seco	√	22	Harina de trigo	X
8	Carboximetil celulosa	X	23	Lecitina de soya	X
9	Colesterol	X	24	Pasta de canola	X
10	Concentrado proteico soluble de pescado	√	25	Pasta de soya	X
11	Concentrado proteico de papa	X	26	Pescado fresco	√
12	Concentrado proteico Soya	X	27	Suero de leche	X
13	Ensilado de pescado	X	28	Talco o relleno	X
14	Espirulina	X	29	Tentáculos de calamar liofilizados	√
15	Gluten de trigo	X	30	Colágeno	X

X = se considera inadecuado o se han reportado malos resultados con dicho insumo; √ = Se considera apto para la elaboración de la dieta de *O. maya*

Para la adecuada selección de los insumos se tomo en cuenta los requerimientos nutricionales de *O. maya*, es decir, que contenga un alto contenido proteínico, que sea de origen animal, se excluyo a los insumos con mayor contenido de aceites e hidratos de carbono debido a su baja utilización en el metabolismo de *O. maya*.

También se excluyeron los insumos con alto contenido proteínico de origen vegetal, ya que se ha demostrado que tienen un efecto contraproducente en el crecimiento de la especie en cuestión.

Posteriormente se buscaron los perfiles de aminoácidos de los insumos seleccionados, así como una propuesta que fue utilizar una mezcla de residuos de los mataderos (MRM), que se compone de harina de sangre 3,5% más despojos 15,8% (cabeza, patas y las vísceras) y el 13,9% plumas mojadas con 60-65% de agua.

A continuación se presentan los perfiles de aminoácidos de los insumos seleccionados anteriormente, de manera que se pueda elegir los insumos que tienen una calidad proteínica adecuada (Tabla 4.)

Tabla 4. Contenido de aminoácidos (g / 100 g proteína) de los diferentes insumos disponibles para la elaboración de la dieta para las crías de *O. maya*, así como el perfil de aminoácidos de Huevos de hembras alimentadas con jaibas (patrón a usar).

	Huevos de hembras alimentadas con jaibas	Grenetina de puerco	Grenetina de Res	Harina de pescado (67.8% Proteína)	Harina de sardina (67.4% Proteína)	Mejillón (<i>Mytilus spp</i>) (59.49% Proteína)	MRM (70% Proteína)	Calamar gigante (<i>Dosidiscus gigas</i>) (90.07% Proteína)	Jaiba (<i>Callinectes sapidus</i>) (82.29% Proteína)	Camarón (<i>L. vannamei</i>) (83.72% Proteína)	
AAE	His	1.18	0.9	0.6	2.1	3.5	1.1	1.0	1.1	1.6	2.3
	Thr	3.74	1.7	1.8	4.3	2.3	6.3	4.1	6.5	8.2	3.0
	Arg	4.2	8.2	8.0	6.0	6.6	3.0	5.6	2.7	3.5	8.0
	Val	3.61	4.4	2.4	4.9	6.8	2.4	5.4	2.1	3.1	3.8
	Met	1.55	1.0	0.9	2.9	2.2	---	3.4	---	---	---
	Lys	5.74	4.3	3.7	8.4	6.5	4.6	4.1	4.7	6.8	6.1
	Ile	2.9	1.3	1.4	4.1	5.7	2.2	7.4	2.1	2.8	3.7
	Leu	7.19	2.9	3.0	7.9	8.0	4.5	4.6	4.6	5.6	5.7
Phe	2.75	2.1	2.0	4.1	4.9	2.5	1.0	2.3	3.3	3.7	

*MRM.- Mezcla de Residuos de los Mataderos, se compone de harina de sangre 3,5% más despojos 15,8% (cabeza, patas y las vísceras) y el 13,9% plumas mojadas con 60-65% de agua; AAE.- Amino ácidos esenciales

Durante la búsqueda bibliográfica, se trató de verificar a aquellos insumos que han ofrecido buenos resultados para algunas especies de pulpos; como lo son el manto de calamar, jaibas y camarones.

Para comprobar la calidad de la proteína se sugiere el uso de algunos índices químicos como el Índice de Oser (IO) y la Cuenta Química (CQ) de manera que se pueda realizar una comparación de los perfiles de aminoácidos de los insumos seleccionados y determinar si la calidad de la proteína es adecuada para la inclusión en la dieta, y a su vez se logre combinar los insumos realizando una suplementación de los aminoácidos. Para determinar la CQ se usa la ecuación 1 para cada aminoácido, a su vez para determinar el IO se usa la ecuación 2.

Tabla 5.- Contenido relativo de aminoácido de los Insumos (g Amino ácidos Relativos / 100 g Proteína), Cuenta Química (CQ) e Índice de Oser (IO) de los Insumos.

		Camarón (83.72% Proteína)	Jaiba (82.29% Proteína)	Calamar (90.07% Proteína)	Mejillón (59.49% Proteína)	Harina de Sardina (67.4% Proteína)	MRM (70% Proteína)	Harina de Pescado (67.8% Proteína)
%AAER	His	198.3	134.7	105.9	92.4	296.6	86.0	173.7
	Thr	80.2	219.8	192.2	168.2	61.5	110.8	115.0
	Arg	191.4	83.3	71.9	72.1	157.1	132.7	142.9
	Val	105.0	85.6	64.0	65.7	188.4	150.4	80.9
	Lys	105.4	111.1	91.3	79.4	113.2	59.7	146.7
	Ile	126.9	96.6	81.4	75.2	196.6	142.9	142.1
	Leu	79.4	78.2	71.1	62.6	111.3	103.3	109.2
	Phe	132.7	121.1	91.3	92.4	178.2	166.2	149.1
CQ		79.4	78.2	64	62.6	61.5	59.7	80.9
IO		94.5	92.6	82.8	79.0	94.1	92.0	97.4
AAL		Leu	Leu	Val	Leu	Thr	Lys	Val

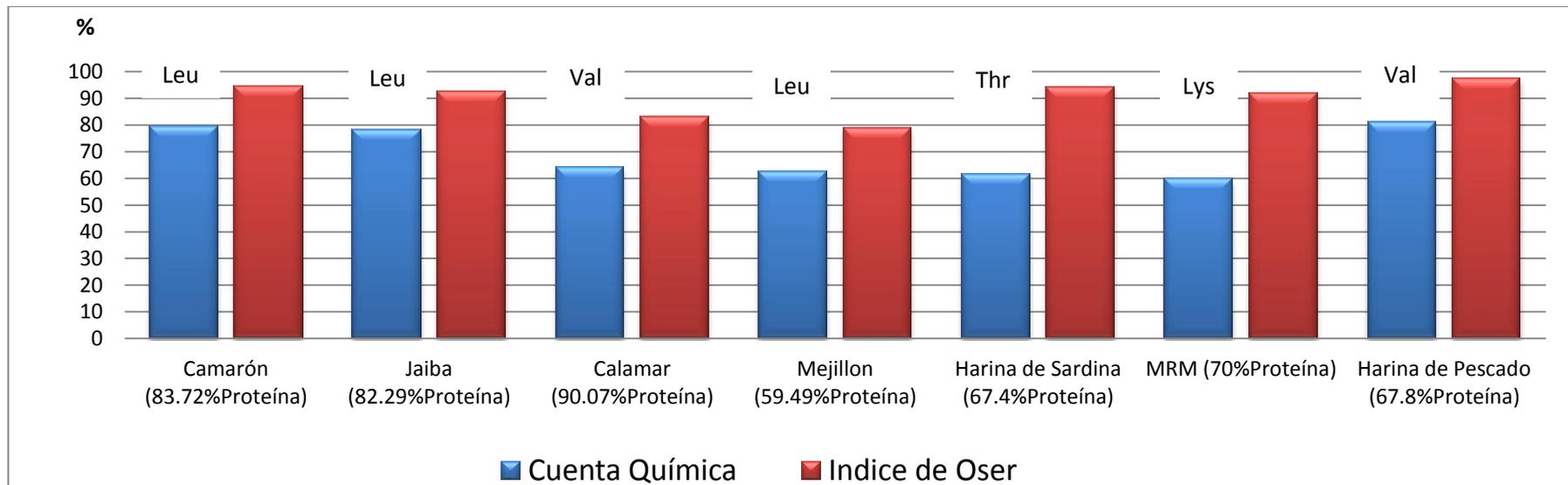
**Se toma como patrón el perfil de aminoácidos de los huevos de hembras alimentadas con jaibas presentado en la tabla 4.*

%AAER= g Amino Ácidos Esenciales Relativos / 100 g Proteína;

AAL= Aminoácido Limitante

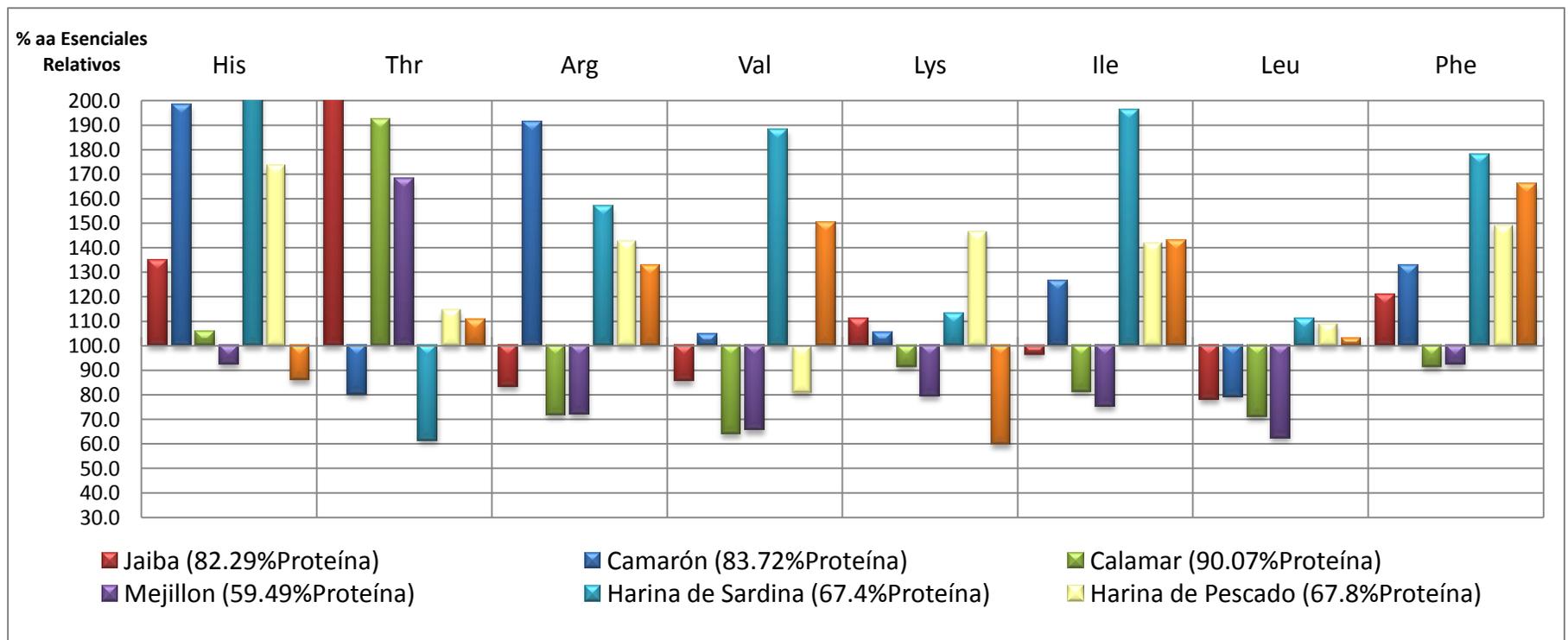
En la *Figura 8*, se puede observar que los dos índices propuestos para la selección de insumos son de gran ayuda, ya que la CQ nos ayuda a saber cuál es el aminoácido más deficiente de nuestros insumos, de manera que se pueden utilizar la información de los perfiles de aminoácidos para realizar mejores combinaciones de los insumos, logrando así una suplementación de los aminoácidos deficientes, sin embargo es muy rígido el otorgar una calificación de calidad al insumo conforme a la mayor deficiencia de aminoácidos, ya que en algunos casos como las harinas de sardina y de pescado presentan una muy baja CQ (61.5 y 80.9 respectivamente), aunque tienen una calificación alta en el Índice de Oser (94.1 y 97.4 respectivamente), lo cual nos dice que estos insumos podrían suplir la mayoría de los requerimientos de AAE, pero tienen un aminoácidos en muy baja cantidad. De tal manera que se puede utilizar la CQ para ver los aminoácidos limitantes y el IO para observar el balance general de los AAE. Es muy importante el considerar un balance adecuado de los aminoácidos ya que de presentarse en cantidades excesivas un aminoácido se puede producir un antagonismo aminoacídico, es decir, que puede disminuir la absorción de otros aminoácidos; esto se debe a la competencia por los sitios de absorción (Fennema, O. 2000).

Figura 8. Calidad de las proteínas de los insumos



Con la información obtenida de los perfiles de aminoácidos, se calculó el contenido Relativo de Aminoácidos de los insumos (Tabla 5.), posteriormente se realizó una representación gráfica de dicho contenido relativo de los Aminoácidos Esenciales, ésta gráfica (Figura 9.), se interpreta de la siguiente manera: se toma como eje el 100% debido a que esa es la cantidad máxima que necesita el organismo para poder crecer, si el insumo evaluado contiene una mayor cantidad de dicho aminoácido comparado con el patrón se considera que cumple con los requerimientos de dicho aminoácido.

Figura 9. Requerimientos nutrimentales de *O. maya*



Con este tipo de representación (*Figura 9*), se puede guiar la elaboración de la dieta puesto que se puede elegir insumos que combinados realicen una buena suplementación, como es el caso de la combinación camarón y calamar, ya que en la mayoría de sus deficiencias de AAE son complementarios, también se observa que la combinación de ambos insumos pueden llegar a realizar un perfil aminoacídico semejante al de la jaiba (*Callinectes sapidus*) alimento natural de *O. maya*, además tomando en cuenta que ambos insumos tienen un alto contenido de proteína son buenos prospectos para la elaboración de una dieta.

Como se puede observar en la *Figura 9*, las harinas de sardina y de pescado tienen una buena calidad en su proteína, sin embargo existen reportes de que el tomar como insumo único a la harina de pescado tiene como resultado una pérdida de peso en los sujetos de experimentación (Valero, 2009).

Por lo cual, se puede inferir que un solo insumo que no tenga un alto contenido de proteína, con una buena calidad, no será capaz de cubrir los requerimientos nutrimentales, ya que por ejemplo las jaibas son el alimento natural de *O. maya* y la realización de una pasta semihumeda utilizando sólo éste insumo tiene buenos resultados, probablemente esto se debe a que tiene las proporciones ideales de las principales biomoléculas (proteína, hidratos de carbono y lípidos), además de presentar una buena calidad y cantidad proteínica.

A pesar de que el uso de éstos índices proporcionan una buena guía para la elaboración de las dietas, sus resultados en ocasiones tienen baja correlación con los métodos biológicos ya que presentan algunos inconvenientes, la Cuenta Química supone que todas las proteínas se digieren por completo y que todos los AAE son completamente absorbidos, lo cual comúnmente es falso, por lo cual se ha sugerido realizar una Cuenta Química Corregida por digestibilidad (método enzimático), de esta manera se logra mejorar la correlación con los métodos biológicos (Fennema, O. 2000).

Si bien se puede usar los métodos químicos como el Índice de Oser y la Cuenta Química corregida por digestibilidad en el diseño de las dietas para *O. maya* se debe considerar que entran en juego muchos otros factores como lo son: las proporciones de las principales biomoléculas (hidratos de carbono, lípidos y proteínas), cantidad de los nutrimentos, el tratamiento de los insumos para la elaboración de la dieta, la aceptación (textura, flotabilidad, etc.), entre otros.

Para que la dieta experimental tenga el éxito deseado no solo basta con asegurar la calidad de la proteína, sino también se debe asegurar de que la dieta tenga la suficiente cantidad, ya que para *O. maya*, a diferencia de muchos organismos la proteína representa la principal fuente de energía metabólica, mantenimiento de sus funciones vitales, así como el crecimiento (Cerezo J., *et al.*, 2012).

La dieta debe cubrir las necesidades energéticas y funciones vitales sin dejar de lado la síntesis proteínica, es decir, sin dejar de lado el crecimiento (Castelló F. 1993). Considerando este aspecto se puede observar en la *Figura 9* que el contenido proteínico de los insumos varía entre cada uno de ellos, siendo el calamar, el insumo con un mayor contenido, sin embargo no es suficiente el contener una cantidad adecuada de proteína, ya que se requiere de un adecuado balance de las principales biomoléculas (proteína, lípidos y hidratos de carbono).

A lo largo de todas las investigaciones se han encontrado que las proporciones ideales de las biomoléculas, oscilan en: 80 a 86% de proteína, 5 a 6% lípidos y 10% hidratos de carbono. (Rosas, *et al.*, 2012)

Estas proporciones deben ser consideradas ya que de ser diferentes, la dieta puede presentar problemas de absorción de los nutrientes, por ejemplo; se ha reportado que un exceso en las grasas reduce la absorción de las proteínas (Valero, 2009), también existen reportes donde se demostró que los polímeros de hidratos de carbono como el alginato impiden la absorción de los nutrientes (Rosas, *et al.*, 2008), o bien simplemente al no tener la cantidad, ni la calidad de la proteína y no tener el balance adecuado de las biomoléculas, como lo es el caso de los mejillones, producen una disminución en el peso de los organismos de estudio (Valero, 2009).

La cantidad de los nutrimentos puede ser ajustada mediante el consumo de la dieta, el cual se ha reportado en un 30% de su peso corporal como la cantidad ideal (Quintana D. *et al.* 2010).

Además de dar la cantidad adecuada de la dieta, se debe satisfacer la aceptación entre los organismos de estudio, ya que de lo contrario, no importará la cantidad y calidad de la dieta, si ésta no es ingerida, fracasará.

La aceptación de la dieta está determinada por diversos parámetros como la textura, flotabilidad, entre otros. Actualmente se ha logrado la producción de una pasta semihúmeda, la cual tiene la textura ideal ya que resulta ser bastante aceptada por *O. maya*, sin embargo hay reportes de que el tratamiento de los insumos puede conllevar a un bajo o alto consumo de dicha dieta. Se ha demostrado que los insumos hidrolizados pueden resultar como atrayentes de las dietas (Valero, 2009).

En el aspecto de la flotabilidad, la pasta semihúmeda es colocada sobre una concha vacía y posteriormente se refrigera, de tal manera que la pasta queda adherida en la concha (*Figura 7.*), logrando que la dieta quede inmóvil, este procedimiento ha conseguido una buena aceptación de la dieta, puesto que la concha se asemeja a los moluscos bivalvos, los cuales suelen ser parte de la dieta natural de diversas especies de pulpos (Portela, 2011).



Figura 7. Conchas de mar con la comida para las crías de O. maya.

Si bien los tratamientos de los insumos pueden afectar la aceptación de la dieta, éstos también pueden tener un impacto en su aprovechamiento, el tratamiento térmico es el más común, el cual puede tener tanto efectos benéficos como perjudiciales, dependiendo de la mezcla y susceptibilidad de los ingredientes y la intensidad del tratamiento térmico (Badui, 1993).

Si se desea introducir en la dieta un insumo con un previo tratamiento, como las harinas, hay que asegurarse de que el tratamiento llevado a cabo sobre el insumo no afecte el valor nutrimental de la dieta, esto es de una gran importancia ya que se ha demostrado que los tratamientos térmicos como la cocción pueden reducir la eficiencia de las dietas para *O. maya* (Rosas, et al., 2012), ya que incluso la cocción de la dieta control produce una pérdida de peso en los individuos alimentados con esta dieta experimental (Rosas, et al., 2012).

Se creía que ésta pérdida de peso se debía a la pérdida de nutrientes lábiles como las vitaminas, considerando estas pérdidas se han suministrado mezclas de vitaminas para restablecer el contenido vitamínico de la dieta, sin embargo se siguió obteniendo el mismo resultado (Rosas, et al., 2012), con lo cual se puede ver el impacto de los tratamientos térmicos en los insumos.

Con la información anteriormente expuesta se puede comprender porque la harinas de pescado, ni las harinas de origen vegetal, usadas en diversas propuestas no han dado buenos resultados (Aguila, et al., 2007; Rosas C. *et. al.* 2010). Por tales motivos en algunas investigaciones se ha sugerido a la liofilización como un método de secado para el tratamiento de los insumos que requieren un tratamiento de secado como las harinas (Rosas, et al., 2012).

Por lo tanto se descartan para la elaboración de la dieta: los insumos que hayan tenido un tratamiento térmico drástico como son las harinas, incluida la mezcla de residuos de los mataderos (MRM), también se descarta a los mejillones por su pobre cantidad y calidad en proteínas, de manera que se considera que los mejores insumos son el manto de calamar y el camarón, los cuales juntos realizan una buena suplementación.

Previos estudios reportan que en una mezcla de 70:30 de manto de calamar:camarón conservan las proporciones ideales de las biomoléculas, sin embargo, es importante el considerar que el calamar es rico en proteínas fibrilares como el colágeno, y dependiendo la parte empleada del organismo será la cantidad de colágeno que contenga. Se ha reportado que los tentáculos presentan mayores cantidades de ésta proteína fibrilar (Torres W. *et.al*, 2008), por lo tanto se sugiere el uso de manto de calamar; de manera que se evite la disminución de la digestibilidad por las proteínas entrecruzadas.

Una forma de ayudar a mejorar la digestibilidad de las proteínas entrecruzadas es aplicando tratamientos a los insumos, éstos pueden tener efectos tanto benéficos como perjudiciales, de manera que para obtener un efecto benéfico se sugiere el realizar un tratamiento de hidrólisis enzimática, ya que los insumos hidrolizados actúan como atrayentes para la dieta, además de presentar beneficios nutrimentales.

De entre estos beneficios nutrimentales se encuentran: aumentar el valor nutrimental de la proteína, ya que se mejora la digestibilidad y la absorción al disminuir el tamaño de los péptidos, se mantiene el perfil de aminoácidos de la proteína de origen, es decir, no presentan pérdidas de aminoácidos (Sumaya, 2001).

Considerando que el insumo manto de calamar contiene proteínas entrecruzadas como el colágeno, se sugiere que en la hidrólisis enzimática se seleccione una enzima capaz de hidrolizar dicha molécula de manera que se mejore el aprovechamiento de la dieta.

Si bien existen varios tratamientos de los insumos para mejorar el valor nutritivo de las dietas, como la inclusión de concentrados o hidrolizados proteínicos, cada uno tiene sus ventajas y desventajas. A continuación se presenta un cuadro comparativo de los 3 métodos (Sumaya, M. 2001):

Tabla 6. Ventajas y desventajas de los tratamientos hidrolizado enzimático, químico y concentrado proteínico.

	Hidrolizado enzimático	Hidrolizado Químico	Concentrado proteínico (Harinas)
Ventajas en la elaboración	No requiere de altas Temperaturas No requiere de solventes	Es sencillo de realizar	No requiere de solventes
Desventajas en la elaboración	Costos altos	Requiere de altas Temperaturas Requiere de solventes y su posterior remoción	Requiere altas Temperaturas
Ventajas nutrimentales	Facilita la absorción (disminución de tamaño de los péptidos hasta pequeños polipéptidos) Elimina factores antinutrimientales de origen proteínico. Conserva el perfil de aminoácidos de la fuente proteínica.	Mejora de absorción (disminución del tamaño de los polipéptidos) Elimina factores antinutrimientales. Elimina contaminación por microorganismos.	Se aumenta la cantidad de las proteínas.
Desventajas nutrimentales	Ninguna	Pérdida de AAE en función de las condiciones del tratamiento: Altas Temperaturas y HCl / 24-27 h= Lisina, Serina, Treonina, Triptófano. Altas Temperaturas y NaOH / 24-27 h= Lisina, Arginina, Treonina, Serina, Cisteína; además de la racemización de aminoácidos y la formación de compuestos nefrotóxicos como Lantionina.	Pérdida de AAE (Lisina, entre otros). Producción de aminas biogénicas (histamina, cadaverina, putrescina, tiramina) Caramelización de los hidratos de carbono Reacciones de Maillard. Entrecruzamientos proteínicos. Disminución de digestibilidad.

Observando las posibles afectaciones, así como los beneficios de los tratamientos anteriormente expuestos se sugiere el uso de la hidrólisis enzimática, a pesar de sus elevados costos, puede que sea una buena opción para mejorar la calidad de los insumos, por sus ventajas nutrimentales.

Con el fin de obtener ventajas nutrimentales y a la vez disminuir los efectos negativos de la baja digestibilidad causada por el contenido de colágeno en el manto de calamar, se sugiere usar una mezcla de enzimas que puedan hidrolizar diferentes tipos de colágeno y a su vez tengan la capacidad de hidrolizar otros enlaces peptídicos. De esta manera se logra eliminar la mayor cantidad de colágeno posible y a su vez hidrolizar la proteína del manto de calamar, obteniéndose así todos los beneficios nutrimentales anteriormente mencionados.

Realización del hidrolizado enzimático:

La enzima que se considera adecuada para realizar dicho tratamiento, es una colagenasa cruda (Collagenase from *Clostridium histolyticum*, C-0130 Sigma-Aldrich), que es capaz de hidrolizar varios tipos de colágeno y a su vez posee actividad proteolítica características de una neutrasa y clostripaina (similar a la tripsina).

A pesar de existir reportes sobre la reacción de hidrólisis enzimática, en la relación enzima/sustrato utilizada, se emplean grandes cantidades de la enzima para poder obtener resultados en un tiempo relativamente corto (45 minutos) (Barcia I, *et. al*, 2008), de manera que se considera favorable el extender el tiempo de hidrólisis, a fin de poder disminuir los costos de dosificación de la enzima, si bien éste parámetro debe ser determinado experimentalmente, un buen punto de partida es la cuantificación del colágeno, ya que es la principal molécula que se desea hidrolizar, aun obteniendo la cantidad exacta del colágeno es muy importante recordar que para que una enzima trabaje a su máxima velocidad debe estar saturada, es decir, debe tener altas concentraciones de su sustrato (García M. *et.al*. 2004).

En cuanto a la temperatura de trabajo se sugiere trabajar a la óptima para las enzimas (37°C), sin embargo el hecho de trabajar a estas temperaturas hace muy alto el riesgo a sufrir contaminaciones microbianas, por lo cual se hace la indicación de trabajar en las condiciones más higiénicas posibles y tener una limpieza exhaustiva en el equipo hidrolizador (fermentador).

La concentración del sustrato debe considerar varios aspectos; las reacciones enzimáticas son llevadas a cabo en medio acuoso, de manera que el sustrato debe estar disuelto para poder ser hidrolizado, sin embargo se debe mantener en mente que la proteína tiene una baja solubilidad, por lo cual se debe hacer una dilución, no se sugiere el uso de agentes desnaturizantes para solubilizar la proteína, ya que no se sabe si puedan tener efectos adversos en los organismos de estudio.

En estudios previos han utilizado diluciones 1:6 del manto de calamar fresco en agua, obteniéndose buenos resultados, sin embargo éste parámetro es de suma importancia, ya que posteriormente a la reacción enzimática, se requiere de concentrar el sustrato, de manera que se sugiere realizar más experimentos para encontrar la cantidad mínima de agua para realizar la hidrólisis, obteniendo así un proceso eficiente.

Los parámetros pH y velocidad de agitación, deben de ser constantes durante la reacción de hidrólisis enzimática, se sugiere usar un tanque fermentador para poder monitorear y mantener constantes ambos parámetros.

A lo largo de la reacción el pH va variando por la liberación de grupos carboxilos, comúnmente esto se traduce en un aumento de la acidez o bien una disminución del pH, lo cual puede afectar a la reacción, por lo cual se sugiere que en el reactor se coloque una base concentrada y estéril, con la cual se puedan neutralizar los ácidos producidos, a fin de mantener constante el pH y que la reacción pueda continuar en sus óptimas condiciones.

Si bien el presente tratamiento tiene por principal objetivo hidrolizar al colágeno presente en la muestra para aumentar la digestibilidad, como objetivo secundario se pretende hidrolizar el resto de las proteínas para mejorar sus propiedades nutrimentales, por lo cual se debe definir el Grado de hidrólisis que se quiere obtener, así como el tiempo de reacción, recordando que para obtener tiempos de reacciones cortos es necesario aumentar la dosificación de la enzima.

El grado de hidrólisis es un buen parámetro que suele definir las propiedades de la proteína hidrolizada, la proteína extensamente hidrolizada tiene fines nutrimentales, en cambio las proteínas con bajos grados de hidrólisis son comúnmente usadas como aditivos alimentarios. Por lo cual se sugiere realizar un hidrolizado proteínico con un alto grado de hidrólisis.

Para realizar la dosificación de la enzima se realizó una cuantificación del colágeno, de manera que se pueda suministrar la cantidad mínima necesaria para hidrolizar el colágeno presente en la muestra en un tiempo razonable, considerando que se quiere lograr la industrialización.

Cuantificación del colágeno en el manto de calamar:

Se corrieron varias muestras del manto de calamar liofilizado con el fin de cuantificar la hidroxiprolina contenida en la muestra con el fin de poder hacer una estimación del contenido del colágeno presente, ya que la hidroxiprolina es un aminoácido no esencial que constituye el 10% de la molécula del colágeno, de esta manera se puede estimar la cantidad de colágeno presente y realizar una dosificación adecuada de la enzima colagenasa.

A continuación se presentan los cromatogramas obtenidos:

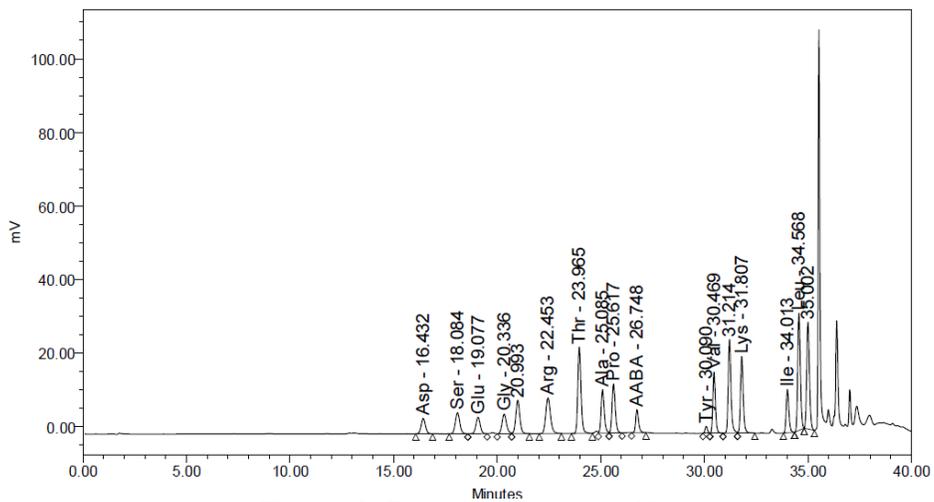


Figura 10. Estándar de aminoácidos

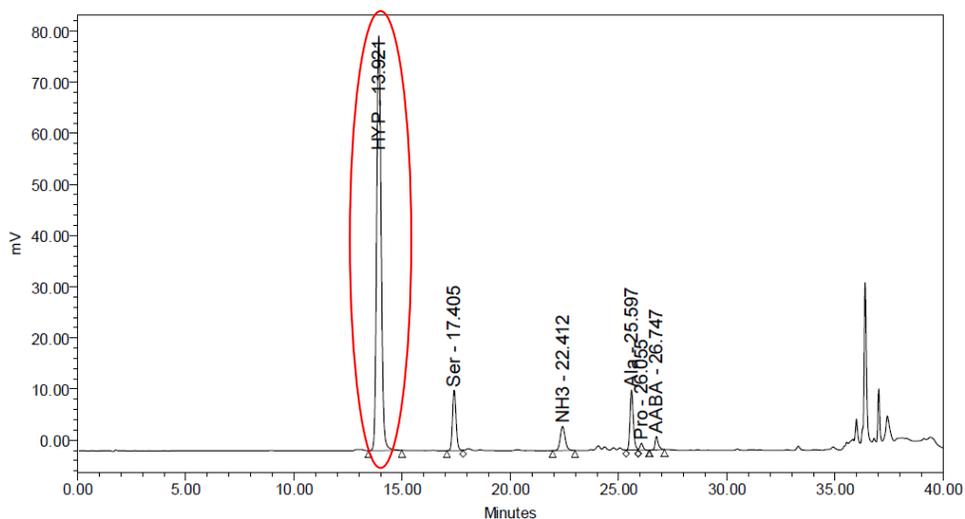


Figura 11. Estándar de Hidroxiprolina

Al correr éstos dos estándares podemos observar que la cuantificación de la hidroxiprolina es posible de realizarse con la metodología propuesta, debido a que tienen diferentes tiempos de retención, posteriormente se realizó la misma metodología para las muestras obteniéndose los siguientes resultados:

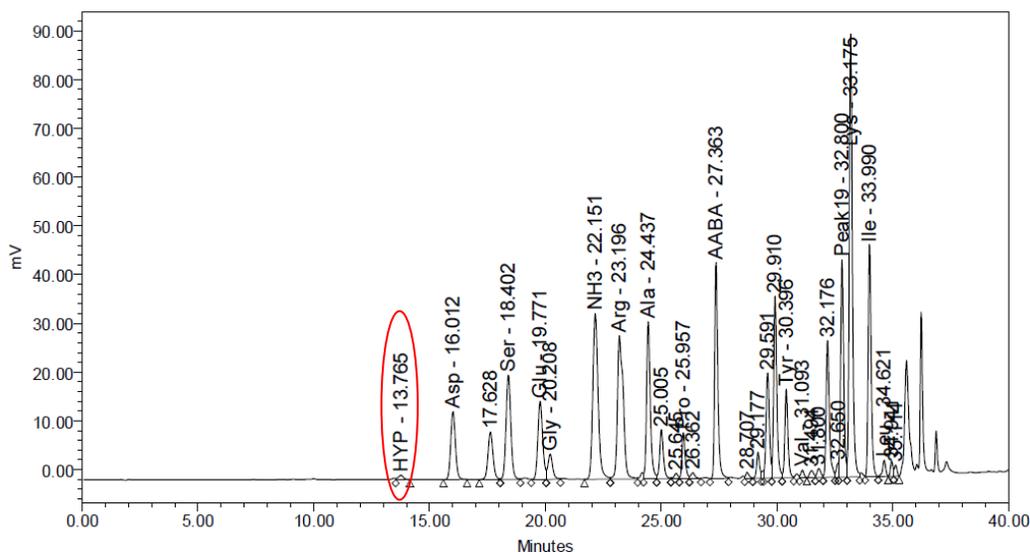


Figura 12. Muestra de manto de calamar

En la *Figura 12* se puede observar que el nivel de hidroxiprolina es mucho menor a la de los aminoácidos presentes en la muestra, de manera que se tendría que aumentar la concentración de la muestra para poder realizar una cuantificación de dicho aminoácido, saturando la columna, por lo que no se logro determinar la cantidad colágeno por medio de la metodología propuesta con HPLC, debido al problema del límite de cuantificación del método.

Hidrólisis enzimática:

Para el experimento de hidrólisis enzimática, se decidió utilizar la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar la cantidad máxima de colágeno reportada para el manto de calamar (3%). Los resultados de la reacción enzimática con las diferentes condiciones propuestas fueron analizados mediante la técnica SDS-PAGE.

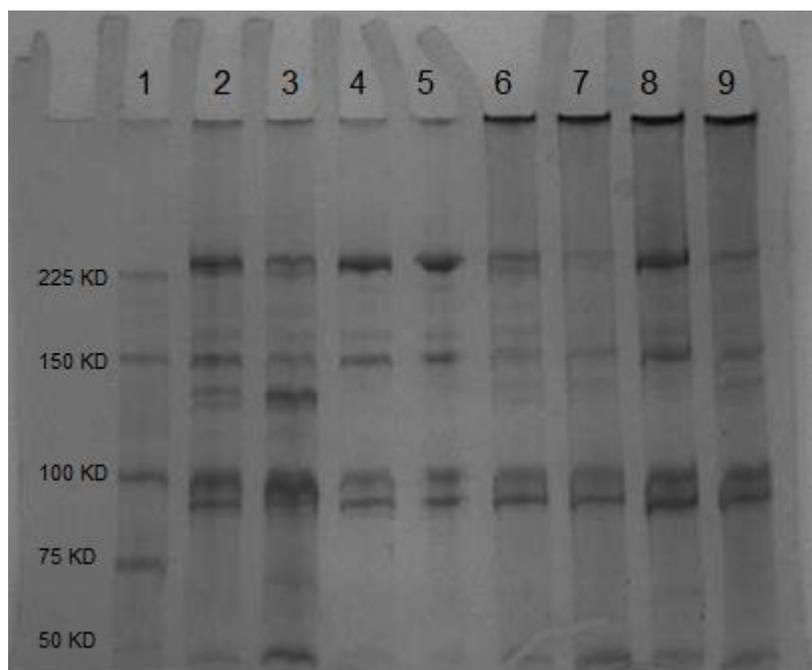


Figura 13. Resultados de la hidrólisis enzimática con diferentes condiciones y procesamiento de la muestra 1. Marcador de peso molecular; 2. Manto de calamar fresco sin enzima incubado a 37°C / 5 h; 3. Manto de calamar fresco con enzima incubado a 37°C/5 h; 4. Manto de calamar fresco sin enzima incubado a 4°C / 24 h; 5. Manto de calamar fresco con enzima incubado a 4°C / 24 h; 6. Manto de calamar liofilizado sin enzima incubado a 37°C / 5 h; 7. Manto de calamar liofilizado con enzima incubado a 37°C / 5 h; 8. Manto de calamar liofilizado sin enzima incubado a 4°C / 24 h; 9. Manto de calamar liofilizado con enzima incubado a 4°C / 24 h.

En dicha técnica se puede observar la presencia del colágeno (300 KD), el cual conforma la primera banda, en todas las muestras se puede observar el efecto de la hidrólisis enzimática; las muestras liofilizadas presentan un mayor grado de hidrólisis sin embargo es importante considerar que parte de la muestra quedó retenida en el pozo, con lo cual no es posible concluir cual es el mejor tratamiento para realizar la reacción enzimática propuesta.

Para poder concluir cual tratamiento es el mejor para lograr el objetivo de realizar una dieta para la acuicultura del pulpo *O. maya* es importante el considerar que se quiere realizar a una escala industrial con lo cual, podemos inferir que el hecho de realizar una liofilización previa a la hidrólisis enzimática puede resultar en una operación poco viable, puesto que es demasiado tardado dicho proceso, además de que resulta ser muy caro.

Otro aspecto que hay que considerar es la dosificación de la enzima, se necesitan realizar más experimentos que permitan encontrar las condiciones ideales de la reacción enzimática, por lo cual se sugiere que se haga un estudio de la cinética de dicha reacción para poder obtener los mejores resultados de dicha reacción enzimática.

Análisis bromatológico de la Dieta control:

Tabla 7. Resultados del análisis bromatológico de la dieta control.

%Peso seco	Dieta control (Dieta1)	Coefficiente de Variación
%Humedad	77.88 g ± 0.27g	0.34 %
%Cenizas	6.21 g ± 0.04 g	0.65 %
%Grasa	0.94 ± 0.04 g	3.99 %
%Proteína	82.43 ± 1.2721 g	1.54%
%Hidratos de carbono*	10.41 g	---

**Los hidratos de carbono fueron calculados por diferencia e incluye a la fibra.*

El análisis proximal de la dieta control corroboró lo esperado, gran parte de la dieta es proteínica (82%), muy poca grasa e hidratos de carbono, dado la dependencia de *O. maya* con el nivel de aminoácidos presentes en la dieta.

La dieta experimental no se realizó debido a la falta de materiales como el tanque hidrolizador así como el tiempo para poder realizar los demás experimentos. Por ende la evaluación de la dieta en los organismos tampoco fue posible realizarla.

8. Conclusiones

- ✓ De acuerdo a los índices de calidad propuestos (perfil de aminoácidos, índice de Oser, cuenta química), se seleccionaron los insumos con mayor calidad para la elaboración de la dieta experimental “Manto de calamar (hidrolizado) + camarón”, ya que contiene el perfil y el balance de aminoácidos idóneo.
- ✓ Con los resultados obtenidos se observa que la estimación del colágeno por el método propuesto (HPLC) es viable.
- ✓ El método propuesto para la eliminación del colágeno (Hidrólisis enzimática, mediante el uso de una colagenasa), demostró ser efectivo en la hidrólisis del colágeno, sin embargo se deben de realizar estudios posteriores para encontrar los parámetros ideales de la reacción enzimática, de manera que se logre optimizar dicho proceso, ya que el costo de la enzima es alto, de igual manera debe probarse la implementación de otras proteasas no específicas y más económicas que puedan hidrolizar parte del colágeno, como la papaína, de manera que permita reducir los costos de producción y acercarse a la industrialización de la acuicultura del pulpo *Octopus maya*.
- ✓ Los resultados del análisis bromatológico de la dieta control demuestran que tiene las proporciones ideales de las principales biomoléculas, permitiendo el óptimo desempeño de la dieta.
- ✓ La puesta en marcha de los ensayos biológicos, así como la falta de algunos materiales evitaron la evaluación de la dieta propuesta.

9. Prospectivas

Para lograr solucionar los dilemas técnicos presentados en el actual proyecto se requiere de una segunda fase en el proyecto.

En la cual se obtenga una adecuada estimación de la cantidad del colágeno presente en el manto de calamar mediante la determinación sugerida (HPLC), esto es posible aumentando la cantidad de muestra.

Para la evaluación de las dietas experimentales propuestas, se debe conseguir los materiales apropiados como el tanque hidrolizador, de manera que se pueda realizar la reacción enzimática propuesta a gran escala y poder elaborar la cantidad de la dieta requerida para correr el estudio biológico, así como la realización de un estudio de cinética enzimática para poder encontrar las condiciones óptimas de reacción.

Sin duda el proyecto de industrializar la producción de *Octopus maya* tiene por objetivo hacer un uso responsable de este recurso y dar un aprovechamiento integral al mismo, de manera que es deseable el desarrollo de nuevos proyectos que puedan abrir nuevas oportunidades de crecimiento tanto tecnológico como económico para la región de Yucatán.

Una posible área de oportunidad es el aprovechamiento de la gran capacidad de *O. maya* para digerir las proteínas, esto nos indica que sus enzimas tienen un gran potencial hidrolítico, las cuales pueden ser usadas para la elaboración de detergentes biodegradables, ya que este tipo de productos usa principalmente enzimas proteolíticas.

De manera que observando las condiciones a las cuales las enzimas de *O. maya* son capaces de trabajar, es decir, las condiciones normales de crecimiento de dicha especie, (pH= 7.8 a 8.2, $T^{\circ}_{\text{óptima}} = 25$ a 28°C , Salinidad 35 a 36%) podemos inferir que sus enzimas proteolíticas son excelentes prospectos para la elaboración de detergentes biodegradables.

10. Bibliografía

Aguila, J.; Cuzon, G.; Pascual, C.; Dominguez, P.; Gaxiola, G.; Sánchez, A.; Maldonado, T.; Rosas, C. The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (voss and Solis) diet: Digestive enzyme activity, blood metabolites, and energy balance. *Aquaculture* ,**2007**, 273, 641-654.

Association of analytical communities (AOAC), Official Method 934.01 Moisture in Animal Feed.

Association of analytical communities (AOAC), Official Method 942.05 Ash of animal Feed.

Association of analytical communities (AOAC), Official Method 4.5.01 N° 920.39 determinación en grasa, por extracto soluble en éter sobre la muestra seca en Goldfish.

Association of analytical communities (AOAC), Official Method 990.03 Protein (Crude) in Animal Feed.

Badui, S. *Química de los alimentos* (3ra ed.). Pearson Educación. México. D.F., **1993**; pp 170-179.

Barcia, I.; Sánchez, L.; Novo, M.; Novás, A.; Maroto, J.; Barcia, R. Optimisation of *Dosidicus gigas* mantle proteolysis at industrial scale. *Food Chemistry* , **2008**, 107, 869-875.

Castelló, F. La proteína en la nutrición de los peces. *Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción* Universidad de Barcelona: Barcelona, España. **1993**. pp. 196-202.

Cerezo, J.; Martínez-Llorens, S.; Tomás , A.; Jover, M.; Rodríguez, C.; Estefanell, J.; Gairín, J.; Domínguez, P.; Rodríguez, C.; García, B. Amino acids composition and protein quality evaluation of marine species and meals for feed formulations in cephalopods. *Aquaculture International*, **2012**, 21, 1-22.

CONAPESCA. http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2012_zip. (Acceso marzo, 25, 2012)

Domingues, P.; López, N.; Rosas, C. Preliminary trials on the use of large outdoor tanks for the ongrowing of *Octopus maya* juveniles. *Aquaculture Research* ,**2012**, 43, 26-31.

Domingues, P.; López, N.; Muñoz, J.; Maldonado, T.; Gaxiola, G. Effects of a dry pellet diet on growth and survival of the Yucatan octopus, *Octopus maya*. *Aquaculture Nutrition*, **2007**, 13, 273-280.

F.A.O. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. **2010**, Roma, Italia.

Fennema, O. *Química de los alimentos*, 2da ed. Acribia: Zaragoza, España, **2000**; pp204-207, 471-478.

García, M.; Quintero, A.; López-Munguía Canales A. *Biotechnología Alimentaria*. Limusa: D.F., México, **2004**, 582-584.

Iker, U.; Iglesias, J.; Domingues, P.; Rosas, C.; Viana, M.; Navarro, J.; Seixas, P.; Vidal, E.; Ausburger, A.; Pereda, S.; Godoy, F.; Paschke, K.; Fariás, A.; Olivares, A.; Zuñiga, O. Current Status and Bottle Neck of Octopod Aquaculture: The Case of American Species. *Journal of the World Aquaculture Society*, **2011**, *42*, 735-752.

Laemmli U., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **1970**, *227*, 680–685.

Martínez, R.; López, E.; Avila, O.; Santos, R.; Mascaró, M.; Rosas, C. Histological and kinetic changes of the digestive gland of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) associated with the age and the feeding. *Journal Aquatic Biology*, **2010**, 71-93.

Martinez, R.; Pech, K.; Mascaró, M.; Navarro, J.; Santos, R.; Rosas, C. Effects of artificial diets in *O. maya*: growth, activity of digestive enzymes, apparent digestibility, metabolites and energy balance. *Aquaculture*, **2012**, 98-130.

Martínez, Y. *Bioquímica digestiva, cinética celular y fisiología energética de Octopus maya* (Voss y Solís, 1966). Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, **2010**.

Munguía, A.; Quintanal, I.; Pereyra, A. El pulpo en Yucatán, un recurso natural para el desarrollo regional sustentable de la región costera. *Desarrollo Regional o Empresarial*, **2007**, 1-18.

NORMA Oficial Mexicana 008-PESC-1993, para ordenar el aprovechamiento de las especies de pulpo en las aguas de jurisdicción federal del Golfo de México y mar Caribe.

NORMA Oficial Mexicana NOM-009-PESC-1993, que establece el procedimiento para determinar las épocas y zonas de veda para la captura de las diferentes especies de la flora y fauna acuáticas, en aguas de jurisdicción federal de los Estados Unidos Mexicanos.

Portela, E. *Caracterización de la conducta selectiva de alimentación en juveniles del pulpo rojo Octopus maya*. Mérida, Yucatán: UNAM Posgrado Ciencias del Mar y Limnología, **2011**.

Quintana, D.; Rosas, C.; Moreno, E. Relationship between nutritional and rearing parameters of *Octopus maya* juveniles fed with different rations of crab paste. *Aquaculture Nutrition*, **2010**, *17*, e379-e388.

Rodríguez, M.; Carmona, C. Crecimiento y supervivencia de crías de pulpo (*Octopus maya*): alimentados con dietas inertes bajo condiciones de laboratorio en Yucatán, México. *Hidrobiológica*, **2008**, *18*, 209-214.

Rosas, C.; Sánchez, A.; Pascual, C.; Aguila, J.; Maldonado, T.; Domingues, P. Effects of two dietary protein levels on energy balance and digestive capacity of *Octopus maya*. *Aquaculture International*, **2010**, *19*, 165-180.

Rosas, C.; Tut, J.; Baeza, J.; Sánchez, A.; Sosa, V.; Pascual, C.; Arena, L.; Dominguez, P.; Cuzon, G. Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. *Aquaculture*, **2008**, 275, 291-297.

Rosas, C., Valero, A., Caamal-Monsreal, C., Uriarte, I., Farias, A., Gallardo, P., Sánchez, A.; Domingues, P. Effects of dietary protein source on growth, survival and digestive capacity of *Octopus maya* juveniles (Mollusca:Cephalopoda). *Aquaculture Research*, **2012**, 1-16.

Soriano, J. *Nutrición Básica Humana*, Universidad de Valencia: Valencia, España. **2006**, 99-109.

Sumaya, M. *Producción enzimática de hidrolizados proteicos a partir de subproductos de la industria pesquera*. Universidad Autónoma Metropolitana. D.F., México **2001**. 10-27.

Torres, W.; Pacheco, R.; Sotelo, R.; Rouzaud, O.; Ezquerra, J. Caracterización parcial del colágeno extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, **2008**, 6, 101-108.

Valero, A. *Efecto del tipo de alimento en el crecimiento y la actividad de las enzimas digestivas de juveniles cultivados de Octopus maya (Voss y Solis)*.: Universidad Nacional Autónoma de México. Mérida, México. **2009**