



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
(BIOLOGÍA MARINA)

**Efecto de diferentes fuentes de proteína sobre la digestibilidad *in vitro*
y aparente en juveniles del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*).**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
IRATZIO REYNALDO LEMUS AREYZAGA

TUTOR PRINCIPAL
DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS
FACULTAD DE CIENCIAS-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. JOSAFAT MARINA EZQUERRA BRAUER
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
DRA. CRISANTEMA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
DR. CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ GONZÁLEZ
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
DR. HÉCTOR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ
F.E.S. IZTACALA-UNAM

MÉXICO, D. F., MAYO 2015



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.



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México

Coordinación del Posgrado, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología
Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510
Teléfono y Fax: (52-55) 56-22-58-03, 5829, 5990 y 5991
Correo electrónico: posgrado@mar.icmyl.unam.mx
http://www.unam.mx/ciencias_del_mar_posgrado



Efecto de diferentes fuentes de proteína sobre la digestibilidad *in vitro* y aparente en juveniles del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*).

T E S I S

Que para obtener el grado académico de:

Maestro en ciencias

(Biología Marina)

P r e s e n t a

M.V.Z. LEMUS AREYZAGA IRATZIO REYNALDO

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS

**COMITÉ TUTORAL: DRA. JOSAFAT MARINA EZQUERRA BRAUER
DRA. CRISANTEMA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ
DR. CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ GONZÁLEZ
DR. HÉCTOR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**

El presente trabajo fue realizado en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la Facultad de Ciencias perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México en la localidad de Sisal-Hunucma en el estado de Yucatán, México (UMDI-Sisal, UNAM), con el apoyo financiero CONACyT 164673 bajo la dirección de la Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortes.

Agradezco a las siguientes personas por el apoyo brindado para realizar este trabajo:

- a) M. en C. Lluvia Korinthya López Aguiar, por su apoyo y asesoría para realizar los análisis, de las materias primas que se utilizaron en el estudio. Así como aclarar todas mis dudas relacionadas.
- b) M. en C. Karla Susana Escalante Herrera, M. en C. Nancy Herrera Salvatierra, Bióloga Marina Elisa Chan Vivas, por su apoyo y asesoría en el laboratorio central de la UMDI-Sisal.
- c) Al Dr. Carlos Alfonso Álvarez González, por mostrarme el funcionamiento del pH STAT así como permitirme trabajar en el Laboratorio de bioquímica de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco y ayudarme y guiarme en los momentos en los que estaba bloqueado.
- d) M. en C. Jaime Suárez Bautista, por ayudarme a recolectar ejemplares de *C. undecimalis* en el puerto de abrigo de Sisal, y asesoría en el montaje del experimento *in vivo*.
- e) A los Técnicos Adriana del Carmen Paredes Medina, Concepción Guadalupe Uc Burgos y Carmiña Guadalupe Flores Puerto
- f) M. en C. Jorge Gamboa, por su ayuda al montar mi experimento y realización de las dietas usadas.
- g) Mis tutores la Dra. Marina Ezquerro, Dra. Crisantema Hernández y el Dr. Héctor Hernández.

Agradecimientos

Al CONACyT por la beca otorgada para poder realizar mis estudios de maestría y por el financiamiento otorgado para el proyecto (164673).

Mi eterno agradecimiento a mi tutora la Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortes, ya que ella me brindó la oportunidad de continuar con mi formación profesional.

A mi familia, mis padres Eva y Reynaldo, que han estado en las buenas y en las malas conmigo y enseñarme a enfrentar la vida, mis hermanas Minda y Erandi de las cuales he aprendido mucho a lo largo del tiempo.

A mis amigos de siempre Edgar, José Antonio, Alberto, Leonardo y David. A los que se fueron y también a los nuevos que van llegando, Roberto, Esau, Carmiña y Lety.

A Katya que de una manera inesperada compartió su vida conmigo y me ayudo a avanzar.

A todo el personal de la UMDI-Sisal, con el cual pude ampliar mi visión.

A la Familia Flores, el señor Carlos Flores y la señora Guadalupe Puerto, mi familia Sisaleña.

Contenido

	Página
Índice de tablas.....	8
Índice de figuras.....	9
Resumen.....	10
Abstract.....	11
Objetivos.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos.....	15
Hipótesis.....	16
Antecedentes.....	17
Distribución y características de <i>Centropomus undecimalis</i>	17
Alimentación de <i>Centropomus undecimalis</i>	19
Importancia económica del robalo blanco.....	19
Proceso de digestión.....	21
Enzimas digestivas.....	22
Proteasas.....	23
Digestibilidad.....	25
Uso del pH STAT.....	25
Digestibilidad aparente.....	26
Estudios de digestibilidad.....	27
Estudios en <i>Centropomus undecimalis</i>	28
Capítulo 1. Digestibilidad <i>in vitro</i> de fuentes alternativas de proteína para dietas de <i>Centropomus undecimalis</i>	31
Introducción.....	31
Materiales y Métodos.....	32
Análisis bromatológico de los ingredientes.....	32
Humedad.....	32
Cenizas.....	32
Lípidos.....	33
Proteínas.....	33

Estudios de Digestibilidad <i>in vitro</i>	34
Diseño experimental.	34
La obtención de organismos.....	34
Digestibilidad <i>in vitro</i>	34
<i>Realización de los extractos enzimáticos de los órganos</i>	35
Determinación de la actividad de proteasas ácidas y alcalinas.....	35
Proteasas ácida (Anson 1938).	35
Proteasas alcalinas (Kunitz, 1947 en Walter, 1984).	35
Digestibilidad <i>in vitro</i> con proteasas ácidas.	36
Digestibilidad <i>in vitro</i> con proteasas alcalinas.....	37
Grado de hidrólisis.....	38
Digestibilidad <i>in vitro</i> de las dietas.....	38
Análisis de aminoácidos totales.....	39
Análisis estadístico.....	39
Resultados.....	40
Análisis bromatológico de las fuentes de proteína.....	40
Digestibilidad <i>in vitro</i>	41
Digestibilidad ácida <i>in vitro</i>	41
Digestibilidad alcalina <i>in vitro</i>	41
Análisis de aminoácidos totales.....	43
Discusión.	45
Digestibilidad <i>in vitro</i> de las dietas.	47
Capítulo 2: Digestibilidad aparente de diferentes fuentes de proteína en juveniles de <i>Centropomus undecimalis</i>	49
Introducción.	49
Materiales y métodos.	50
Diseño experimental y dietas	50
Digestibilidad <i>in vivo</i>	50
Elaboración de los alimentos balanceados (dietas experimentales).....	53
Método de medición de las cenizas libres de carbono.	53
Determinación de la digestibilidad aparente.....	54

Método de recolección de las heces.	55
Análisis estadístico.....	55
Resultados.....	56
Digestibilidad aparente.	56
CIA (ceniza insoluble en ácido).	57
Discusión	58
Discusión general.	60
Conclusión general.	61
Bibliografía.....	64

Índice de tablas.

	Página
Tabla 1. Clasificación taxonómica del robalo blanco(<i>C. undecimalis</i>).....	19
Tabla 2. Clasificación de las enzimas de acuerdo a la CIE.	22
Tabla 3. Proteasas digestivas. Modificado de Sunde, 2006.....	22
Tabla 4. Análisis proximal de los ingredientes seleccionados.....	40
Tabla 5. Digestibilidad in vitro de fuentes de proteína (de origen marino, terrestre y vegetal).....	41
Tabla 6. Grado de hidrólisis total y porcentaje de digestibilidad de fuentes de proteína (marino, terrestre y vegetal).....	42
Tabla 7. Grado de hidrólisis ácido (estómago) y alcalino (ciegos e intestinos) de dietas utilizadas en juveniles de <i>Centropomus undecimalis</i>	43
Tabla 8. Grado de hidrólisis y porcentaje de digestibilidad de la dietas probadas en juveniles de <i>Centropomus undecimalis</i>	43
Tabla 9. Aminoácidos liberados ($\mu\text{g}/\text{mL}$) \pm DE en la fase ácida.....	44
Tabla 10. Aminoácidos liberados ($\mu\text{g}/\text{mL}$) \pm DE en la fase alcalina ciegos e intestinos. ..	44
Tabla 11. Longitud en cm y peso en g de juveniles de <i>Centropomus undecimalis</i> (10 organismos por triplicado por tratamiento) al inicio del experimento (22-11-2013).....	52
Tabla 12. Dietas empleadas para la determinación de la digestibilidad <i>in vivo</i> en juveniles de <i>C. undecimalis</i> (Expresado en gramos).....	52
Tabla 13. Peso en gramos, longitud total y % de supervivencia de juveniles de <i>C. undecimalis</i> al final del experimento n=180 organismos.....	56
Tabla 14. DAMS, DAP y DI de las dietas empleadas \pm DE.....	57
Tabla 15. Correlación entre digestibilidad in vivo y digestibilidad in vitro.....	57

Índice de figuras.

	Página
Figura 1. Robalo blanco (<i>Centropomus undecimalis</i>).	18
Figura 2. Serie histórica de producción de robalo (2002-2011).Tomado de “Anuario estadístico de acuicultura y pesca” CONAPESCA-SAGARPA.....	20
Figura 3. Sistema de tinas de 80 L para el experimento de digestibilidad aparente.....	51

Resumen.

Se evaluó la digestibilidad *in vitro* de 12 fuentes de proteína (p. de soya, p. de soya + fitasa, p. de canola, p. de canola + fitasa, concentrado proteico de soya, gluten de trigo francés, gluten de maíz, suero de leche, harina de pollo, harina de ave, protiblend, harina de pota) por el método de pH STAT, con extractos multi enzimáticos obtenidos a partir de juveniles de robalo blanco *Centropomus undecimalis*. De estas fuentes se seleccionaron 5 con las cuales se realizaron las respectivas dietas y una más como dieta de referencia (gluten de trigo francés, harina de pollo, harina de ave, harina de pota, protiblend y fórmula base, respectivamente). Se determinó *in vitro* e *in vivo* la digestibilidad de las dietas en juveniles de *C. undecimalis*. Se obtuvieron resultados en cuanto a grado de hidrólisis (GH) y digestibilidad aparente de la proteína (DAP). Gluten de trigo francés (3.4% y 89.8%), harina de pollo (4.9% y 90.8%), harina de ave (4.3% y 92.9%), harina de pota (4.2% y 87.1%), protiblend (4.5% y 90.5% y la dieta de referencia (3.4% y 91.6%). Se realizó el análisis estadístico de ANDEVA ($p < 0.05$).

Abstract.

The in vitro digestibility was evaluated in 12 protein kind (soybean meal, soybean meal + phytase, soy protein concentrate, canola, canola + phytase corn gluten, wheat gluten, whey, poultry meal, chicken meal, squid meal, protiblend) by the pH STAT method, with multi enzymatic extracts obtained from juvenile Common snook *Centropomus undecimalis*. These sources 5 were selected which were made the respective diets and as a reference diet (wheat gluten meal, poultry meal, chicken meal, squid flour, protiblend and formula base, respectively). It was determined in vitro and in vivo digestibility of diets in juvenile *C. undecimalis*. Results were obtained in terms of degree of hydrolysis (DH) and apparent digestibility of protein (ADC). Gluten French (3.4% and 89.8%), chicken meal (4.9% and 90.8%), poultry meal (4.3% and 92.9%), squid flour (4.2% and 87.1%), protiblend (4.5% wheat and 90.5% and the reference diet (3.4% and 91.6%). ANOVA statistical analysis ($p < 0.05$) was performed.

Introducción.

La acuicultura es una de las actividades productoras de alimentos que tiene un crecimiento muy rápido, provee alrededor del 47% de la producción pesquera a nivel mundial (FAO, 2012), y se espera que domine la producción para el año 2030.

Es así que la pesca y la acuicultura realiza contribuciones importantes, por lo que en los últimos 50 años el suministro de los productos pesqueros destinados al consumo humano ha superado al crecimiento de la población mundial. Actualmente el pescado constituye una fuente de alimento y proteínas animales para una gran parte de la población mundial.

En la actualidad los peces de agua dulce dominan la producción acuícola mundial (56.4%, 33.7 millones de toneladas), seguidos por los moluscos (23.6%, 14.2 millones de toneladas), los crustáceos (9.6%, 5.7 millones de toneladas), los peces diadromos (6%, 3.6 millones de toneladas), los peces marinos (3.1 %, 1.8 millones de toneladas) y otros animales acuáticos (1.4 %, 814,300 toneladas) (FAO 2012).

La acuicultura en México es un área con un desarrollo, aun así hace falta más investigación para comprender las necesidades nutricionales de las distintas especies con potencial para la producción, como es el caso del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*). La necesidad de brindar a la población fuentes de proteína de origen animal, específicamente de organismos acuáticos, con un alto valor nutrimental y a bajo costo, nos motiva a buscar alternativas que nos lleven a lograr dichos objetivos. El robalo blanco, *C. undecimalis* es la especie marina con mayor potencial de cultivo en el golfo de México (Álvarez-Lanjonchère, 2003; Tucker, Jr., 2003). En los últimos años, la Unidad Académica Sisal, de la Universidad Nacional Autónoma de México, ha realizado estudios encaminados a la inclusión de esta especie a la actividad acuícola, contando ya con las instalaciones adecuadas para ello.

Centropomus undecimalis tiene una gran importancia en la actividad económica de poblaciones costeras, por su alto valor comercial, alta supervivencia, buen rango de

crecimiento y hábitos eurihalinos. Para el año 2012 se encontraba en el lugar 23 en cuanto al volumen obtenido (tanto en pesca como en acuicultura), pero en cuanto a su valor se localiza en el lugar número 10, su tasa media de producción anual es de 2.29%, es importante señalar que entre los años 2011 a 2012 se detectó un incremento de 300% en cuanto a la producción por acuicultura de esta especie (CONAPESCA, 2012). Esto es un indicativo más de la capacidad de ser un organismo apto para ser cultivado y para mejorar poblaciones silvestres (Tucker, 1987, Brenan *et al*, 2006).

En el caso de la acuicultura existen diversos factores que hay que considerar para poder tener un buen rendimiento tanto en los organismos así como un beneficio económico, uno de estos factores es la alimentación, este rubro es muy importante ya que representa alrededor de un 60% de los costos totales en esta actividad, atribuido al alto precio en el mercado que posee la harina de pescado que es el principal insumo utilizado para la elaboración de alimentos balanceados (Cruz-Suarez *et al*, 1996), aunado a la sobreexplotación y abatimiento de los peces usados como materia prima, desde hace al menos diez años, se busca contar con fuentes alternas que cumplan con las exigencias tanto nutricionales de la especie, así como económicas, es aquí donde los estudios de digestibilidad encaminados a encontrar las mejores alternativas para la formulación de dietas cobra mayor importancia, tomando en cuenta las características de cada especie en particular. Estos estudios brindan una perspectiva más clara de los requerimientos nutricionales de nuestra especie.

Existen métodos con los cuales es posible apoyarse para poder ver las características en cuanto a digestibilidad de los ingredientes probados en los organismos, estos métodos son *in vivo* e *in vitro*; en el caso de los métodos *in vitro*, el método de pH STAT tienen grandes ventajas tales como la rapidez en la determinación del grado de hidrólisis (GH) de las fuentes de proteína, el uso de extractos multienzimáticos (proteasas) del organismo al cual se está estudiando, además de ahorro en espacio, uso de organismos y personal. Si bien los métodos *in vitro* brindan grandes ventajas, no van a sustituir por completo a los métodos *in vivo*, ya que en estos se logran ver los resultados en el organismo estudiado. Ambos métodos son complementarios (Ezquerro, 1998).

Por lo antes mencionado, es importante la realización de estudios de fisiología digestiva y nutricional que lleven a formular dietas que proporcionen la mayor cantidad de nutrientes al robalo blanco, mejorando así la tasa de crecimiento, para lograr su producción masiva mediante un ciclo completo, para reducir los costos de producción y lograr el éxito del cultivo.

Objetivos.

Objetivo general.

- Determinar la mejores fuentes de proteína usando dos métodos de digestibilidad, *in vitro* (pH STAT) e *in vivo* para los juveniles del robalo blanco, *Centropomus undecimalis*.

Objetivos específicos.

- Determinar el grado de hidrólisis de diferentes materias primas (proteína de origen marino, terrestre y vegetal) usando el método de pH STAT.
- Formular dietas a partir de selección de las materias primas que tuvieron los mejores Grado de Hidrólisis en el pH STAT.
- Determinación de la digestibilidad aparente de los ingredientes que obtuvieron los mejores resultados en las pruebas *in vitro* (pH STAT).

Para cumplir con los objetivos señalados, la presente investigación se ha dividido en dos capítulos.

Hipótesis.

- Al ser la harina de pescado un factor limitante en la acuicultura, las diferentes harinas, (tanto de origen animal marino, terrestre y vegetal) que se proponen para sustituirla en las formulaciones de los alimentos balanceados, tendrán resultados similares en digestibilidad *in vitro* y a su vez en digestibilidad *in vivo*, en los juveniles de *C. undecimalis*.

Antecedentes.

Actualmente el pescado es la fuente más importante de proteína animal para la humanidad, su producción a través de la acuicultura provee alrededor del 47% del total de la producción pesquera a nivel mundial y se espera que domine para el año 2030 (FAO, 2012).

En los últimos 50 años el suministro de los productos pesqueros destinados al consumo humano ha superado al crecimiento de la población mundial. En la actualidad los peces de agua dulce dominan la producción acuícola mundial (56.4%, 33.7 millones de toneladas), seguidos por los moluscos (23.6%, 14.2 millones de toneladas), los crustáceos (9.6%, 5.7 millones de toneladas), los peces diadromos (6%, 3.6 millones de toneladas), los peces marinos (3.1 %, 1.8 millones de toneladas) y otros animales acuáticos (1.4 %, 814,300 toneladas) (FAO 2012).

El robalo blanco es un organismo carnívoro, los adultos habitan principalmente en ríos en invierno, en meses de verano se movilizan hacia aguas salinas o estuarinas. Los juveniles pueden habitar tanto en agua dulce como salobre (Tringali, 1996). Es un pez carnívoro que se alimenta de crustáceos y peces principalmente.

Distribución y características de *Centropomus undecimalis*.

El robalo blanco (*Centropomus undecimalis*), se encuentra entre los peces marinos de mayor importancia comercial en el golfo de México, siendo muy apreciado para el consumo humano (Tringali, 1996), debido al sabor y calidad de su carne (consistencia y blancura), la facilidad con la que se eliminan las espinas; pero sobre todo a la gran variedad de platillos que se pueden realizar, por lo cual es difícil de sustituir.

Las características físicas de *Centropomus undecimalis*, presenta una superficie dorsal de color gris opaco y con tonalidades de amarillo a verde, la línea lateral se encuentra bien definida y separa bien la parte dorsal de la parte ventral, la cual es de un color blanco. Las aletas pectorales, pélvicas, segunda aleta dorsal y el lóbulo dorsal de la aleta caudal son principalmente de un color amarillo, aunque se pueden encontrar otros colores más oscuros principalmente si provienen de ríos (Fig. 1)



Figura1. Robalo blanco (*Centropomus undecimalis*).

C. undecimalis (Tabla 1) es un pez migratorio que pertenece a la familia *Centropomidae* (cuenta con dos géneros y 15 especies, en México se encuentra un género con 12 especies), y habita principalmente en zonas de estuarios, con una distribución sobre la costa del océano Atlántico, desde latitudes subtropicales y tropicales de norte y sur América, desde Carolina del Sur en Estados Unidos hasta Río de Janeiro, Brasil. En México su distribución es en los estados colindantes con el golfo de México y mar Caribe (Chávez, 1963).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*).

<u>Reino</u>	Animalia
<u>Phylum</u>	Chrodata
<u>Clase</u>	Actinopterygii
<u>Orden</u>	Perciformes
<u>Familia</u>	Centropomidae
<u>Género</u>	<i>Centropomus</i>
<u>Epíteto específico</u>	<i>undecimalis</i>
<u>Nombre Científico</u>	<i>Centropomus undecimalis</i> (Bloch, 1792)
<u>Autor del nombre</u>	(Bloch, 1792)
<u>Determinador</u>	Resendez, M.A.
<u>Fecha de determinación</u>	05/11/1975

Alimentación de *Centropomus undecimalis*.

Los hábitos alimenticios del robalo blanco son principalmente de peces y crustáceos (Taylor, 2000), lo cual es indicativo de un alto requerimiento de proteína, esta necesidad de proteína es lo que incrementa los costos de producción (Cerqueira, 2009). Ya que la proteína es considerada uno de los factores más importantes en la nutrición de peces (interviene en el crecimiento de la masa muscular y desarrollo de órganos, entre otros aspectos) y la de mayor costo, por lo que es necesario conocer los requerimientos específicos de *Centropomus undecimalis* para la formulación de dietas balanceadas (Walton, 1987, en Gracia-López, 2003) y así satisfacer sus necesidades nutricionales, para obtener el máximo rendimiento a un menor costo.

Importancia económica del robalo blanco.

El robalo blanco tiene importancia tanto en la pesca deportiva, principalmente en Florida y el sur de Texas (Roberts, 1987; Taylor *et al.*, 2001), así como también en las pesquerías, ya que sostiene a gran parte de la población pesquera de las regiones como Tabasco,

Campeche y Tamaulipas (Caballero-Chávez, 2009). Así como también más al centro y el sur de nuestro continente, *Centropomus undecimalis* tiene una importancia como fuente de alimento (Tringali, 1996).

El robalo posee hábitos diadromicos y características de ambientes eurihalinos, lo cual le otorga un gran potencial para ser utilizado en la actividad acuícola, por su alta supervivencia y su alta tasa de crecimiento (Tucker, 1987; Brenan *et al.*, 2006).

En relación al volumen de captura de robalo blanco, Campeche es la entidad en donde se obtienen las mayores cantidades, seguidas de Veracruz y Tabasco (Fig. 2).

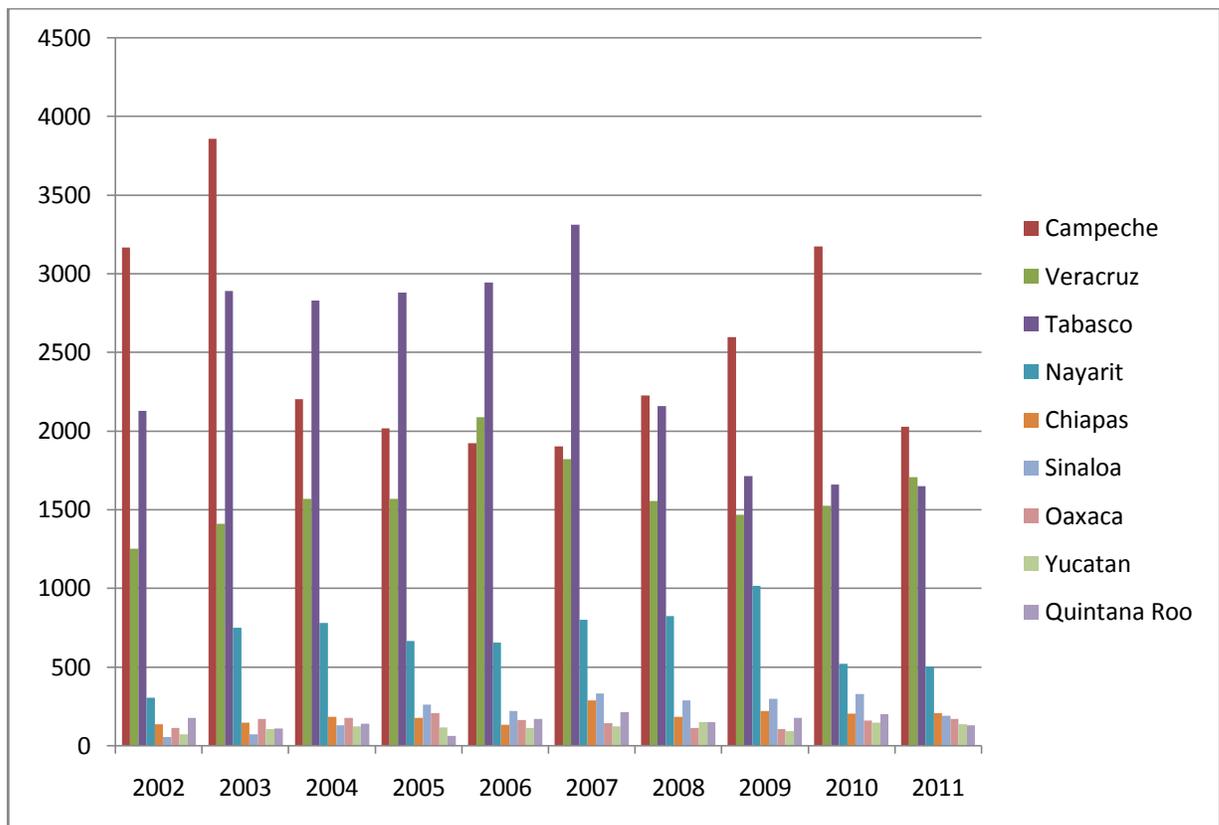


Figura 2. Serie histórica de producción de robalo (2002-2011).

Tomado de "Anuario estadístico de acuicultura y pesca" CONAPESCA-SAGARPA

Proceso de digestión.

La degradación de la comida empieza desde la boca en donde el alimento es desgarrado y triturado por los dientes, branquiespinas, etc. En el estómago las contracciones musculares aseguran el contacto cercano del alimento con las enzimas digestivas y emulsificadores que solubilizan los nutrientes principales. En el caso de los peces que carecen de estómago el bolo alimenticio llega directamente al intestino antes que la solubilización y emulsificación llegue a realizarse. Algunas especies como el gillaro (*Salmo stomachicus*) cuenta con una molleja y saco ciego en donde continua la digestión física del alimento con fuertes contracciones musculares. El intestino proximal y el ciego pilórico contribuyen a las dos terceras partes de la absorción de nutrientes. Aunque también a diferencia de mamíferos y aves en la zona distal del intestino y zona anal cuenta con células como enterocitos que tienen la capacidad de absorber más nutrientes.

El tracto gastrointestinal juega numerosos papeles en el mantenimiento de la homeostasis del pez, como es la osmoregulación, defensa contra patógenos aunque la más importante es la conversión alimenticia, asimilación de nutrientes.

Al haber más de 20,00 especies de peces la anatomía del aparato digestivo es muy variada, esto está relacionado con el lugar donde viven, el tipo de alimentación (ya sea carnívoro, omnívoro o herbívoro) así como hábitos alimenticios. En términos generales la anatomía del tracto gastrointestinal es similar a la de la mayoría de los vertebrados. Los peces se pueden dividir en 2 grupos dependiendo del proceso digestivo.

Los que no cuentan con un estomago verdadero y se alimentan principalmente de algas o son omnívoros, algunos peces de este tipo como los teleósteos como la familia *Cyprinidae*, *Labridae* y *Gobydae* presenta un vulvo intestinal, que solo es un alargamiento, y no cuenta con células que liberen pepsina. La tripsina es la que cumple la función de enzima en estos peces la digestión es intestinal, pasando el alimento del esófago directamente al intestino en donde la absorción se da a lo largo del intestino, en estos organismos la longitud del intestino es mayor a diferencia de los organismos carnívoros.

El otro grupo está conformado por peces carnívoros en donde la anatomía del tracto digestivo ya cuenta con un estomago el cual le permite al pez mejorar la eficiencia de la absorción de nutrientes, aquí la degradación de los nutrientes está dada en dos tiempos, el primer tiempo es una fase acida que se da en el estómago en donde las proteasas ácidas tipo pepsina empiezan a actuar; en el segundo tiempo está caracterizado por una fase alcalina y se da a lo largo de los intestinos, las enzimas que participan en este proceso son principalmente tripsina y quimotripsina. La actividad de las enzimas en general está regulada por pH y temperatura (Farrel *et al*, 2011).

Enzimas digestivas.

La función de las enzimas es catalizar las reacciones biológicas. El nombre de estas enzimas se da en función a la reacción química que catalizan específicamente. Se ha adoptado una clasificación sistemática de las enzimas de acuerdo a la recomendación de la comisión internacional de enzimas, las cuales podemos agrupar en seis grupos, de acuerdo con Lehninger (1984) que son (Tabla 2):

Tabla 2. Clasificación de las enzimas de acuerdo a la CIE.

<u>Tipo</u>	<u>Función</u>
1.Oxido reductasas	Reacciones de óxido reducción
2.Transferasas	Transferencia de grupos funcionales
<u>3.Hidrolasas</u>	<u>Reacciones de hidrólisis</u>
4.Liasas	Adición a los dobles enlaces
5.Isomerasas	Reacciones de isomerización
6.Ligasas	Formación de enlaces con escisión del ATP

En la digestión, la proteína del alimento es hidrolizada por las enzimas digestivas (García-Carreño *et al*, 1997), y estas aumentan la velocidad de la reacción de la hidrólisis.

En el tracto digestivo (estómago, intestinos, sacos ciegos) se encuentran diferentes tipos de enzimas, en el caso del estómago se encuentran enzimas digestivas ácidas tales como; pepsina, gastricina y en el intestino hay enzimas digestivas alcalinas tripsina y quimotripsina, que son producidas en el páncreas y secretadas de forma inactiva hacia el lumen del intestino (Concha, 2008). Estas enzimas se encuentran dentro del grupo 3 (hidrolasas) subgrupo 4 (que actúan sobre enlaces peptídicos). En el presente trabajo nos enfocaremos a las enzimas que se encuentran dentro del grupo 3, las hidrolasas, específicamente el grupo 3.4 que son hidrolasas que actúan en enlaces peptídicos. (García-Carreño *et al*, 1993).

Proteasas.

Son polímeros de aminoácidos que dirigen la capacidad catalítica en distintos sistemas biológicos. Éstas enzimas pertenecen al grupo de las hidrolasas, es decir, que catalizan la degradación de otras proteínas hidrolizando los enlaces peptídicos.

Dependiendo del sitio en donde actúen las proteasas se pueden clasificar en endopeptidasas y exopeptidasas, ver la siguiente tabla.

Tabla 3. Proteasas digestivas. Modificado de Sunde, 2006.

	<u>Enzima</u>	<u>Acción</u>
<u>Endopeptidasas</u>	Tripsina (EC. 3.4.21.4)	Extremo carboxilo de aminoácidos cargados positivamente
	Quimotripsina (EC. 3.4.21.1)	Extremo carboxilo de aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas largas
	Elastasa (EC. 3.4.21.11)	Extremo carboxilo de aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas cortas
	Pepsina (EC. 3.4.23.1)	Extremo carboxilo de los aminoácidos

<u>Exopeptidasas</u>	Carboxipeptidasa A (EC. 3.4.17.1)	Extremo carboxilo de aminoácidos con cadenas laterales ramificadas o aromáticas del C extremo terminal
	Carboxipeptidasa B (EC. 3.4.17.2)	Extremo carboxilo de aminoácidos con cadenas laterales básicas del C extremo terminal

En cuanto a su mecanismo de acción se clasifican en 4 grupos:

- 1) Serina-proteasas. 3.4.21 Tripsina, quimotripsina, elastasa. Se caracterizan por tener un residuo serina en su sitio activo.
- 2) Cisteína-proteasas. 3.4.22 Papaína, quimopapaína, catepsina B. Aquellas enzimas que engloban un residuo de cisteína en su centro catalítico Jordan, (2000).
- 3) Proteasas ácidas o aspárticas. 3.4.23 Pepsina. Presentan el ácido aspártico en su centro activo.
- 4) Metal-proteasas. 3.4.24. Tiene un residuo de ácido glutámico en el centro activo, y requieren un catión divalente (Ca, Mg o Zn) para catalizar la hidrólisis.

La enzima pepsina que pertenece al grupo de las proteasas ácidas o aspárticas (3.4.23) es una endoproteasa que se caracteriza por ser una enzima secretada en el estómago de los organismos, es activada tanto por la acidez del jugo gástrico, así como por otras pepsinas que ya estén activadas, su forma inactiva o precursor es el pepsinogeno, su rango de actividad es a un pH entre 2 y 6.

Existen otro tipo de enzimas las cuales actúan en un pH alcalino, las serina-proteasas (3.4.21), estas son tripsina (3.4.21.4), quimotripsina (3.4.21.1) y elastasa (3.4.21.11). Estas son al igual que la pepsina endoproteasas, que cuentan con un residuo serina muy reactivo en su centro activo. La característica principal de esta familia de enzimas es la de estar formada por una triada catalítica, es decir interviene un residuo histidina, un residuo serina y un residuo ácido aspártico. Estas tres enzimas son producidas en el páncreas y secretadas inactivas en la luz del intestino como tripsinogeno, quimotripsinógeno.

La especificidad del sustrato entre cada una de estas enzimas es diferente, la tripsina hidroliza por el lado carboxilo de los aminoácidos con cadenas laterales largas y carga positiva como lisina y arginina, la quimotripsina hidroliza en enlace peptídico del extremo carboxilo de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano, la elastasa hidroliza el enlace peptídico del extremo carboxilo de aminoácidos hidrofóbicos como alanina y valina.

Digestibilidad.

Los estudios de digestibilidad (*in vitro* o *in vivo*) son métodos complementarios. La digestibilidad *in vitro* enfocada en la nutrición acuícola, nos brindan muchas ventajas tales como, rapidez en la determinación de resultados, el uso de cantidades muy pequeñas de muestras y ahorro de recursos tanto económicos como humanos (Ezquerro, 1997). En cuanto a los estudios *in vivo*, la digestibilidad aparente es una medición de la asimilación de nutrientes de un organismo, proporciona una estimación muy práctica de la disponibilidad de los mismos (Lee y Lawrence, 1997, en, Smith, 2008). Puede determinarse de manera directa (gravimétrico) o de manera indirecta (marcador inerte). Estos métodos nos sirven para investigar los requerimientos nutricionales de una o más especies, así como para formular dietas, que nos ayuden a disminuir los costos de producción.

Uso del pH STAT.

Los métodos *in vitro* para evaluar la digestibilidad de proteínas son muy necesarios, ya que ellos nos ahorran tiempo y recursos económicos, espacio y organismos, a diferencia de los métodos *in vivo* (Grabner, 1985 en Ezquerro, 1997).

El pH STAT ha sido utilizado en la investigación de nutrición animal y humana, para determinar de manera *in vitro* la digestibilidad de alimentos. Este ensayo mide la actividad de hidrólisis de las enzimas, sobre un sustrato que en este caso es una materia prima (fuente de proteína), del cual rompe los enlaces peptídicos (Tibetts, 2011), en este caso serán enzimas de estómago (pH ácido) y enzimas de ciegos e intestinos (pH alcalino) de robalo blanco (*Centropomus undecimalis*).

El uso del método de pH STAT para monitorear la digestibilidad de proteínas tiene algunas ventajas como:

- 1) Un pH constante, sin el uso de un buffer fisiológico concentrado.
- 2) El rango de hidrólisis de las proteínas puede ser estimado rápidamente durante el proceso de digestión por la evaluación de la curva de titulación (Ezquerro, 1997).

Los estudios de digestibilidad realizados por Dimes y Haard (1994), comparando el método de pH STAT versus diferentes métodos de digestibilidad *in vitro* como pH-shift (de un paso y de dos pasos) y la digestibilidad aparente en *Salmo gairdneri* vieron que el pH STAT predice mejor el rango de digestión de proteína. Por lo que desde ese momento a la fecha, se ha estado empleando con éxito sobre diferentes especies de organismos acuáticos, como son crustáceos y peces en su mayoría marinos, obteniendo resultados muy cercanos a la realidad nutricional de la especie en estudio.

El pH STAT, es un método *in vitro*, este a través de la simulación de las condiciones del tracto gastrointestinal nos indica sobre que sustrato las enzimas tienen mejor actividad al haber rompimiento de enlaces peptídicos (Grabner, 1985; Tibetts, 2011).

Digestibilidad aparente.

La digestibilidad aparente es un método *in vivo* que determina la digestibilidad que tiene un alimento o sus componentes como proteínas, lípidos, carbohidratos, etc., utilizando

como referencia un marcador inerte que no se absorbe en el tracto gastrointestinal (Fenucci, 2008) como la zeolita.

A pesar de los avances que han tenido los estudios de digestibilidad *in vitro*, no han podido desplazar a los estudios *in vivo*. En estos estudios se pueden tener una mejor visión de los resultados en cuanto a la asimilación de los distintos nutrientes que se están analizando.

En el proceso de digestión, la proteína es hidrolizada por enzimas digestivas (García-Carreño *et al.*, 1997) existen diferentes tipos de enzimas digestivas, en el caso de estómago (ácidas) las principales que se encuentran son, pepsina y gastricina; en ciegos pilóricos e intestinos (alcalinas) tripsina y quimotripsina.

Para poder incluir al robalo blanco al mundo de la acuicultura es necesario realizar estudios para conocer mejor su ciclo biológico, siendo el desarrollo larval la parte más importante.

Estudios de digestibilidad.

Walford *et al.* (1991) al trabajar con larvas de *Lates calcarifer* (que es una especie muy cercana al robalo), observaron que estas son capaces de degradar la pared de la membrana de los micro encapsulados., cuando se agregaban junto con rotíferos.

Boonyaratpalin *et al.* (1998) probaron en juveniles de *Lates calcarifer*, la sustitución de la harina de pescado por diferentes fuentes de proteína de soya, se observa que estos organismos tienen una mejor asimilación de la harina de pescado, a diferencia de la soya, observándose en una mejor peso final, supervivencia.

Es importante también tomar en cuenta el cambio de alimentación en las larvas, pasar de un alimento vivo a un alimento inerte puede llevar a tener grandes mortalidades Honzaryk

trabajó con larvas de *Centropomus parallelus*, probando diferentes microencapsulados de colesterol-lecitina, y diferentes fuentes de proteína, como musculo de tiburón, de calamar y proteína de soya.

Tzisuki *et al.* (2006), probaron el efecto de diferentes salinidades (5, 15 y 35 ppt) sobre la supervivencia, crecimiento y actividad enzimática digestiva en *Centropomus parallelus*, en la cual en las tres hubo un 93.3% de supervivencia, la mejor actividad y mejor crecimiento se observó en 15 ppt. La supervivencia nos indica que es un pez eurihalino.

Existen algunos trabajos en *Centropomus parallelus* estudiando el efecto de diferentes salinidades en supervivencia, crecimiento y actividad enzimática (Suzuki, 2007).

Katersky, *et al* (2007), estudió el efecto de diferentes temperaturas en la toma de alimento y crecimiento de *Lates calcarifer* entre 20 y 38.6°C (con intervalos de 3°C), encontraron que la mejor aceptabilidad de alimento, rango de crecimiento, se dieron en los rangos de 32.8, 31.4, 31.2 y 30.2 °C, aunque no hubo muchas diferencia en los rangos de 21°C a 39°C, probando la adaptabilidad a los cambios de temperatura.

Shimada *et al.* (2010), analizaron en *Centropomus parallelus* el aparato digestivo a través de cortes histológicos analizando la absorción de proteínas y lípidos donde se observó que los lípidos son absorbidos mayormente en el ciego y las proteínas solo en el recto.

En el caso de *Centropomus parallelus* hay trabajos que abarcan los parámetros hematológicos, así como la actividad fagocítica (relacionados al sexo, estado de madurez gonadal) realizado por Aguiar *et al.* (2012).

Estudios en *Centropomus undecimalis*.

En el aspecto nutricional se encuentran pocos trabajos realizados en *Centropomus undecimalis*. Tucker (1987), en un estudio realizado con larvas y juveniles de robalo, en

estanques de tierra y probando alimento fresco y alimento comercial, donde, el alimento de atún y de trucha tuvo las mejores tasas de crecimiento.

Borquez *et al.* (1998), estudió la conducta alimentaria en juveniles de robalo blanco utilizando como atrayentes aminoácidos: L-prolina, L-histidina, L-serina, L-lisina, L-arginina, L-isoleucina, L-acido glutámico, entre otros.

Gracia-López *et al.* (2003), probaron en dos estudios, en donde valoraron el efecto que hay en juveniles de *Centropomus undecimalis* de diferentes niveles de proteína en la dieta (28.8 %, 40.4 %, 53.4 % y 65.8 %), usando como fuentes de proteína la harina de pescado, harina de calamar y pasta de soya, donde la dieta de 53.4 % de P.C. tuvo una mejor ganancia de peso. En la segunda parte del experimento, la dieta de 53.4 % fue comparada con 3 alimentos comerciales de tilapia, bagre y trucha, se observó un mejor peso final en la dieta de trucha y dieta con 53.4 % de P.C., esto nos indica que al ser el robalo un pez carnívoro marino las necesidades de proteína en la dieta son muy altas para satisfacer sus demandas. Y las fuentes de proteína de origen animal (pescado, camarón) son las que dieron mejor resultado.

Es importante tomar en cuenta que al querer mantener en condiciones de cautiverio a *Centropomus undecimalis*, además del requerimiento alimenticio, también es importante considerar la frecuencia con que el alimento se debe de brindar. García-Galano, *et al.*,(2003), trabajaron con 3 frecuencias distintas de alimentación 1, 2 y 3 veces al día midiendo 4 variables, consumo de alimento, evacuación gástrica, conversión alimenticia y crecimiento), detectando que el consumo de alimento no fue afectado las 3 frecuencias, sin embargo en cuanto a la evacuación gástrica, el tiempo de esta disminuyó conforme aumentaba la frecuencia de alimentación, así mismo la conversión alimenticia y crecimiento se observó mejores resultados en los organismos que fueron alimentados 3 veces al día.

Reyes, *et al* (2004), trabajaron el ámbito alimenticio partiendo del punto de la sustitución de un alimento vivo a uno inerte para crear las condiciones apropiadas para la producción

en cautiverio del robalo blanco, obteniendo un factor de conversión del 3.75:1, evidenciando esto la capacidad potencial de adaptarse a un cultivo de este organismo, en dicho trabajo recomienda la importancia de profundizar en requerimientos de esta especie.

Se han hecho estudios sobre el desarrollo ontogénico de la habilidad de succión para la alimentación (Wainwright *et al.*, 2006).

Zarsa-Mesa, *et al* (2006) cultivaron en estanques de tierra y con agua dulce juveniles de *Centropomus undecimalis* y *C. parallelus*, alimentándolos únicamente con crías de tilapia, obteniendo buenos resultados, la tasa diaria de crecimiento fue de 0.062 cm para el robalo blanco y de 0.028 cm para *C. parallelus*.

Ibarra-Castro *et al.*, (2011) reprodujeron en cautiverio a *Centropomus undecimalis*, con desove inducido y fertilización natural, y a las larvas obtenidas de estos desoves se les estableció un protocolo de alimentación.

Debido a que el alimento representa cerca de 70% del costo total de la producción en acuicultura; la formulación de los alimentos y tipo de cultivo es la base del éxito para los productores (Velasco *et al*, 2000), es por ello que la nutrición y alimentación de organismos marinos ha recibido gran atención en los últimos años (Cuzon *et al*, 2002), y la tendencia ha sido buscar nuevas fuentes alternativas de proteínas y técnicas de cultivo que influyan en una mayor tasa de crecimiento o en el logro de las tallas máximas de la especie (Carrillo *et al*, 2000; Galindo *et al*, 2001).

Capítulo 1. Digestibilidad *in vitro* de fuentes alternativas de proteína para dietas de *Centropomus undecimalis*.

Introducción.

Siendo la alimentación el rubro en donde los costos de producción es mayor en la acuicultura, y a su vez la proteína el insumo que mayor peso tiene en esta, la búsqueda de fuentes alternas de proteína que sustituyan a las tradicionales, como la harina de pescado.

La determinación de la digestibilidad de los ingredientes es un paso importante para saber la capacidad del organismo para aprovecharlo (Moyano, 2000). Existen métodos *in vitro* e *in vivo*, para realizar su determinación, estos son complementarios.

Los estudios de digestibilidad *in vitro* ayudan determinar la calidad de los ingredientes a evaluar, con las ventajas de ahorro en recursos económicos, muestras a evaluar, material humano y tiempo, estos estudios brindan un amplio panorama de las cualidades de las muestras a evaluar, con esto es posible hacer una preselección de los ingredientes que se desean probar o estudiar (Ezquerria, 1997).

El sistema pH STAT, ha sido usado en la investigación de nutrición humana y animal, para determinar la digestibilidad de la proteína de un ingrediente. Desarrollado por Pedersen y Eggum (1984), ha demostrado una exactitud en la predicción de la digestibilidad. Dimes y Haard (1994) sugirieron la utilización de este método en la evaluación de alimentos para salmónidos (Alarcón, 2002), en donde se observa una buena correlación entre la digestibilidad *in vitro* y digestibilidad *in vivo*. También se ha usado esta técnica para la optimización de la fracción proteica de los micro-capsulados usados en la alimentación de larvas de peces marinos.

Materiales y Métodos.

Análisis bromatológico de los ingredientes

Las materias primas se analizaron determinando su composición química proximal de acuerdo al método AOAC (1980). La humedad se determinó por medio de secado en estufa, Las cenizas se determinaron por medio de incineración en mufla. Los lípidos (extracto etéreo) se determinaron por medio del método Goldfish y para la determinación de las proteínas se usó el método de análisis elemental de carbono y nitrógeno.

Humedad.

La determinación de secado en estufa se basa en la pérdida de peso de la muestra por evaporación del agua. Para esto se requiere que la muestra sea térmicamente estable y que no contenga una cantidad significativa de compuestos volátiles (Análisis de alimentos). Este método se llevó a cabo en una estufa de la marca Binder®. Primero se pesó la charola vacía, posteriormente se le agregaron aproximadamente 5 g del ingrediente y se colocó en la estufa por 12 horas a 60°C. Una vez pasado este tiempo se dejó enfriar la charola con el alimento en un desecador y se procedió a pesar, se anotaron los resultados.

Cenizas.

Las cenizas de un alimento son un término analítico equivalente al residuo inorgánico que queda después de calcinar la materia orgánica. Existen dos métodos para la determinación de cenizas; el seco y el húmedo. En este trabajo la determinación de las cenizas es realizada por medio del método seco, el cual es el más común para cuantificar la totalidad de minerales en alimentos. En este método toda la materia orgánica se oxida en ausencia de flama a una temperatura de 550 – 600 °C, el material inorgánico que no se volatiliza se le conoce como ceniza (Análisis de alimentos, 2007-2008).

Lípidos.

Se utilizó el método Goldfish. Este método se basa en la extracción continua de los lípidos presentes en la muestra con un disolvente orgánico (hexano). El principio de este método es el calentamiento del disolvente que después se condensa y cae sobre la muestra y va arrastrando los lípidos al fondo del vaso, como es un goteo continuo se extraen todos los lípidos, posteriormente se retira el exceso de hexano dejando evaporar y se cuantifican los lípidos recuperados y por diferencia de peso, se saca la cantidad de los mismos.

Proteínas.

Se utilizó el método de análisis elemental, este tipo de análisis da el contenido total de C, H, N y S presentes en las muestras. Se basa en la combustión directa e instantánea de la muestra en una atmósfera de oxígeno puro. La temperatura a la cual se realiza dicha combustión es de 950-1400 °C. El C, H, N y S se transforman mediante dicha combustión a CO₂, N₂ y SO₂. Estos gases son llevados por un gas portador (He) hasta unas celdas individuales de infrarrojos para CO₂ y SO₂ (se asegura una medición libre de interferencias ya que se realiza al mismo tiempo que se produce la combustión). Estos gases se eliminan y se mide el N₂ por termo-conductividad diferencial. Luego son procesados teniendo en cuenta el peso de la muestra y los datos obtenidos a partir de un patrón. Con esto se obtiene el porcentaje de cada elemento a determinar contenido en la muestra.

Estudios de Digestibilidad *in vitro*.

Diseño experimental.

La obtención de organismos.

Se emplearon 15 robalos juveniles, los cuales se obtuvieron de los desoves que hay en el área de reproducción y de engorda de peces de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI-Sisal), Facultad de Ciencias de la UNAM, en Sisal-Hunucma, Yucatán, México (Anexo1).

Digestibilidad in vitro.

Se llevó a cabo la extracción de órganos para la obtención de extractos enzimáticos de estómago, ciegos pilórico e intestino. Para realizar esto, los organismos se dejaron 48 horas en ayuno. Se trasladaron al laboratorio central de la UMDI- Sisal. Se mantuvieron en un tanque de 10 L de agua de mar, a la cual se le agregaron 3 mL de esencia de clavo (4-allyl-2-methoxyphenol >0.1 mg/mL) por cada litro para anestésiarlos e inmovilizarlos y llevar a cabo las mediciones biométricas de longitud total, longitud patrón, altura máxima, altura mínima y peso.

Posteriormente se sacrificaron los peces y se realizó la extracción de los distintos órganos (estómagos, ciegos e intestinos). Esto se realizó en frío, depositando cada órgano en un vaso de precipitados previamente identificado, que se sumergió en recipientes con hielo. Los órganos se enjuagaron con agua estéril libre de pirógenos, se pesaron individualmente y se guardaron en bolsas previamente identificadas y se congelaron en nitrógeno líquido. Posteriormente se almacenaron a -80°C. Los órganos se liofilizaron para trasladarlos a las instalaciones de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, para su procesamiento.

Realización de los extractos enzimáticos de los órganos.

Las mediciones de la digestibilidad in vitro se realizaron en el laboratorio de Bioquímica de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Las muestras se maceraron en un homogeneizador de tejidos (ULTRA TURRAX ®) con agua destilada en una relación 15:1 (15mL de agua destilada por cada gramo de tejido). Los macerados que se obtuvieron fueron colocados en tubos eppendorf de 2 mL y se procedió a centrifugar a 13,370 g /15 min a 4°C. Se tomó la capa media del sobrenadante y se transfirieron a otros tubos eppendorf y guardaron a -20°C.

Determinación de la actividad de proteasas ácidas y alcalinas.

Posterior a la obtención de los extractos multienzimáticos se determinó la actividad de las enzimas digestivas ácidas y alcalinas fue a través del método de Anson (1938) y Kunitz (1947), modificado por Walter (1984), con las siguientes modificaciones.

Proteasas ácida (Anson 1938).

En un tubo eppendorf de 2 mL se agregó 1 ml de hemoglobina (1%) en tampón 0.1 M glicina-HCl a pH de 2, HCl a pH 2, se agregaron 5 µl de extracto enzimático y se incubaron durante 5 min a una temperatura de 37°C. La reacción se detuvo adicionando 0.5 ml de TCA al 20 %. Se deja reposar la mezcla de reacción 15 min a 4°C para que se precipitaran los restos de las membranas y organelos celulares. Después se centrifugó a 13,370 g/5min/4°C y se midió la absorbancia del sobrenadante en el espectrofotómetro a longitud de 280 nm (cubeta de cuarzo), todo esto se realizó por triplicado. Y las unidades de actividad fueron expresadas Unidades de enzima/mL.

Proteasas alcalinas (Kunitz, 1947 en Walter, 1984).

Se agregó 0.5 ml de caseína (1%) pH 9 a un tubo (eppendorf de una capacidad de 2mL), 0.5 ml Solución amortiguadora o buffer tris-HCl 100 mM+ CaCl₂ 10 mM pH 9 ,10 µl de

extracto enzimático y se incubó durante 40 min a 37 °C, se detuvo la reacción adicionando 0.5 ml de TCA al 20%, después se dejó reposar la mezcla de reacción (15min) a 4°C para que precipiten las proteínas y se centrifugo a 12,000 rpm durante 5 min y se midió la absorbancia del sobrenadante en el espectrofotómetro a longitud 280 nm.

Una vez obtenidas las absorbencias de los diferentes extractos se procedió a determina las unidades enzimáticas por mililitro por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades/mL} = \frac{\Delta \text{ Abs}_{280 \text{ nm}} \times \text{Volumen final de reacción (mL)}}{\text{CEM Tirosina} \times \text{Tiempo} \times \text{Volumen extracto (mL)}}$$

Dónde:

Δ Abs: es la absorbancia a determinada longitud de onda,(en este caso 280 nm).

Volumen final de reacción (mL): es el volumen final de la reacción expresado en mL.

CEM: coeficiente de extinción molar de tirosina.

Tiempo: el tiempo de incubación en minutos.

Volumen del extracto: cantidad de extracto que se agregó expresado en mL.

Digestibilidad in vitro con proteasas ácidas.

El pH STAT permite establecer la capacidad hidrolítica que poseen los extractos enzimáticos sobre cada una de la fuente de proteínas evaluadas, partiendo de la definición del grado de hidrólisis (GH) que es la ruptura de un enlace covalente con adición de los elementos del agua (Harper, 1986), se presupone que a mayor GH mayor capacidad poseen las enzimas para romper a la proteína.

Se probaron 11 ingredientes proteínicos animal y vegetal, en el sistema pH STAT (*Metrohm Metrohm Titrande 842 pH-STAT*), con un electrodo (Idrolyte 6.0224.100, pH 1/11, 0 - 60°C), se determinó el grado de hidrólisis de las enzimas de estómago (ácidas) y ciegos e intestinos (alcalinas), con un volumen final de 5 mL de agua destilada

y el equivalente de 8 mg de proteína por mL de agua, la hidrólisis se llevó a cabo a 37°C con una duración de 15 min (en el caso de estómago) y de 45 min (en ciegos e intestinos).

Se ajustó el pH a 3.55 con HCl al 0.1 N manteniéndola en agitación continua a una velocidad constante, se bajó el pH a 3.5 e inmediatamente se agregaron 50 unidades de enzima (10 µL), se dejó corriendo el programa 900 segundos (15 minutos). El grado de hidrólisis se calculó a partir de los mL de HCl que se utilizaron para mantener el pH en 3.5 durante los 15 minutos que duró la prueba.

Digestibilidad in vitro con proteasas alcalinas.

Se realizó la medición por separado la determinación del grado de hidrólisis de ciegos y de intestinos, la metodología es la misma para ambos casos, en donde al recipiente que se encuentra a 37 °C se le agregan 5 mL de agua inyectable y 8 mg de fuente proteica por mL de agua inyectable, se ajusta el pH a 7.8 con NaOH al 0.1 N, se mantiene en agitación constante la mezcla y se sube el pH a 8, una vez que se llegó a este pH se agregan 30 unidades de enzima a la mezcla y se continua con el proceso de mezclado durante 45 minutos. El grado de hidrólisis se calculó a partir de los mL de NaOH que se utilizaron para mantener el pH en 8 durante 45 minutos que duró la prueba.

En el caso de la digestibilidad ácida se utilizó la hemoglobina (US Biological, catálogo # H1850) como ingrediente de referencia y para la digestibilidad alcalina se utilizó caseína grado Hammerstein (Res. Organics catálogo # 1082C).

El volumen final tanto de HCl como de NaOH utilizado en la prueba permite establecer el grado de hidrólisis (GH)

Grado de hidrólisis.

El grado de hidrólisis (GH), es presentado en porcentaje del número de enlaces hidrolizados.

$$\underline{GH (\%) = h/h_{tot} \times 100}$$

Dónde:

h: es el número de enlaces peptídicos hidrolizados.

h_{tot} : el número de enlaces peptídicos totales del sustrato proteico.

$$\underline{h = \frac{V_b \times M_b \times \alpha}{MP}}$$

Dónde:

h : número de enlaces peptídicos hidrolizados.

V_b : consumo de base en mL.

M_b : la normalidad de la base. 0.1N

α : la constante de disociación de los grupos α -NH₂. 0.005

MP: la masa de proteína en la mezcla de reacción. 0.04 g

Digestibilidad in vitro de las dietas.

En cuanto al análisis *in vitro* de las diferentes dietas que se utilizaron en este experimento, se llevó a cabo la determinación de la digestibilidad en estómago (ácidas), ciegos e intestinos (alcalinas), utilizando el sistema pH STAT (Metrohm, Suiza) se determinó el grado de hidrólisis, se llevó a cabo a 37°C con una duración de 15 minutos (en el caso de estómago) y de 45 minutos (en ciegos e intestinos).

Análisis de aminoácidos totales.

Estudio realizado de acuerdo a Church *et al* (1983). Este estudio se basa en la reacción que tienen los grupos α - amino con el o-ftaldehido y el β - mercaptoetanol. La preparación de la solución OPA es mezclar 25 mL de tetraborato de sodio al 100 mM, 2.5 mL de SDS al 20%, 40 mg de OPA disuelto en 1 mL de metanol, 100 μ L de β - mercaptoetanol y se afora a 50 mL con agua libre de pirógeno, cabe señalar que esta solución es preparada diariamente, previo a la realización de la medición.

Para los ensayos se toman 25 μ L de la muestra y se adiciona a 1 mL solución OPA se mezclan brevemente y se incuban durante dos minutos a temperatura ambiente. Se lee la absorbancia a 340nm.

Para determinar la concentración total de aminoácidos (μ g/mL) de la mezcla de reacción se realizó una curva patrón con l- leucina (0.5 mg/mL) en concentraciones crecientes de 0.25 mg hasta los 5 mg.

Durante la determinación del GH de las diferentes dietas, se tomaron muestras (200 μ L) de la digestión acida a los 0, 7 y 15 minutos, y en el caso de la digestión alcalina a los 0 30 y 45 minutos. En la digestibilidad alcalina, se tomaron muestras de ciego e intestinos a tres diferentes tiempos (0, 30, 45 minutos). Estas muestras tomadas se mezclaron con un volumen igual de TCA al 12%, posteriormente se guardaron a -80°C para posteriormente llevar a cabo otras determinaciones como análisis de aminoácidos totales.

Análisis estadístico.

Se usó un análisis de varianza de una sola vía (ANDEVA) para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos, aplicando la prueba de rangos múltiples de Tuckey,

para ponderar las diferencias entre los tratamientos. El nivel de significancia fue del 5%. El paquete utilizado fue STATISTICA 10.0.

Resultados.

Análisis bromatológico de las fuentes de proteína.

La composición química de las diferentes harinas, se muestra en la tabla. El origen de todas las fuentes de proteína analizadas es nacional de la compañía Malta Cleyton®. El gluten de trigo VITEN® es de la compañía francesa Roquette.

Tabla 4. Análisis proximal de los ingredientes seleccionados.

<u>Ingrediente</u>	<u>Humedad</u>	<u>Cenizas</u>	<u>Lípidos</u>	<u>Proteína cruda</u>
<u>Pasta de soya*</u>	7.01	6.95	1.77	51.21
<u>Harina de pollo*</u>	3.93	12.46	12.64	66.85
<u>Gluten de maíz*</u>	5.04	1.56	2.35	69.19
<u>Harina de ave*</u>	3.81	16.73	14.73	62.47
<u>Pasta de canola*</u>	4.86	7.10	1.72	44.77
<u>Gluten de trigo francés*</u>	6.78	0.90	1.76	80.82
<u>Suero de leche*</u>	2.47	7.85	0.22	12.84
<u>H. de pota*</u>	7.84	6.62	14.01	55.26
<u>Protiblend*</u>	4.90	14.54	8.45	68.77
<u>C.P.S. *</u>	4.80	6.79	0.23	66.66
<u>Pasta de Soya + fitasa*</u>	7.01	6.95	1.77	51.21
<u>Pasta de canola + fitasa*</u>	4.86	7.10	1.72	44.77

*Cada ingrediente fue analizado por triplicado.

Digestibilidad in vitro.

Digestibilidad ácida in vitro.

En esta prueba se observan resultados de la digestibilidad ácida de los diferentes ingredientes proteicos, se observan cuatro ingredientes que tienen un valor mayor al ingrediente de referencia (la hemoglobina), los cuales son Protiblend, Harina de pollo y Harina de ave y Harina de pota. Los demás ingredientes que se probaron tuvieron resultados menores a la hemoglobina, estos ingredientes son de origen vegetal, esto nos indica que *Centropomus undecimalis* es un carnívoro tope (Tabla 5)

Digestibilidad alcalina in vitro.

Estos resultados muestran que todos los ingredientes de prueba tuvieron valores menores al ingrediente de referencia (caseína de Hammerstein) tanto en ciegos pilóricos como intestino. La fuente de proteína Protiblend es la que tuvo el segundo mejor GH también en ambos órganos (Tabla 5)

Tabla 5. Digestibilidad *in vitro* de fuentes de proteína (de origen marino, terrestre y vegetal).

<u>Ingrediente</u>	<u>GH Estómago</u>	<u>GH Ciegos</u>	<u>GH Intestinos</u>
<u>Hemoglobina/Caseína</u>	0.40±0.00 ^b	16.84±0.00 ^a	16.84±0.00 ^a
<u>Pasta de soya</u>	0.25±0.43 ^b	6.29±0.63 ^{ef}	2.68±1.28 ^f
<u>P. de soya + fitasa</u>	0.02±0.04 ^b	6.66±0.99 ^{def}	4.02±0.32 ^{def}
<u>Canola</u>	0.29±0.19 ^b	8.73±1.12 ^{cde}	2.69±1.07 ^f
<u>Canola + fitasa</u>	0.10±0.11 ^b	10.62±4.00 ^{bc}	7.29±1.14 ^c
<u>Viten®</u>	0.191±0.07 ^b	0.178±0.083 ^f	0.238±0.11 ^f
<u>C.P.S.</u>	0.10±0.08 ^b	7.81±0.79 ^{cdef}	3.66±0.54 ^{ef}
<u>Glúten de maíz</u>	0.06±0.11 ^b	11.74±1.91 ^b	7.15±0.64 ^c
<u>Suero de leche</u>	0.58±1.01 ^b	9.36±2.65 ^{bcd}	3.39±2.18 ^{ef}
<u>Harina de pollo</u>	3.29±1.55 ^a	8.82±1.86 ^{bcd}	4.38±0.25 ^{de}
<u>H. de ave</u>	2.47±0.11 ^{ab}	10.02±0.51 ^{bc}	5.44±0.96 ^d
<u>Protiblend</u>	3.78±0.57 ^a	15.41±1.25 ^a	9.90±0.75 ^b
<u>Harina de pota</u>	0.78±0.15 ^b	5.46±1.56 ^f	2.38±0.84 ^f

El GH está representado en %. Los superíndices indican diferencias significativas (p<0.05).

EL GH total de las fuentes de proteína la que tuvo el mejor resultado fue la hemoglobina/caseína, las harinas de origen animal como Protiblend, harina de ave, h. de pollo, h. de pota obtuvieron los resultados un poco bajos y las harinas de origen vegetal presentaron el GH más bajo.. El GH total es obtenido de la suma de las 3 determinaciones (estómago, ciegos e intestinos); en el caso de la hemoglobina/caseína, es considerada como un valor de referencia de 100% de digestibilidad (Tabla6).

Tabla6. Grado de hidrólisis total y porcentaje de digestibilidad de fuentes de proteína (marino, terrestre y vegetal).

<u>Ingrediente</u>	<u>GH Total</u>	<u>%Digestibilidad</u>
<u>Hemoglobina/Caseina</u>	34.09±0.00 ^a	100
<u>Pasta de soya</u>	9.22±1.75 ^{de}	27.05
<u>P. de soya + fitasa</u>	10.70±0.64 ^{de}	31.4
<u>Canola</u>	11.71±0.77 ^{de}	34.34
<u>Canola + fitasa</u>	18.01±5.21 ^{cd}	52.83
<u>Viten ®</u>	0.61±0.03 ^f	1.79
<u>C.P.S.</u>	11.57±1.26 ^{cde}	33.94
<u>Glúten de maíz</u>	18.95±1.38 ^{cd}	55.58
<u>Suero de leche</u>	13.33±4.33 ^{cde}	39.12
<u>Harina de pollo</u>	16.49±3.33 ^{cd}	48.39
<u>H. de ave</u>	17.93±0.54 ^{cd}	52.6
<u>Protiblend</u>	29.09±1.47 ^b	85.35
<u>Harina de pota</u>	8.62±1.58 ^e	25.28

Los superíndices indican diferencias significativas (p<0.05)

En el análisis individual de los datos en la digestión ácida (estomago), no hay diferencias significativas (p>0.05) en cada una de las dietas, y en el caso de las alcalinas en los ciegos el mejor GH está representado en la Harina de pollo, seguido por Harina de pota, Harina de ave, Protiblend, Fórmula base, la que tuvo el menor GH fue VITEN® (Tabla7).

Tabla 7. Grado de hidrólisis ácido (estómago) y alcalino (ciegos e intestinos) de dietas utilizadas en juveniles de *Centropomus undecimalis*.

<u>Dieta</u>	<u>Estomago</u> <u>GH</u>	<u>Ciegos</u> <u>GH</u>	<u>Intestinos</u> <u>GH</u>
VITEN®	1.65±0.42 ^a	0.41±0.15 ^b	1.34±0.50 ^b
Harina de pollo	2.13±1.34 ^a	1.10±0.24 ^a	1.72±0.52 ^b
Formula base	0.87±0.55 ^a	0.86±0.39 ^{ab}	1.72±0.23 ^b
Harina de ave	1.78±0.98 ^a	0.80±0.45 ^{ab}	1.75±0.51 ^a
Harina de pota	2.31±1.68 ^a	0.55±0.21 ^{ab}	1.37±0.79 ^b
Protiblend	1.78±0.35 ^a	0.99±0.46 ^{ab}	1.72±0.19 ^b

Superíndices indican diferencias significativa (p<0.05).

En el análisis el GH total y el porcentaje de digestibilidad (Tabla8) se puede observar que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos

Tabla 8. Grado de hidrólisis y porcentaje de digestibilidad de la dietas probadas en juveniles de *Centropomus undecimalis*.

<u>Dieta</u>	<u>GH</u>	<u>%Digestibilidad</u>
VITEN®	3.40±0.65 ^a	66.42
Harina de pollo	4.95±0.52 ^a	96.64
Formula base	3.45±0.50 ^a	67.35
Harina de ave	4.33±0.56 ^a	84.56
Harina de pota	4.24±0.88 ^a	82.78
Protiblend	4.49±0.44 ^a	87.73

Superíndices indican diferencias significativas (p<0.05)

Análisis de aminoácidos totales.

Durante el proceso de digestión de las diferentes dietas, en el caso de la digestibilidad ácida, se detectó que hay diferencias significativas (p<0.05) entre las dietas, en los tres tiempos que se analizaron (0, 7 y 15 minutos). El caso de la dieta de referencia (H. de pescado) es la que presenta los valores más altos en los tres tiempos, después la harina de pollo y harina de ave. La dieta que contiene el gluten de trigo Francés VITEN®, es la que menor cantidad de aminoácidos liberados presento durante los tres tiempos que se analizaron (Tabla7).

Tabla 9. Aminoácidos liberados ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE en la fase ácida..

DIETA	0min	7min	15 min
Viten ®	0.15 \pm 0.12 ^c	0.05 \pm 0.14 ^c	0.42 \pm 0.12 ^c
Harina de pollo	0.81 \pm 0.14 ^b	1.05 \pm 0.04 ^{ab}	1.20 \pm 0.04 ^{ab}
Fórmula base	1.40 \pm 0.01 ^a	1.77 \pm 0.44 ^a	1.72 \pm 0.12 ^a
Harina de ave	0.94 \pm 0.10 ^b	1.11 \pm 0.12 ^{ab}	1.26 \pm 0.24 ^{ab}
Harina de pota	0.95 \pm 0.08 ^b	1.05 \pm 0.15 ^{bc}	1.07 \pm 0.36 ^{bc}
Protiblend	0.76 \pm 0.26 ^b	0.96 \pm 0.26 ^{bc}	1.03 \pm 0.29 ^{bc}

Las diferentes letras en superíndices muestran diferencia significativa (P<0.05)

En el caso de los ciegos las determinaciones muestran diferencias significativas ($p < 0.05$), siendo la dieta que contiene el gluten de trigo VITEN ® la que menor cantidad de aminoácidos libera durante toda la determinación. En cuanto a los intestinos en el tiempo 0 se logran observar diferencias significativas en los valores y en los otros dos tiempos ya no hay una diferencia en los valores de aminoácidos liberados. Las harinas de origen animal son las que presentan mayor cantidad de aminoácidos liberados tanto en la digestibilidad de ciegos como en los intestinos (Tabla10).

Tabla 10. Aminoácidos liberados ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE en la fase alcalina ciegos e intestinos.

DIETA	Ciegos			Intestinos		
	0	30	45	0	30	45
Viten ®	0.26 \pm 0.20 ^b	1.22 \pm 0.18 ^b	1.24 \pm 0.30 ^b	0.74 \pm 0.44 ^b	2.37 \pm 0.58 ^a	2.37 \pm 0.44 ^a
Harina de pollo	0.86 \pm 0.18 ^{ab}	1.84 \pm 0.00 ^{ab}	2.23 \pm 0.27 ^{ab}	1.45 \pm 0.46 ^{ab}	3.35 \pm 0.42 ^a	3.05 \pm 0.56 ^a
Fórmula base	0.23 \pm 0.12 ^{ab}	2.27 \pm 0.50 ^a	2.33 \pm 0.31 ^{ab}	2.20 \pm 0.22 ^a	2.93 \pm 0.38 ^a	3.26 \pm 0.14 ^a
Harina de ave	1.03 \pm 0.59 ^{ab}	2.57 \pm 0.65 ^a	2.85 \pm 0.90 ^a	1.39 \pm 0.36 ^{ab}	3.19 \pm 0.47 ^a	3.28 \pm 0.23 ^a
Harina de pota	1.45 \pm 0.33 ^a	2.48 \pm 0.31 ^a	2.49 \pm 0.36 ^{ab}	1.16 \pm 0.39 ^b	3.33 \pm 0.91 ^a	3.62 \pm 1.26 ^a
Protiblend	1.11 \pm 0.10 ^a	2.00 \pm 0.11 ^{ab}	1.97 \pm 0.28 ^{ab}	1.39 \pm 0.32 ^{ab}	3.19 \pm 0.08 ^a	3.28 \pm 0.54 ^a

Las diferentes letras en superíndices muestran la diferencia significativa (P<0.05).

Discusión.

Los métodos *in vitro* para determinar la digestibilidad han mostrado ser eficientes y de gran utilidad, en organismos marinos como el camarón (Ezquerro, 1997) y en peces (Grabner, 1985, Dimes y Haard, 1994, Tibbetts, 2011).

En el presente estudio se analizaron 11 diferentes fuentes de proteína (de origen animal marino, terrestre y vegetal). Se utilizaron en la fase ácida hemoglobina y en la fase alcalina la caseína, como fuente proteica estándar., los valores de GH obtenidos de estas fuentes estándar se usaron como valor de referencia (100% de digestibilidad).

Los resultados obtenidos de la actividad de las proteasas ácidas y alcalinas, muestran una gran actividad de estas en el estómago (ácidas), mientras que en ciegos pilóricos e intestinos (alcalinas) la actividad es menor, resultados similares a los reportados por Concha (2008). Esto es indicativo de que el robalo es un animal carnívoro tope y la hidrólisis más amplia es dada en el estómago, siendo la hidrólisis realizada en ciegos e intestinos una hidrólisis final, en estos órganos es donde se da la absorción de nutrientes, mayoritariamente en el intestino.

Para la digestibilidad *in vitro* de las diferentes fuentes alternas de proteína, en el caso de estómago, se observa que las harinas de origen animal marino (Protiblend) y animal terrestre (harina de ave y harina de pollo) presentaron los GH más altos, Protiblend al ser una mezcla de harinas de pescado y animal terrestre y estar diseñada para ser un sustituto de las harinas de pescado debe tener buena digestibilidad *in vitro* (Chong *et al* 2002, Alvarez-Gonzalez 2003, Frías-Quintana *et al*, 2010, Yasumaru *et al*, 2014), esto indica que la fuentes de proteínas estudiadas, representan una alternativa a la harina de pescado para poder elaborar dietas que cumplan con los requerimientos nutricionales de *Centropomus undecimalis*. La harina de ave y la harina de pollo mostraron una buena respuesta en la digestibilidad acida, al igual que la harina de pota.

En el caso de harinas de origen vegetal, todas tuvieron valores de G.H. menores al control (a hemoglobina) esto es indicativo de la naturaleza carnívora de esta especie. La pasta de soya presentó la menor digestibilidad, esto podría atribuirse a la presencia de factores anti nutricionales, los cuáles pueden inhibir la actividad de algunas proteasas (Øverland *et al.*, 2009)

Para la digestibilidad alcalina, se dividió en dos partes, la primera estuvo enfocada en los ciegos pilóricos y la segunda en intestinos, los resultados obtenidos en esta prueba muestran resultados diferentes a los obtenidos en digestibilidad ácida. La caseína en ambos casos presentó el mayor grado de hidrólisis, la única fuente de origen animal que tuvo un GH bajo fue Protiblend, en las harinas vegetales, la canola, canola + fitasa y gluten de maíz los resultados fueron mayores a las otras materias primas. En general se ha visto que las harinas de origen vegetal en su mayoría pueden llegar a presentar factores anti nutricionales, afectando con esto la actividad enzimática digestiva, por ello la detección de bajos valores en GH (Alarcón *et al.*, 2001).

En la suma de los GH ácidos y alcalinos, los ingredientes de referencia fueron los que obtuvieron el mayor porcentaje de digestibilidad, como era de esperarse, mientras que las harinas Protiblend, harina de ave y harina de pollo, los valores de GH fueron cercano al 100%, en el caso de las harinas de origen vegetal, el gluten de maíz y la canola adicionada con fitasa también mostraron un porcentaje de digestibilidad cercano al 100%.

Los valores de GH más elevados obtenidos por la hemoglobina/caseína (34.09%) son mayores a los obtenidos en estudios realizados en *Salmo gairdneri* y *Paralabrax maculatofasciatus*, donde se utilizó como control a la caseína, ya que los valores de GH fueron 25.5% y 13.34%, respectivamente (Dimes y Haard, 1994 b; Alvarez-Gonzalez, 2003), esto se debe a que al tener una mezcla de dos proteínas de origen animal, se favorece la actividad de las enzimas proteolíticas, tanto ácidas como alcalinas, ya que el efecto inhibitorio que pudiese tener la lactosa presente en la caseína, se ve disminuido. Para el caso de Protiblend es el que obtuvo el segundo valor más elevado de GH en este estudio (29.09%) estudios realizados en *Sparus aurata* (Alarcón, 2001) se detectaron

valores más elevados. Los valores de GH detectados son indicativos de la mayor capacidad de las enzimas presentes en los organismos de hidrolizar los ingredientes presentes en esta harina, la cual está diseñada especialmente para organismos acuáticos y terrestres. Las harinas de ave y pollo (17.93% y 16.49% de GH), son mayores a los reportados por Yasumaru *et al*(2014), al evaluar estos ingredientes en *Oncorhynchus mykiss*, *Rachycentron canadum* y *Oreochromis niloticus* obtuvieron valores de GH de 5-7%, 3.5-5.5% y 4-5%, respectivamente, en el caso de *Gadus morhua* el GH obtenido fue de 11.3% (Tibetts *et al*, 2011b). Lo cual indica la mayor capacidad de *Centropomus undecimalis*.

Para las harinas de origen vegetal los valores de GH obtenidos fueron los más bajos esto es debido a los factores anti nutricionales como el fitato (Silva *et al*, 2014), que presentan para el C.P.S., P. de soya, P de soya + fitasa (11.57, 9.22, 10.7% respectivamente). Gluten de maíz, canola + fitasa y canola (18.95, 18.01 y 11.71% respectivamente). En el caso de los ingredientes a los cuales se les adiciono la fitasa (canola y p. de soya) se logra observar un mejor GH a diferencia de los ingredientes solos. En cuanto al suero de leche (13.33%) la digestibilidad de este se ve afectada por el contenido alto lactosa y bajo de proteína.

Digestibilidad *in vitro* de las dietas.

En el análisis de la digestión acida *in vitro* usando extractos multi enzimáticos de *C. undecimalis*, no se encontró diferencia significativa entre cada una de las dietas en este estudio, esto indica que cualquiera de estos ingredientes es un buen candidato para ser incluido en una dieta para el robalo. Esto se debe a que la base de proteína en la dieta estaba dada por la harina de pescado .Sorensen *et al*,(2001), utilizando dietas al 0, 50 y 100% de harina de pescado y complementadas con harina de trigo, detectaron que la dieta con 50% h. de pescado y 50% harina de trigo presentaron los mejores resultados, en el caso de la dieta con gluten de trigo (Viten ®), sin embargo Tibetts *et al* (2011b)

obtuvieron el GH mas alto usando el gluten de trigo, y Alarcón *et al.* (2002) y Alvaréz-González (2003) al evaluar Protiblend obtuvieron altos valores de GH al mezclar el ingrediente con hidrolizados de pescado.

Capítulo 2: Digestibilidad aparente de diferentes fuentes de proteína en juveniles de *Centropomus undecimalis*.

Introducción.

La evaluación de la digestibilidad aparente de diferentes alimentos es importante para poder realizar una valoración lo más exacta posible de la calidad nutricional de los ingredientes empleados, con esto, realizar dietas lo más adecuadas posibles para nuestros organismos dependiendo de la etapa en que se encuentren.

La digestibilidad aparente es una medición de la asimilación de nutrientes de un organismo, proporciona una estimación muy práctica de la disponibilidad de los mismos (Lee y Lawrence, 1997, en, Smith, 2008). Puede determinarse de manera directa (gravimétrico) o de manera indirecta (marcador inerte).

El método de digestibilidad aparente se realizó, de acuerdo con (Cuzon et al., 1998), usando como marcador la zeolita, y se define como un método de análisis de las cenizas libres de carbono, ya que la zeolita proviene de la tierra de diatomeas, las cuales presentan sílice (Si) como componente de las tecas. Este método combina el lavado con ácido con la incineración de las muestras (para lo cual se utilizan crisoles y una mufla para poder llevar a 500°C la temperatura y garantizar la completa incineración de las muestras), tanto del alimento al cual se le incluirá una cantidad conocida del marcador, y las heces fecales, de las cuales también se obtiene el marcador recolectado.

Materiales y métodos.

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones de la UMDI-Sisal, los organismos que se utilizaron, son organismos nacidos en cautiverio a partir de desoves que se obtuvieron en el área de reproducción de la unidad, a partir de machos y hembras que se recolectaron del medio silvestre en las costas de Sisal, Yucatán.

La UMDI-Sisal, cuenta con un área experimental en la cual se presentan condiciones controladas de temperatura, salinidad y fotoperiodo para realizar los experimentos de digestibilidad aparente, de tal forma que se puedan controlar con precisión los factores ambientales.

Diseño experimental y dietas

Digestibilidad *in vivo*.

Para realizar el experimento de digestibilidad *in vivo* se empleó un diseño completamente aleatorio con 6 tratamientos y 3 réplicas/tratamiento. Estos tratamientos provienen de los resultados de la digestibilidad *in vitro* de las fuentes de proteína. , Los organismos fueron colocados en tanques de 80 L de capacidad. Se emplearon juveniles con un peso aproximado de 50 g provenientes del área de engorda de peces marinos. En relación a los aspectos de calidad de agua, fueron monitoreados diariamente la temperatura, oxígeno disuelto, pH, salinidad (múltiparametros de la marca Hach®, modelo HQ40d), y el amonio será medido una vez a la semana utilizando un kit comercial (Fig. 3).



Figura3. Sistema de tinas de 80 L para el experimento Digestibilidad aparente.

Se seleccionaron 180 juveniles de *Centropomus undecimalis* con un peso promedio de 44.67 g, se distribuyeron en 18 tinas al azar hasta tener 10 organismos por tina, se mantuvieron en un sistema cerrado de recirculación, con los parámetros controlados O.D. 5- 7 ppm, Temperatura $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$, pH 8.3 ± 1 , salinidad 36 ppm. Se les brinda alimento, artificial a razón de 3% del peso vivo (15 g por tina) de la biomasa en 3 tomas (a las 9:00, 13:00 y 18:00 horas) tomando como parámetro un trabajo realizado en esta especie por García-Galano *et al* (2003).

El 19 de Noviembre del 2013 se tomaron los datos biométricos de los organismos que previamente se había separado y acondicionado para iniciar el experimento de digestibilidad aparente. Al inicio del experimento se contaba con un promedio de peso de cada organismo de 58.2 g por organismo, se asignó a cada tina una dieta aleatoriamente, son 6 dietas con sus respectivas réplicas dando un total de 18. Los parámetros son monitoreados diariamente (O.D., Salinidad, temperatura, pH) y semanalmente (amonio). (Ver tabla11).

Tabla 11. Longitud en cm y peso en g de juveniles de *Centropomus undecimalis* (10 organismos por triplicado por tratamiento) al inicio del experimento (22-11-2013).

Dieta	L. T. (cm)	Peso (g)
Viten®	20.40±0.89	55.21±8.11
Harina de pollo	20.86±1.02	59.10±9.93
Fórmula base	20.56±0.75	56.6±7.57
Harina de ave	21.04±0.90	60.85±8.22
Harina de pota	20.95±0.90	58.85±8.99
Protiblend	20.77±0.80	58.99±7.29

Una vez que paso un periodo de adaptación, se comenzó el experimento. Se realizaron 6 dietas, una dieta de referencia y cinco dietas en donde probamos los ingredientes seleccionados (Tabla 12).

Tabla 12. Dietas empleadas para la determinación de la digestibilidad in vivo en juveniles de *C. undecimalis* (Expresado en gramos).

M. Primas	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6
Gluten de trigo Francés (Viten®)	30					
Harina de pollo		30				
Dieta de referencia						
Harina de ave				30		
Harina de pota					30	
Protiblend®						30
H. Anchoveta	49	49	70	49	49	49
H. de trigo	15.05	15.05	21.5	15.05	15.05	15.05
Aceite de pescado	2.1	2.1	3	2.1	2.1	2.1
Lecitina de soya	0.7	0.7	1	0.7	0.7	0.7
Premezcla de vitaminas⁷	1.4	1.4	2	1.4	1.4	1.4
Zeolita	1.05	1.05	1.5	1.05	1.05	1.05
C.M.C.	0.7	0.7	1	0.7	0.7	0.7
TOTAL	100	100	100	100	100	100
Análisis Proximal de dietas						

% Proteína cruda	63.75	61.74	55.33	59.62	60.36	60.23
% Lípidos	9.47	13.87	13.33	13.60	11.06	12.71
% Cenizas	9.13	10.13	12.96	12.29	12.78	14.67
% Humedad	5.21	5.03	5.27	4.88	6.15	5.09

1. Gluten de trigo francés. 2. Harina de pollo 3. Fórmula base 4. Harina de ave 5. Harina de pota 6. Protiblend. 7. Robimix C.M.C: Carboximetilcelulosa.

Elaboración de los alimentos balanceados (dietas experimentales)

Se realizó el tamizado de cada materia prima (250 μ). Durante esta operación se deben llevar todos los productos al mismo tamaño de partícula. Se pesaron los diferentes componentes previamente seleccionados en la formulación, se mezclaron los ingredientes secos por espacio de 10 a 15 minutos, se añadieron los aceites y mezclarlos durante 10-15 minutos, se gelatinizó el aglutinante si esta en forma seca. Esto se logra añadiendo al agua hirviendo la cantidad establecida del producto y revolviendo hasta obtener una masa pastosa. Se añadió el aglutinante y continuar mezclando. La masa obtenida por el proceso anterior se procesó por una máquina de moler, la cual fue pasada por un molino de rodillo sin fin (gusano) para extruirla y formar los pellets. Los pellets fueron almacenados a 4 °C hasta ser empleados.

Método de medición de las cenizas libres de carbono.

Para calcular el % de cenizas se hará de la siguiente manera:

Se tomó el peso de un crisol limpio y seco. Se pesaron 200 mg dieta- y 200 mg heces en un crisol (C+S) después se coloca el crisol con la muestra en una estufa a 105°C por 24 horas, pasado este tiempo se retira y se deja enfriar en un desecador a temperatura

ambiente, se calculó el porcentaje de materia seca. Después se vuelve a colocar el crisol con la muestra en una mufla y se incinera a 500°C por cuatro horas, se deja enfriar en un desecador a temperatura ambiente y calculamos el porcentaje de ceniza. Una vez terminado esto, la muestra incinerada es depositada en un matraz erlenmeyer, se adicionan 100mL de HCl 4N y se coloca el frasco en una plancha caliente y el contenido se pone a hervir durante 30 minutos (todo esto se realiza en una campana de extracción, por cada muestra). Pasando los 30 minutos el contenido de cada frasco es pasado por un papel filtro (Whatman N0. 40 libre de cenizas) mientras el contenido todavía está caliente a un frasco limpio. Las paredes y residuos del frasco son enjuagados con agua destilada caliente (85-100°C). Al terminar este procedimiento, el papel filtro vuelve a ser transferido al crisol original y se mete a la mufla, dejándose incinerar durante toda la noche. Al siguiente día se transfiere el crisol a un desecador, se deja enfriar a temperatura ambiente, se pesa y se anota el resultado.

Determinación de la digestibilidad aparente.

Para el análisis de la digestibilidad de materia seca y proteína se utilizó la técnica de C.I.A.(Ceniza insoluble en ácido) usando como marcador la zeolita.

Las formulas empleadas para determinar la digestibilidad aparente de la proteína (DAP) y de la materia seca (DAMS) y de la energía (DAE) son las siguientes:

- 1) $\%DAP = 100 \times (1 - (\% \text{ zeolita en el alimento} / \% \text{ zeolita en heces}) (\% \text{ proteína en heces} / \% \text{ proteína en el alimento}))$.
- 2) $\%DAMS = 100 \times (1 - (\% \text{ zeolita en la dieta} / \% \text{ zeolita en las heces}))$.
- 3) $\% DAE = 100 \times (1 - (\% \text{ zeolita en la dieta} / \% \text{ zeolita en las heces})(\text{energía en heces} / \text{energía en alimento}))$

Para determinar la digestibilidad aparente por ingrediente se utilizará la fórmula descrita en Suárez, (2007), este autor reporta que la zeolita puede ser usado para determinar la digestibilidad aparente con excelentes resultados en camarones.

$$\text{ADC ingrediente} = (\text{ADC dieta} - 0.7 * \text{ADC dieta ref.}) / 0.3$$

Para cuantificar la digestibilidad aparente de cada ingrediente y nutriente, los organismos permanecerán en ayuno durante 48 horas, antes de iniciar la alimentación, la cual se suministró en un 3% de la biomasa durante todo el periodo experimental. La recolección de la materia fecal se hará a partir del segundo día posterior al inicio de la alimentación con las dietas previamente diseñadas y elaboradas para este experimento.

Método de recolección de las heces.

Diariamente posterior a la alimentación, se daba un lapso de 30 minutos para que los organismos consumieran su alimento. Posteriormente el alimento no ingerido se retiraba mediante sifoneo el alimento restante, se ponía a secar y se pesaba; se revisaban cada una de las tinas. Durante todo el día, posterior a la alimentación en un lapso de una hora y media como máximo se revisaban cada una de las tinas buscando las heces, una vez que se observaban se retiraban (para evitar la lixiviación) mediante un sifón de 0.3 cm de diámetro, sobre un papel filtro, se enjuagaron con agua destilada (para eliminar el exceso de sales) y se almacenaron en recipientes de plástico a 60 °C, para su posterior análisis.

Análisis estadístico.

Dado que se empleó el diseño completamente aleatorio, se usó un análisis de varianza de una sola vía (ANDEVA) para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos, aplicando la prueba de rangos múltiples de Tuckey, para ponderar las diferencias entre los tratamientos. El nivel de significancia fue del 5%. El paquete utilizado fue STATISTICA 10.0.

Resultados.

Digestibilidad aparente.

El análisis estadístico llevado a cabo en las fuentes de proteína indicaron que no había diferencias significativas entre las dietas elaboradas. Partiendo de los resultados obtenidos en los análisis de GH, se diseñaron las dietas. Se seleccionaron 5 fuentes de proteína: (1) gluten de trigo francés VITEN® (de Roquette), (2) Protiblend de origen nacional (fuente de proteínas de origen marino y terrestre), esta proteína es una fuente para sustituir la harina de pescado en las dietas de organismos acuáticos; (3) harina de pota, está basado en aceite de calamar, solubles de pescado y harina de soya extruida texturizada; (4) harina de ave y (5) harina de pollo, esta proviene de partes completas de carcasas de pollo y una combinación completa de carne con o sin piel y/o hueso; la sexta dieta es una dieta de referencia de origen comercial (Malta-Cleyton) que usa como base proteica solubles de pescado y harina de soya extruida texturizada pescado. La dieta de referencia tiene como base de proteína la harina de pescado.

Se tomaron los datos biométricos (longitud total promedio y peso promedio) de los organismos de cada tratamiento al inicio, a la mitad del experimento y al final, en el análisis de los resultados no se encontraron diferencias significativas entre cada tratamiento (Tabla13).

Tabla 13. Peso en gramos, longitud total y % de supervivencia de juveniles de *C. undecimalis* al final del experimento n=180 organismos.

<u>Dieta</u>	<u>VITEN®</u>	<u>Harina de pollo</u>	<u>Formula base</u>	<u>Harina de ave</u>	<u>Harina de pota</u>	<u>Protiblend</u>
<u>Peso final</u>	66.16±14.14	71.27±19.56	71.78±16.91	77.86±17.38	75.08±15.75	76.87±15.83
<u>Longitud final</u>	21.73±1.26	22.19±1.74	22.04±1.39	22.69±1.50	22.44±1.41	22.50±1.35
<u>% de supervivencia</u>	100	100	100	100	100	100

CIA (ceniza insoluble en ácido).

En la tabla (tabla 14) se muestran los resultados obtenidos en el análisis de la digestibilidad in vivo de las dietas empleadas, la digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS) la harina de pollo fue la que tuvo el mejor resultado, Harina de ave, fórmula base, VITEN®, Protiblend tuvieron valores estadísticamente iguales y la Harina de pota fue la que tuvo el menor valor. Para la digestibilidad aparente de la proteína (DAP) tanto la fórmula de referencia como la Harina de ave tuvieron los valores más altos y estadísticamente iguales seguido de Harina de pollo, Protiblend y VITEN®, y por último la Harina de pota. En el caso de la digestibilidad del ingrediente (DI), presentaron valores estadísticamente similares ($p < 0.05$).

Tabla 14. DAMS, DAP y DI de las dietas empleadas \pm DE.

<u>DIETA</u>	<u>DAMS</u>	<u>DAP</u>	<u>DI</u>
<u>Viten®</u>	65.77 \pm 3.37 ^{ab}	89.87 \pm 1.71 ^{ab}	68.58 \pm 1.08 ^a
<u>Harina de pollo</u>	74.19 \pm 5.55 ^a	90.89 \pm 2.02 ^{ab}	69.59 \pm 1.68 ^a
<u>Fórmula base</u>	67.8 \pm 3.2 ^{ab}	91.63 \pm 0.50 ^a	70.34 \pm 0.95 ^a
<u>Harina de ave</u>	70.92 \pm 6.13 ^{ab}	92.93 \pm 1.5 ^a	71.64 \pm 2.02 ^a
<u>Harina de pota</u>	59.02 \pm 4.09 ^b	87.18 \pm 1.07 ^b	65.88 \pm 1.86 ^{ab}
<u>Protiblend</u>	63.94 \pm 5.29 ^{ab}	90.55 \pm 1.33 ^{ab}	69.25 \pm 1.90 ^a

Los superíndices indican diferencias significativas. ($p < 0.05$). D.A.M.S: Digestibilidad aparente de la materia seca, D.A.P: Digestibilidad aparente de la proteína y D.I: Digestibilidad del ingrediente.

Tabla 15. Correlación entre digestibilidad in vivo y digestibilidad in vitro.

<u>Dieta</u>	<u>in vitro</u>	<u>CDA</u>	<u>r²</u>
<u>VITEN®</u>	58.97 \pm 16.35	68.58 \pm 1.07	-1.00
<u>Harina de pollo</u>	85.81 \pm 10.95	69.59 \pm 1.68	0.05
<u>Formula base</u>	59.80 \pm 12.44	70.34 \pm 0.95	-0.41
<u>Harina de ave</u>	75.08 \pm 15.79	71.64 \pm 2.02	0.07
<u>Harina de pota</u>	73.50 \pm 16.97	65.88 \pm 1.85	0.89
<u>Protiblend</u>	77.90 \pm 3.24	69.25 \pm 1.89	-0.99

Discusión

En cuanto a la digestibilidad *in vivo* de las 6 dietas analizadas la DAP. se obtuvieron valores entre (87 y 92 %). Para el caso de la dieta con gluten de trigo francés (Viten ®) el valor de D.A.P. fue de 90% un valor alto en este estudio y consistente con lo obtenido por otros autores (Sugiura *et al*, 1998, Tibetts *et al*, 2006 y Booth *et al* 2013), donde se reportan valores para el gluten de trigo entre 95% al, casi 100%. Esto muestra que el gluten de trigo puede ser usado para sustituir parcialmente la fuente de proteínas para las dietas de *C. undecimalis*; sin embargo hay que cuidar las concentraciones de este ingredientes, para evitar así que se altere la palatabilidad del alimento.

Por otra parte los resultados obtenidos en el caso de las dietas con harina de ave y harina de pollo en cuanto a la digestibilidad de la proteína ambas presentaron valores muy altos 93 % y 91%, respectivamente., Se ha detectado que estas harinas pueden llegar a presentar valores más bajos. Hajen *et al.*,1993, Chong *et al* 2002, , Q.C. Zhou *et al* 2004, Tibetts *et al*, 2006).Los valores previamente reportados variaron desde un 67%(estos valores son considerados bajos) hasta un 91% (valores similares a los detectados en este estudio).,El por qué se encuentran resultados tan distintos se debe principalmente a que la composición proximal de estos productos es altamente variable y está dada por diferentes factores como es la frescura del producto, tipo de proceso y como es almacenado.

Considerando lo anterior la dieta de referencia compuesta de harina de pescado indica una muy buena DAP (91.63%), por lo que este resultado es consistente con los estudios realizados en *Oncorhynchus tshawytscha*, *Oncorhynchus kisutch*, *Oncorhynchus mykiss*, lobina, *Gadus morhua*, *Argyrosomus japonicus*. (Hajen *et al*, 1993, Sullivan *et al*, 1995., Sugiura *et al*, 1998; Tibetts *et al.*, 2006; Booth *et al* 2013) quienes encontraron valores de DAP de 83%, 88. %, 95%, 95%, 92% y 96% respectivamente. Una situación similar se vio en la dieta con Protiblend en el cual la DAP fue de 91%, lo cual es comparable con un estudio realizado en *O. Niloticus*, donde se obtuvo un valor de DAP de 95% (Davies, 2011). Estas dietas están compuestas de fuentes de proteína, que son muy digeribles por el organismo muestran un buen desempeño. En el caso de la dieta de harina de papa es la

que obtuvo el valor de DAP mas bajo 87%, resultado similar al obtenido en un estudio realizado en *Sparus aurata* (Lupatsch *et al.*, 1997).

Por otra parte, el análisis de los aminoácidos liberados totales (AALT), en el caso de la digestibilidad ácida el valor más alto estuvo representado por la dieta de referencia (h. de pescado) lo cual es similar a los estudios realizados en *Paralabrax maculatofasciatus*, *Centropomus undecimalis* y *Atractosteus tropicus*, cuando fueron alimentados con dietas suplementadas con hidrolizados los valores de AALT resultaron más, atribuido a que la acción de las enzimas que hidrolizan (exopeptidasas, aminopeptidasas y carboxipeptidasas) se ve afectada, debido a que los hidrolizados poseen una gran cantidad de aminoácidos liberados, pudiendo afectar el sitio activo de la enzima, disminuyendo su eficacia bajos(Alvarez-Gonzalez, 2003, Concha, 2008; Frías, 2009). Para la digestibilidad alcalina en el caso de ciegos el h. de ave demostró mayor liberación de aminoácidos y por último la liberación de aminoácidos en intestinos no tuvo diferencia significativa entre las 6 dietas analizadas. La cantidad de aminoácidos liberados en la hidrólisis alcalina es mayor a la de la hidrólisis ácida, esto indica según Moyano *et al.* (1998), que en el estómago la hidrólisis proteica es en donde tiene mayor importancia, provocando una mayor liberación de péptidos, los cuales son degradados finalmente a su paso a través de los ciegos e intestinos.

Discusión general.

Las pruebas *in vitro* para la determinación de la digestibilidad de diferentes fuentes de proteína es una herramienta muy valiosa y altamente utilizada en diferentes especies animales. El GH de las fuentes de proteína de origen animal que fueron analizadas en la primera parte del presente estudio, indicando que tienen alto grado de digestibilidad y son candidatas para ser usadas como una alternativa total o parcial en el reemplazo de la harina de pescado.

Por su parte, las harinas de origen vegetal aunque resultaron con bajos valores de GH, no pueden ser descartadas en su totalidad, ya que se les puede dar un tratamiento adecuado para eliminar los factores anti nutricionales, como es el tratamiento con calor, por lo que en algunos casos como la pasta de soya, pasta de canola y concentrado proteico de soya pueden ser utilizadas como fuentes complementarios de proteínas para especies carnívoras.

El análisis *in vitro* de las 6 dietas experimentales muestran una digestibilidad similar (estadísticamente) en todos los casos, en estudios de digestibilidad *in vitro* realizados por Alvarez-Gonzalez, 2003; Concha, 2008, Frías-Quintana, 2009, Tibetts, 2011, Da Silva, 2014, en los cuales probaron diferentes fuentes alternas de proteína (animal y vegetal) y obtuvieron resultados positivos. Con estos resultados tenemos un panorama general de que estos ingredientes pueden ser utilizados para poder realizar dietas para *C. undecimalis*.

Para la segunda parte de este trabajo, se evaluó *in vivo* la digestibilidad de proteína, mostrando que los resultados fueron más altos en las diferentes dietas evaluadas, indicándonos que cualquiera de los ingredientes seleccionados son buenos candidatos para la sustitución de la harina de pescado

Conclusión general.

La determinación de la digestibilidad *in vitro* de las fuentes de proteína a través del método de pH STAT, nos ayudó a hacer una pre-selección de 5 fuentes de proteína para realizar dietas experimentales. Una vez realizadas dichas dietas también se determinó su GH. Los resultados obtenidos en esta determinación no indicaron diferencias significativas para las dietas analizadas, esto nos indicó que estas fuentes pueden ser utilizadas en la elaboración de alimentos balanceados para *C. undecimalis*.

En el caso de la digestibilidad *in vivo*, Los resultados obtenidos de las dietas experimentales mostraron resultados distintos siendo la dieta que contiene la harina de papa la que presentó el valor más bajo en cuanto a digestibilidad del ingrediente (DI), el resto de las dietas tuvieron resultados estadísticamente iguales. Concluimos que en este estudio nos mostró que las dietas experimentales que se analizaron tienen un comportamiento similar en los organismos. En cuanto a la digestibilidad de la proteína (DAP), la harina de pollo seguida de la harina de ave obtuvieron los valores más altos (96 y 90% respectivamente, seguidas de la dieta que contenía protiblend y la dieta con gluten de trigo francés (88.9 y 86.6% respectivamente), para el caso de la harina de papa fue la fuente de proteína analizada con el valor más bajo en este estudio (77.6%). Podemos concluir basados en los resultados obtenidos que las fuentes de proteína alterna más recomendables para inclusión en dietas comerciales de robalo blanco serían las que contengan harina de pollo y harina de ave, seguidas por protiblend y gluten de trigo, no sería tan recomendable, de acuerdo a nuestros resultados la harina de papa. Es recomendable hacer estudios más extensos en nutrición del robalo blanco.

Anexo I.

Manejo de reproductores.

Los reproductores de robalo fueron alimentados con alimento comercial 60% (Fishbreed[®], INVE Aquaculture, INC.) y 40% de carne de pescado aceitosa, se les daba el 5% del peso vivo. Aunado a esto se daban suplementos vitamínicos (Equate[®] adultmultivitamin) y ácidos grasos omega 3 (180 mg DHA and 270 mgEPA, Member's Mark[®]) estos se mezclaban en el alimento dos veces a la semana.

Se mantuvieron por 5 años las hembras hasta alcanzar un peso de 5048 ± 350 g se les administro sGnRHa (Ovaplant[®], SyndelLaboratoriesLtd., Vancouver, Canadá), a los machos con un peso de 4775 ± 504 g y con una motilidad espermática de al menos 80% se les dio una sola dosis de $83 \pm 6 \mu\text{g kg}^{-1}$ sGnRHa. Se sembraron los peces en proporción 1 hembra por tres machos en tanques de 3 m^3 una temperatura de $27\text{-}29^\circ\text{C}$ y una salinidad de 37-38 ppm. En las siguientes tablas que fueron tomadas de Ibarra-Castro *et al*, 2011, se muestra protocolo de manejo de la calidad del agua para los huevos y larvas (tabla 1) y alimentación del robalo blanco durante el estadio larval y juvenil (tabla 2).

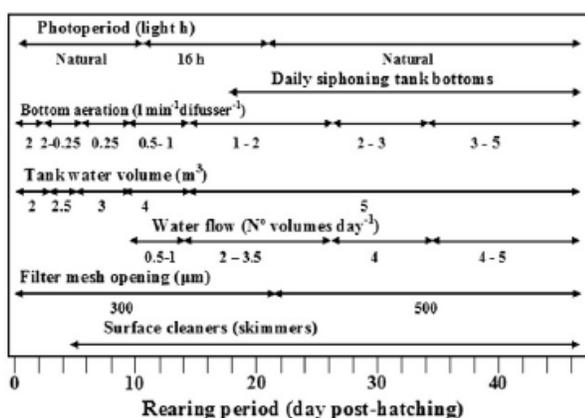


Tabla 1. Protocolo de manejo para la calidad del agua
Tomado de Ibarra-Castro *et al*, 2011.

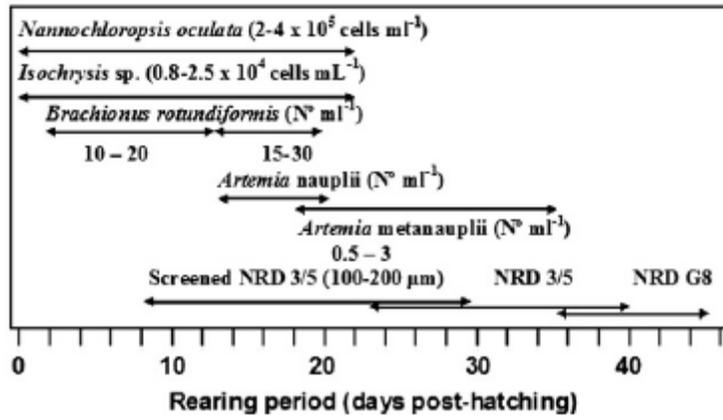


Tabla 2. Protocolo de alimentación de alevines y Juveniles de *Centropomus undecimalis*. (Tomado de Ibarra-Castro *et al*, 2011)

Bibliografía.

- Aguiar, A., Ranzani-Paiva, M., Leite, M., Faustino, L. and Egami, M., 2012. Hematological parameters and phagocytic activity in fat snook (*Centropomus paralellus*) bred in captivity. *Fish & shellfish immunology*. 33; 953-961.
- Álvarez-González, C. A. 2003. Actividad Enzimática Digestiva y Evaluación de dietas para el destete de Larvas de la Cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae). Tesis Doctoral, IPN-CICIMAR. 180 p.
- Boonyaratpalin, M. 1998. Replacement of fish meal with various types of soybean products in diets for the Asian sea bass, *Lates calcarifer*. *Aquaculture* 161. 67–78
- Borquez, A., Cerqueira, V. 1998. Feeding behavior in juvenile snook, *Centropomus undecimalis*. Individual effect of some chemical substances. *Aquaculture* 169: 25-35.
- Caballero-Chávez, V. 2011. Reproducción y fecundidad en el robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) en el suroeste de Campeche. Informe de investigación (documento interno) CRIP- Ciudad del Carmen. Instituto Nacional de Pesca. *Ciencia pesquera*. 19:35-45.
- Cerqueira, V., Tsuzuki, M. 2009. A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. *Fishphysiolbiochem*, 35:17-28.
- Chávez, H. 1963. Contribución al conocimiento de la biología de los robalos, chucumite y constantino (*Centropomus* spp.) del estado de Veracruz, *Pisc. Centrop. Ciencia* 22: 141-161.

- Chong, A., R. Hashim and A. Bin Ali. 2002. Inhibition of protease activities in *Discus Symphysodon spp.* By three plants meals. *Aquaculture* 10: 433-441.
- Concha, B. 2008. Evaluación de la capacidad digestiva de juveniles del robalo blanco *Centropomus undecimalis* sobre diferentes ingredientes proteicos. Tesis de maestría, Universidad Católica del Norte, Chile.
- Córdova-Murueta J. H. and F. L. García-Carreño. 2002. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture* 210: 371-384.
- Cuzon, G., Guillaume, J., Cahu, C., 1998. Composition, preparation and utilization of feeds for crustacean. *Aquaculture* 124, 253-267.
- Dimes, L. E. and N. F. Haard. 1994. Estimation of protein digestibility: I. Development of an in vitro method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmogairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 108A, 2-3: 349-362.
- Dimes, L. E., N. F. Haard, F. M. Dong, B. A. Rasco, I. P. Forster, W. T. Fairgrieve, R. Arndt, R. W. Hardy, F. T. Barrows and D. T. Higgs. 1994. Estimation of protein digestibility. II. In vitro assay of protein in salmonid feeds. *Comp. Biochem. Physiol.* 108A: 363-370.
- Dimes, L. E., F. L. García-Carreño and N. F. Haard. 1994. Estimation of protein digestibility. III. Studies on digestive enzyme from the pyloric ceca of rainbow trout and salmon. *Comp. Biochem. Physiol.* 109: 349-360.
- Ezquerro, J., García-Carreño, F., Civera, R., 1997. pH stat method to predict protein digestibility in White shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*. 157: 251-262.

- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2012.State of World Aquaculture 2008.Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s.pdf> acceso el 15-10-2012, 13:21 hrs.
- Farrel, A., Stevens, E., Cech, J., Richards, J. Encyclopedia of fish physiology from genome to environment. Elsevier.
- Frías-Quintana, CA Álvarez-González CA. And G. Márquez-Couturier, (2010).Design of micro diets for the larviculture of tropical gar *Atractosteus tropicus*, Gill (1863). *Univ. y Ciencia* (26) 265:282.
- Fundamentos y técnicas de análisis de alimentos, 2007-2008. Laboratorio de Alimentos I. Departamento de alimentos y biotecnología, Facultad de Química UNAM.
- García-Carreño, F. L., A. N. del Toro and M. Ezquerra. 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.
- Gracia-Galano, T., Pérez, J., Gaxiola, G., Sánchez, A. 2003.Effect of feeding frequency of food intake, gastric evacuation and growth in juvenile snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). *Rev. Invest. Mar.* 24(2): 145-154.
- Grabner, M. and R. Hofer. 1985. The digestibility of the proteins of broad bean (*Vicia faba*) and soya bean (*Glycine max*) under in vitro conditions simulating the alimentary tracts of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 48:111
- Gracia-López, V., García-Galano, T., Gaxiola-Cortés, G., Pacheco-Campos, J.(2003). Efecto del nivel de proteína en la dieta y alimentos comerciales sobre el crecimiento y

la alimentación en juveniles del robalo blanco, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792). Ciencias Marinas 29(4B): 585–594

- Honzaryk, A. and Cerqueira, V. Adaptation of fat snook *Centropomus parallelus* (Poesy) larvae to artificial diets.
- Instituto de Biología. "*Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) - IBUNAM:CNPE:PE510". UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2006-03-16. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2012-9-7. Disponible en: <http://unibio.unam.mx/collectinos/specimens/urn/IBUNAM:CNPE:PE510>
- Izquierdo, P., Torres, G., Allara, M., Marques, T., Barboza, Y., Sanchez, E. 2001. Análisis proximal, contenido de aminoácidos esenciales y relación calcio/fosforo, en algunas especies de pescado. Revista científica, FCV-LUZ. 11:95-100.
- Katersky, R., Carter, C. 2007. High growth efficiency occurs over a wide temperature range for juvenile barramundi *Latescalcarifer* fed a balanced diet. Aquaculture, 272: 444-450.
- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. J. Gen. Physiol. 30: 291-310.
- Lee, S.M. 2002. Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for juvenile and grower rockfish (*Sebasteschlegelii*). Aquaculture. 207: 79-95.
- Lehninger, A. L. 1984. Bioquímica. 2ª ed. Omega. Barcelona, España. 1198 pp.
- Moyano, F., 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.

- Perera, M., Mendoza, M., Paramo, R 2008. Dinámica reproductiva y poblacional del robalo, *Centropomus undecimalis* (perciformes: centropomidae), en barra de san Pedro, Centla, México. Universidad y ciencia. 24:49-60.
- Pope, K., Blankinship, D., Fisher, M. Patiño, R. 2006. Status of the common snook (*Centropomus undecimalis*) in Texas. Nebraska cooperative fish & wildlife. Research unit. Staff publications.94.
- Reyes, R., Ramos, D., Fraga, I., Galindo, J., Ortega, N. 2004. Creación de un banco de progenitores de Robalo blanco *Centropomus undecimalis*, Bloch, evaluación de alimentos artificiales. Centro de investigaciones pesqueras. 814-820.
- Shimada, J., Nogueira, L., Gomes, V., Machado, J.2010. Lipidic and proteic absorption in digestive tract of tropical fat snook (*Centropomus parallelus*, POEY 1860).Journal of experimental marine biology and ecology.386,39-44
- Smith, D.M., Tabrett, S.J., 2008. Método desarrollado por el CSIRO para medir digestibilidad *in vivo* en camarón. Editores: L. Elizabeth Cruz Suarez, Humberto Villarreal Colmenares, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos y Denis Ricque Marie. Manual de metodologías de digestibilidad *in vitro* e *in vivo* para ingredientes y dietas para camarón. Universidad Autónoma de Nuevo León, Mty, N.L., México. 180:191.
- Sorensen, M., Ljokjel, K., Storebakken, T.,Sheaer, K., Skrede, A. 2002. Apparent digestibility of protein, amino acids and energy in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a fish meal based diet extruded at different temperatures. Aquaculture 211: 215-225.

- Taylor R. G., J. A. Whittington and D. E. Haymans.2001.Catch-and-release mortality rates of common snook in Florida. North American Journal of Fisheries Management 21: 70-75.
- Tibbetts, S.M., Milley, J.E., Ross, N.W., Verreth, J.A.J., Lall, S.P., 2011. In vitro pH-Stat protein hydrolysis of feed ingredients for Atlantic cod, (*Gadus morhua*).Development of the method. Aquaculture. 319: 398-406.
- Tringali, D. M. and T. M. Bert. 1996. The genetic stock structure of common snook (*Centropomus undecimalis*), Can. J. Fish.Aquat.Sci. 53: 974-984.
- Tringali, M., Bert, T., Seyoum, S., Bermingham, E., Bartolacci, D.1999.Molecular phylogenesis and ecological diversification of the transisthmian fish genus *Centropomus* (Perciformes: Centropomidae).Molecular phylogenesis and evolution, 13:193-207.
- Tucker,J. 1987. Snook and tarpon culture and preliminary evaluation for commercial farming. Prog Fish Culturist.49: 49-57.
- Tsuzuki, M., Sugai, J., Maciel, C., Francisco, C., Cerqueira, V.2007. Survival, growth and digestive enzyme activity of juveniles of the fat snook (*Centropomus parallelus*) reared at different salinities. Aquaculture, 271:319-325.
- UNESCO . 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Intergovernmental Oceanographic Commission. Manual and guides, 12, Paris.
- Vidal-López, J., Álvarez-González, C., Contreras-Sánchez, W., 2012. Feminización de juveniles de *Centropomus undecimalis* (Bloch 1792) utilizando 17 β-estradiol. Rev. Mar. 4: 83-93
- Wainwright, P., Huskey, S., Turingan, R., Carrol, A.2006 Ontogeny of suction feeding capacity in snook, *Centropomus undecimalis*.305: 246-252.

- Yasumaru, F., Lemos D. 2014 Species specific *in vitro* protein digestion (pH-stat) for fish: method development and application for juvenile rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*), cobia (*Rachycentron canadum*), and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 426-427, 74:84.

- Zarza-Meza, E., Berruecos-Villalobos, J., Vásquez-Peláez, C., Álvarez-Torres, P. 2006. Cultivo experimental de robalo *Centropomus undecimalis* y chucumite *Centropomus parallelus* (perciformes: *Centropomidae*) en estanques rústicos de tierra. *Ciencias Marinas*, 32.

- Zhou, Q., Tan, B., Mai, K., Liu, Y. 2004. Apparent digestibility o selected feed ingredients for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*. 241: 441-451.