



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
UNIDAD ACADÉMICA SISAL
(BIOLOGÍA MARINA)**

Evaluación de la digestibilidad *in vitro* y aparente en distintas fuentes de proteína en juveniles de pargo canané (*Ocyurus chrysurus*).

TESIS

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

PRESENTA:

ALVARO FABRICIO BARRETO ALTAMIRANO

TUTOR:

**DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS
FACULTAD DE CIENCIAS-UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

**DR. LUIS HÉCTOR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ
F.E.S. IZTACALA-UNAM**

**DR. CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ GONZÁLEZ
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**DR. JESÚS TRINIDAD PONCE PALAFOX
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**DRA. CRISANTEMA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

MÉXICO, D.F. ENERO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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) 56-22-5803, 5829, 5990 y 5991

Correo electrónico: posgrado@mar.icmyl.unam.mx

http://www.unam.mx/ciencias_mar_posgrado



Evaluación de la digestibilidad *in vitro* y aparente en distintas fuentes de proteína en juveniles de pargo canané (*Ocyurus chrysurus*).

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

ALVARO FABRICIO BARRETO ALTAMIRANO

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS

COMITÉ TUTORAL: DR. LUIS HÉCTOR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

DR. CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ GONZÁLEZ

DR. JESÚS TRINIDAD PONCE PALAFOX

DRA. CRISANTEMA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ

ASESOR EXTERNO DR. ADOLFO SANCHEZ ZAMORA



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

Agradecimiento.

Agradezco al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la Facultad de Ciencias (UMDI Sisal, UNAM), lugar donde lleve a cabo todos mis estudios y experimentos de posgrado, con el apoyo financiero CONACyT 379247, bajo la dirección de la Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés.

Al apoyo de la Fundación Heinrich Böll con el Programa de Becas Sur Place.

A mi directora de tesis, la Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés por su apoyo y comprensión.

A la empresa IMPESMAR II por proporcionar los organismos para el experimento de digestibilidad *in vitro*.

Al profesor Adolfo Sanchez por proporcionar los organismos del experimento de digestibilidad aparente.

A mi mamá Lesbia Altamirano, papá Domingo Barreto e hijo Alvaro Daniel Barreto M., los quiero mucho.

Un infinito agradecimiento a Dr. Evenor Martínez por su apoyo para que realizara mi maestría.

Un profundo agradecimiento a la familia Flores Puerto.

A las personas que fueron fundamentales en la realización de este trabajo, la M. en C. Lluvia Korinthya López Aguiar, por su apoyo en los análisis químicos proximales, la Bióloga Marina Elisa Chan Vivas, por sus asesorías en el laboratorio y M. en C. Iratzio Lemuz por su asesoría en el manejo del pH-Stat. Al M. en C. Jaime Suarez Bautista, por el apoyo brindado en el manejo de cultivo de pargos canané y al Dr. Juan Carlos Maldonado

6.8.- Diseño experimental y dietas.....	17
6.9.- Elaboración de los alimentos balanceados.....	17
6.10.- Digestibilidad aparente.	18
6.11.- Análisis estadístico.	19
7.- Resultados	19
7.1 Digestibilidad <i>in vitro</i>	19
7.2 Digestibilidad aparente	21
8.- Discusión.....	23
8.1 Digestibilidad <i>in vitro</i>	23
8.2 Digestibilidad aparente.	25
9.- Conclusiones.....	28
10. - Referencias.	29
11.- Anexos	42

Índice de tablas.

Tabla 1. Digestibilidad <i>in vitro</i> de harina de pescado, canola y ave en peces teleósteos.....	9
Tabla 2. Digestibilidad aparente de harina de pescado, canola y ave en peces teleósteos.....	11
Tabla 3. Composición de ingredientes de las dietas de referencia y prueba.....	19
Tabla 4. Composición proximal (g/ 100g) de los ingredientes de prueba para la digestibilidad <i>in vitro</i> del pargo canané <i>Ocyurus chrysurus</i> . (Promedio \pm DS).....	22
Tabla 5. Grado de Hidrólisis proteica de estómago, ciego pilórico e intestino de los distintos ingredientes probados para el pargo canané mediante la técnica de pH-Stat.....	23
Tabla 6. Grado de Hidrólisis total y porcentaje de digestibilidad de las distintas fuentes de proteína usando extractos multienzimáticos del pargo canané.....	23
Tabla 7. Composición proximal (g / 100g en base seca) de la dieta de referencia y prueba para el pargo canané <i>Ocyurus chrysurus</i> . (Promedio \pm DS)	24
Tabla 8. Coeficientes de digestibilidad aparente (ADC %) de materia seca, proteína y energía de los distintos ingredientes de prueba.....	25
Tabla 9. Contenido total y digestible de materia seca y proteína de las fuentes de proteína utilizadas para el pargo canané <i>Ocyurus chrysurus</i>	25

Índice de figuras.

Figura. 1. Distribución geográfica del pargo canané.....	2
--	---

Resumen

Se determinó la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* de distintas fuentes de proteína para el pargo canané *Ocyurus chrysurus*. Los ingredientes evaluados fueron la harina de pescado (HP), harina de ave food grade (HAVF), harina de ave súper (HAS), protiblend (PROT), pasta de canola (PCM), pasta de soya (PS), gluten de trigo francés (GTF). En la digestibilidad *in vitro* se utilizó extractos enzimáticos del sistema digestivo y se midió su grado de hidrólisis con la técnica de pH-Stat y en *in vivo* se determinó los coeficientes de digestibilidad aparente de materia seca (DAMS), proteína cruda (DAP) y energía (DAE). Se utilizó una dieta de referencia que fue mezclada con los ingredientes de prueba en una proporción 70:30 para obtener las dietas de prueba, y la zeolita se utilizó como marcador inerte. Se alimentan pargos canané con un peso inicial de 30 g con las dietas de referencia y prueba, las heces fueron recolectadas por medio de sifoneo. En la digestibilidad *in vitro* se determinó que el grado de hidrólisis total de las fuentes de proteína animal terrestre fueron las más altas con 8 % - 8.8 %; la HP, 8.29%; PROT, 5.09 %; las fuentes vegetales fueron las más bajas con 2.24 % - 4.51 %, siendo la PCM con mayor grado de hidrólisis. En la digestibilidad *in vivo* la DAMS, DAP y DAE estuvo entre 54.9 % - 65.11%, 69.6 % - 85.7 %, 77.1 % - 79.6 % para fuentes de proteína animal terrestre, respectivamente, la HP con 66.2%, 90.6%, 84.6%, respectivamente, la PCM, 64%, 92.9%, 70.3%, respectivamente, el PROT, 36%, 69.1%, 59.7%, respectivamente. En base a la información de digestibilidad *in vitro* e *in vivo* la HAVF y PCM son ingredientes que deberían ser incluidos para elaborar una dieta nutricionalmente balanceada para el pargo canané.

Abstract

The *in vitro* and *in vivo* of different sources of protein for snapper canané *Ocyurus chrysurus* digestibility is determined. The ingredients evaluated were fishmeal (HP), poultry meal food grade (HAVF), poultry meal “super” (HAS), protiblend (PROT), canola (PCM), soybean meal (PS), gluten French wheat (GTF). enzymatic extracts of the digestive system was used in the *in vitro* digestibility and degree of hydrolysis was measured by the technique of pH-Stat and *in vivo* apparent digestibility coefficients of dry matter (DAMS), crude protein (DAP), and energy (DAE) was determined, reference diet was mixed with test ingredients in a 70:30 ratio for the test diets used, and zeolite was used as an inert marker. Canané snappers feed with an initial weight of 30 g with reference and test diets, feces were collected by siphoning. *In vitro* digestibility it was determined that the degree of total hydrolysis of animal protein sources terrestrial were highest with 8% - 8.8%; HP, 8.29%; PROT, 5.09%; plant sources were the lowest with 2.24% - 4.51%, the PCM with a higher degree of hydrolysis. Digestibility *in vivo* DAMS, DAP and DAE was between 54.9% - 65.11%, 69.6% - 85.7% 77.1% - 79.6% to sources of terrestrial animal protein, respectively, the HP with 66.2%, 90.6%, 84.6% respectively, the PCM, 64%, 92.9%, 70.3%, respectively PROT, 36%, 69.1%, 59.7% respectively. Based on the information *in vitro* and *in vivo* digestibility HAVF and PCM are the ingredients that should be included to produce a nutritionally balanced diet for canané snapper.

1.-Introducción.

La pesca y la acuicultura son parte esencial del quehacer económico y social de México; la acuicultura representa una alternativa real para ampliar la oferta alimentaria, generación de divisas y crear fuentes permanentes de empleo, estimulando el desarrollo regional. El cultivo de peces marinos ha tenido un crecimiento anual del 7.6% desde 1980, representando una producción de 5.6 millones de toneladas para el 2012 con un valor aproximado de 23.5 billones de dólares, esto es debido a que la mayoría de las especies cultivadas son carnívoras y tienen un precio de mercado elevado (FAO, 2014).

La producción de especies carnívoras, genera una alta dependencia en las producciones pesqueras porque son las principales fuentes de nutrientes como la harina y aceite de pescado (Tacon y Metian, 2008; Aubin *et al.*, 2009). La producción total pesquera en las últimas décadas ha tenido poco crecimiento generando un aumento en el precio de la harina de pescado, por este motivo en las últimas décadas se ha buscado fuentes alternativas de proteína para su sustitución (FAO, 2014).

El primer paso para evaluar el potencial uso de un ingrediente para una dieta es la medición de su digestibilidad (Cho *et al.*, 1982; Allan *et al.*, 2000; Glencross *et al.*, 2007), para la formulación de dietas que permitan un crecimiento adecuado al proveer una apropiada cantidad de nutrientes, por esta razón algunos estudios están dirigidos a la medición de la digestibilidad de la proteína y energía (Alarcón *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2015).

Los pargos son depredadores activos y todas las especies de esta familia son explotadas comercialmente debido a que su carne tiene un excelente gusto (Fischer *et al.*, 1995). Recientemente, se ha incrementado el interés del cultivo pargo canané *Ocyurus chrysurus* en las costas de la Península de Yucatán y es de vital importancia el desarrollo de dietas que promuevan un crecimiento adecuado, como un primer paso para la formulación de una dieta con una baja dependencia de la harina de pescado, se evaluó diferentes fuentes de proteína

disponibles en la región, como son fuentes de proteína de animales terrestres, por ejemplo harina de ave, o fuentes de proteína vegetal como harina de soya, canola y gluten de trigo. Información sobre digestibilidad de estas fuentes de proteína no se encuentran disponibles para el pargo canané.

El principal objetivo de esta investigación es determinar la digestibilidad *in vitro* y aparente de fuentes de proteína animal terrestre y vegetal que tengan un uso potencial como ingredientes para una dieta del pargo canané.

2.- Antecedentes.

2.1.- Aspectos generales de *Ocyurus chrysurus*.

2.1.1.- Distribución geográfica.

Se extiende hacia el norte desde la costa de Massachussetts y hacia el sur en el sureste de Brasil. Es común encontrarlo en las Bahamas y a través del Caribe (Allen, 1985).



Fig. 1. Distribución geográfica del pargo canané (Allen, 1985).

2.1.2.- Clasificación taxonómica.

La especie se clasifica taxonómicamente (Claro y Parenti, 2001).

Reino: Animalia

Filum: Chordata

Clase: Actinopterygii

Subclase: Neopterygii

Infraclase: Teleostei

Superorden: Acanthopterygii

Orden: Perciformes

Suborden: Percoidei

Familia: Lutjanidae

Género: *Ocyurus*

Especie: *chrysurus*

2.1.3.- Hábitat de *O. chrysurus*.

Se determinó que *O. chrysurus* en su etapa adulta se encuentra principalmente en los arrecifes de coral y los juveniles se distribuyen entre los manglares y pastos marinos (Cocheret *et al.*, 2002). Posiblemente la preferencia de organismos juveniles en manglares sea porque las raíces de estos sirven como refugios, al poder ocultarse de sus depredadores (Cocheret *et al.*, 2004).

2.1.4.- Reproducción y maduración de *O. chrysurus*.

El pargo canané es una especie gonocorista, en el Banco de Campeche y costas de Yucatán se ha encontrado una proporción sexual de 1 hembra por 1.2 machos con épocas de desove en Abril, Junio y Octubre. Los organismos sexualmente maduros se encontraron de talla mínima de 14 cm. (Tréjo *et al.*, 2011). Turano *et al.*, 2000, reportó que la maduración sexual de *O. chrysurus* en condiciones controladas se logra con organismos de 25 cm de longitud furcal o con dos años de edad con 82,000 huevos por desove en un periodo de 10 días con 97% de éxito en la fertilización.

2.1.5.- Nutrición y alimentación de *O. chrysurus*.

La alimentación del *O. chrysurus* en su medio natural se compone principalmente de organismos zooplanctónicos, detritus, poliquetos, crustáceos y peces (Randall, 1967), en las costas de Yucatán su dieta se compone principalmente de crustáceos peneidos (Rincón *et al.*, 2009).

Nagelkerken y Van der Velde. 2004 han descrito que el pargo canané tiene una dieta zooplanctófaga y zoobentofaga, con mediciones de $\delta^{13}\text{C}$ determinaron que obtienen su alimentación principalmente en los lechos de pastos marinos y parte de su dieta la obtienen en los manglares. Organismos juveniles menores a 5 cm se alimentan de copépodos y al aumentar su tamaño corporal se encuentra en menor volumen la cantidad de estos crustáceos (Cocheret *et al.*, 2003).

Los aspectos nutricionales han sido enfrentados de diferentes maneras; se han hecho estudios sobre el desarrollo larvario de *O. chrysurus* donde al suministrar ácidos grasos poliinsaturados o HUFA (Highly Unsaturated Fatty Acids), con *Artemia* enriquecida, ha aumentado la supervivencia y disminuido la frecuencia de mortalidad, también mostraron que los organismo presentaron señales de estrés cuando solo fueron alimentados con *Artemia*. (Faulk *et al.*, 2005). En el desarrollo larvario del pargo canané en laboratorio se ha obtenido un crecimiento de 0.31 mm/día y 0.18 mm/día en la etapa de juvenil. (Riley *et al.*, 1995). Se ha obtenido un 2.8% de supervivencia desde la etapa de huevo a juvenil y ha tenido un crecimiento de 600 g en 900 días en condiciones de cultivo. (Turano *et al.*, 2000).

2.2.- Requerimientos nutricionales en pargos.

2.2.1.- Proteína.

Los niveles óptimos de proteína en la dieta de los peces está influenciada por el equilibrio de la relación proteína/energía, la composición de aminoácidos y la digestibilidad de las proteínas (Bureau *et al.*, 1998). Los aminoácidos esenciales son los que no se pueden sintetizar por rutas metabólicas y tienen que provenir

estrictamente de la dieta para un crecimiento máximo (Lovell, 1989), los requerimientos proteicos son influenciados por variables como: tamaño del organismo, densidad de cultivo, temperatura del agua, composición de la dieta y calidad de la proteína (NRC, 1993).

Catacutan *et al.*, (2001) encontró que juveniles de pargo *Lutjanus argentimaculatus* obtuvieron un buen crecimiento y supervivencia, alimentados con 44 % de proteínas y una relación proteína-energía de 23.3 mg de proteína/kJ. También Abbas *et al.*, (2012), determinó un requerimiento de 40 % y 45 % de proteína en juveniles de 8 a 110 g, resultados similares se encontraron en *Lutjanus guttatus* (García, 2009), Para *Lutjanus campechanus* se determinó una inclusión de 32 % a 36 % de proteína en la dieta para su óptimo crecimiento (Miller *et al.*, 2005). En *Lutjanus analis* se encontró que un intervalo de 33.9 – 36.3 kJ/g de proteína es necesario para un alto crecimiento (Watanabe, *et al.*, 2001).

En *L. guttatus* se han tenido buenos resultados en las dietas con sustituciones de hasta un 50 % de la proteína de pescado por la de harina de ave sin afectar su crecimiento (Hernández, *et al.*, 2014). Experimentos realizados en *L. argentimaculatus* por Catacutan y Pagador (2004), determinaron que un reemplazo del 25 % de la proteína aportada por la harina de pescado por harina de soya desengrasada no afecta su crecimiento, supervivencia y eficiencia alimenticia. En el pargo Australian *Pagrus auratus* se utilizó una combinación de harina de ave y harina de soya para reemplazar más de la mitad de la harina de pescado en una dieta que contenía un 64% de harina de pescado dando excelentes resultados en su crecimiento por lo tanto la harina de ave y soya son fuentes proteicas que el pargo Australiano puede asimilar correctamente (Quartararo, *et al.*, 1998).

2.2.2.- Lípidos

Los lípidos son fuentes para la generación de la energía metabólica en los peces marinos (Sargent *et al.*, 1989), en especial los ácidos grasos desde la etapa de huevo a adulto (Tocher, 1995).

En la mayoría de especies marinas los requerimientos de ácidos grasos esenciales son del 1% en forma de n-3 HUFA (Tocher, 2010). En *L. analis* se determinó un requerimiento de lípidos 6 % - 9 % para un máximo crecimiento y retención de energía (Watanabe, *et al.*, 2001), y *L. campechanus* de 10 % (Miller *et al.*, 2005). En dietas para reproductores de *L. argentimaculatus* se utilizó 8.6% lípidos y la adición de aceite de calamar mejoró la cantidad de huevos desovados y la supervivencia de las larvas (Emata y Borlongan, 2003; Emata *et al.*, 2003).

2.3.- Digestibilidad *in vitro* en peces utilizando el método de pH-Stat.

Los métodos utilizados en la digestibilidad *in vitro* simulan el proceso de digestión en peces, son empleados en la industria acuícola para clasificar ingredientes utilizados en dietas y así poder reducir los costosos ensayos de digestibilidad *in vivo* (Moyano *et al.*, 2014).

Existen distintas configuraciones para medir la digestibilidad *in vitro* en las que se pueden emplear digestores simples con recipientes cerrados que pueden medir los cambios de pH, por ejemplo, el pH-drop y pH-Stat, o la medición de sustratos no digeridos (Moyano *et al.*, 2014).

El uso del pH-Stat está dado porque mide en una reacción todos los enlaces peptídicos que fueron hidrolizados por la enzimas y estas trabajan en un pH y temperatura constante (Wrolstad, *et al.*, 2005).

El pH-Stat mide el grado de hidrólisis de los distintas fuentes proteicas (Lazo y Mart, 2012; Yasumaru y Lemos, 2014) y es un método rápido, seguro y simple (Sáenz *et al.*, 2011), puede ser practico utilizando los extractos enzimáticos de las especie de interés (Rungruangsak *et al.*, 2002).

En la digestibilidad *in vitro* usando extractos enzimáticos de los mismos organismos tiene la ventaja de tomar en cuenta su capacidad digestiva para las distintas fuentes de proteína y así poder formular una dieta que se adapte a la capacidad de digestibilidad de los mismos, Lazo y Mart, 2012 analizo distintas

fuentes de proteínas en el desarrollo ontogénico de las lavas *Paralichthys californicus* dando muy poca digestibilidad de fuentes proteicas vegetales y muy buena de alimentos vivos y harina de pescado. Para juveniles de *Solea senegalensis* las fuentes de proteína que presentaron un mayor grado de coeficiente de degradación proteica fueron harina de calamar, harina de mejillon y concentrado de soya (Sáenz *et al.*, 2011). En el *Paralichthys olivaceus* puede digerir el aislado proteico de soya que puede ser sustituto de la harina de pescado, sin embargo en el concentrado proteico de soya tuvo una baja digestibilidad (Deng *et al.*, 2009).

La interpretación de los valores obtenidos del grado de hidrólisis en extractos estomacales no está bien esclarecido, sin embargo tiene un importante impacto para la hidrólisis que continua en los ciegos pilóricos e intestinos (Yasumar y Lemos, 2014).

Tabla 1. Digestibilidad *in vitro* de harina de pescado, canola y ave en peces teleósteos.

Fuente de proteína	Especie	% GH	Digestibilidad (%)	Referencia
Harina de pescado	<i>Salmo salar</i>		80-88	Anderson <i>et al.</i> , 1993
	<i>Salmo salar</i>		87-95	Anderson <i>et al.</i> , 1997
	<i>Sparus aurata</i>	7.3		Moyano y Savoie, 2001
	<i>Sparus aurata</i>	10		Alarcón <i>et al.</i> , 2002
	<i>Gadus morhua</i>	12		Tibbetts <i>et al.</i> , 2011
	<i>Paralichthys californicus</i>	0.9-1		Martínez y Lazo, 2012
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	6-8		Yasumar y Lemos, 2014
	<i>Rachycentron canadum</i>	4		Yasumar y Lemos, 2014
	<i>Oreochromis niloticus</i>	4		Yasumar y Lemos, 2014
	Harina de ave	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	20-25	58-72
<i>Salmo gairdneri</i>		16-21	69-77	Dimes y Haard, 1994
<i>Gadus morhua</i>		11		Tibbetts <i>et al.</i> , 2011
<i>Oncorhynchus mykiss</i>		5-7		Yasumar y Lemos, 2014
<i>Rachycentron canadum</i>		3-5		Yasumar y Lemos, 2014
<i>Oreochromis niloticus</i>		4-5		Yasumar y Lemos, 2014
Caseína		<i>Oncorhynchus mykiss</i>	34	99
	<i>Salmo gairdneri</i>	34	98	Dimes y Haard, 1994
	<i>Sparus aurata</i>	7.26		Alarcon <i>et al.</i> , 1999

	<i>Sparus aurata</i>	12.9		Moyano y Savoie, 2001
	<i>Paralichthys californicus</i>	1.52		Martínez y Lazo, 2012
Harina de Canola	<i>Gadus morhua</i>	12-17		Tibbetts <i>et al.</i> , 2011
Harina de Soya	<i>Salmo gairdneri</i>	21	76	Dimes y Haard, 1994
	<i>Sparus aurata</i>	3.6		Moyano y Savoie, 2001
	<i>Sparus aurata</i>	10.55		Alarcón <i>et al.</i> , 2002
	<i>Gadus morhua</i>	13-21		Tibbetts <i>et al.</i> , 2011
	<i>Paralichthys californicus</i>	0.33		Martínez y Lazo, 2012
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	3-7		Yasumaru y Lemos, 2014
	<i>Rachycentron canadum</i>	1-4		Yasumaru y Lemos, 2014
	<i>Oreochromis niloticus</i>	2-5		Yasumaru y Lemos, 2014
Harina de trigo	<i>Gadus morhua</i>	20.7		Tibbetts <i>et al.</i> , 2011
	<i>Paralichthys californicus</i>	0.98		Martínez y Lazo, 2012
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	5-6		Yasumaru y Lemos, 2014
	<i>Rachycentron canadum</i>	2		Yasumaru y Lemos, 2014
	<i>Oreochromis niloticus</i>	3		Yasumaru y Lemos, 2014

2.4.- Digestibilidad aparente en peces.

La medida de la digestibilidad de los nutrientes es uno de los primeros pasos que se deben de analizar para elaborar una dieta que pueda satisfacer los requerimientos nutricionales del organismo (Cho *et al.*, 1982), también su palatabilidad y nutrientes aportados (Glencross *et al.*, 2007), así es de suponer que los ingredientes que tienen los coeficientes más altos en digestibilidad permiten un mayor crecimiento en los peces (Lee, 2002).

Actualmente, uno de los métodos más comunes para medir la digestibilidad aparente de un ingrediente es el utilizado por Cho *et al.*, (1974), que se basa en la sustitución de una dieta de referencia, el ingrediente de prueba sustituye una porción de la dieta de referencia para crear una dieta de prueba, luego se determina la digestibilidad en la dieta de referencia y prueba, basados en factores de proporción se puede calcular la digestibilidad del ingrediente (Aksnes *et al.*, 1996; Glencross *et al.*, 2007).

En estudios realizados en peces carnívoros se presenta una mayor digestibilidad de ingredientes de origen animal teniendo una mayor digestibilidad de materia seca y energía, por el contrario la digestibilidad de las fuentes vegetales se ve disminuida principalmente por la cantidad de carbohidratos y fibras presentes, esto se ha reportado para salmónidos (Cho *et al.*, 1982; Sugiura *et al.*, 1998); corvina *Sciaenops ocellatus* (McGoogan y Reigh, 1996); perca plateada *Bidyanus bidyanus* (Stone *et al.*, 2000); Rockfish *Sebastes schlegeli* (Bai *et al.*, 2001; Lee, 2002); cobia *Rachycentron canadum* (Zhou *et al.*, 2004); loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Chu *et al.*, 2014). Aunque se encuentran ciertas excepciones como las presentadas con harina de gluten de maíz (Lee, 2002; Zhou *et al.*, 2004), harina de soya fermentada (Chu *et al.*, 2014), posiblemente la composición química de los carbohidratos les sea accesible a los organismos, esto coincide con lo descrito por Bai *et al.*, (2001). Para el *S. ocellatus* se determinó que cantidades bajas de fibra presentes en los ingredientes se obtiene altas digestibilidades aparentes de energía, proteína y lípidos (McGoogan y Reigh, 1996).

Tabla 2. Digestibilidad aparente de harina de pescado, canola y ave en peces teleósteos.

Fuente proteína	Especie	%MO	% DAM	% DAP	%DAE	Referencia
Harina de Pescado	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	-	85	92	91	Cho <i>et al.</i> , 1982
	<i>O. mykiss</i>	-	82-85	95-97	-	Sugiura <i>et al.</i> , 1998
	<i>O. mykiss</i>	-	-	90-93	-	Dimes <i>et al.</i> , 1994
	<i>O. mykiss</i>	-	-	86-89	94-97	Aksnes y Opstvedt, 1998
	<i>O. tshawytscha</i>	84-88	-	83-93	84-92	Hajen <i>et al.</i> , 1993
	<i>O. kisutch</i>	-	81-86	94-97	-	Sugiura <i>et al.</i> , 1998
	<i>Spaurus aurata</i>	-	-	83	80	Lupatsch <i>et al.</i> , 1997
	<i>Chanos chanos</i>	-	-	76	-	Ferraris <i>et al.</i> , 1986
	<i>Cyprinus carpio</i>	-	-	91-94	-	Eid y Matty, 1989
	<i>Salmo salar</i>	-	-	74-81	-	Anderson <i>et al.</i> , 1992
	<i>Sciaenops ocellatus</i>	-	77	96	60	McGoogan y Reigh, 1996
	<i>S. ocellatus</i>	94	-	77-88	92-95	Gaylord y Gatlin, 1996
	<i>Seriola quinqueradiata</i>	-	-	89	-	Masumoto <i>et al.</i> , 1996
	<i>Labeo rohita</i>	-	-	80	-	Hossain <i>et al.</i> , 1997
	<i>Bidyanus bidyanus</i>	-	92	94	100	Allan <i>et al.</i> , 1999
	<i>B. bidyanus</i>	-	77-94	89-94	89-98	Allan <i>et al.</i> , 2000
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	-	71-86	89-96	86-94	Gomes y Oliva, 1998
	<i>Sebastes schlegeli</i>	-	-	87	-	Bai <i>et al.</i> , 2001
	<i>S. schlegeli</i>	-	83-89	95	96-99	Lee, 2002
	<i>Symphysodon aequifasciata</i>	-	78	91	-	Chong <i>et al.</i> , 2002
<i>Micropterus salmoides</i>	-	70	88	78	Portz y Cyrino, 2004	

	<i>M. salmoides</i>	-	73	-	87	Masagounder <i>et al.</i> , 2009
	<i>Lepomis macrochirus</i>	-	78	-	87	Masagounder <i>et al.</i> , 2009
	<i>Epinephelus coioides</i>	-	84-89	98-99	-	Eusebio <i>et al.</i> , 2004
	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	96	-	96	92	Tibbetts <i>et al.</i> , 2004
	<i>Pagrus auratus</i>	99	-	94	99	Booth <i>et al.</i> , 2005
	<i>Puntius gonionotus</i>	-	-	93	86	Mohanta <i>et al.</i> , 2006
	<i>Oreochromis niloticus</i>	-	-	89	-	Guimarães <i>et al.</i> , 2008
	<i>Acipenser baerii</i>	-	64	85	85	Liu <i>et al.</i> , 2009
	<i>Salminus brasiliensis</i>	-	84	94	91	Borghesi <i>et al.</i> , 2009
	<i>Pangasinodon hypothalamus</i>	-	88	96	94	Hien <i>et al.</i> , 2010
	<i>Morone chrysops</i> x <i>M. saxatilis</i>	-	-	99	-	Rawles <i>et al.</i> , 2010
	<i>M. chrysops</i> x <i>M. saxatilis</i>	-	-	79-86	-	Metts <i>et al.</i> , 2011
	<i>Gadus morhua</i>	-	-	92-95	-	Tibbetts <i>et al.</i> , 2011
	<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	-	-	83	79	Silva <i>et al.</i> , 2013
	<i>Huso huso</i>	89-90	-	89-93	87-98	Safari <i>et al.</i> , 2014
	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	-	66-67	87-88	76-79	Chu <i>et al.</i> , 2015
	<i>Lutjanus guttatus</i>	-	80	84	89	Hernández <i>et al.</i> , 2015
	<i>Rachycentron canadum</i>	-	88	96	95	Zhou <i>et al.</i> , 2004

Harina de Canola	<i>Salmo salar</i>	-	-	74	-	Anderson <i>et al.</i> , 1992
	<i>S. salar</i>	75	71	86	70	Burr <i>et al.</i> , 2011
	<i>O. tshawytscha</i>	53.5	-	84.5	64.5	Hajen <i>et al.</i> , 1993
	<i>O. mykiss</i>	-	49.8	88.1	55.6	Mwachireya <i>et al.</i> , 1999
	<i>O. mykiss</i>	-	26	100	69	Glencross, 2011
	<i>Bidyanus bidyanus</i>	-	47-52	80-83	58	Allan <i>et al.</i> , 2000
	<i>Pagrus auratus</i>	9-58	-	23-94	30-74	Glencross <i>et al.</i> , 2004
	<i>Melanogrammus aeflefinus</i>	59	-	83	60	Tibbetts <i>et al.</i> , 2004
	<i>Salvelinus alpinus</i>	51	47	73	49	Burr <i>et al.</i> , 2011
	<i>Lates calcarifer</i>	-	21	63	60	Glencross, 2011
	<i>Gadus morhua</i>	-	-	79-89	-	Tibbetts <i>et al.</i> , 2011
	<i>Ictalurus punctatus</i>	-	49	77	52	Li <i>et al.</i> , 2013
	<i>Huso huso</i>	80-88	-	64-69	66-68	Safari <i>et al.</i> , 2014
	<i>Epinephelus morio</i>	-	-	95	-	Silva <i>et al.</i> , 2014
	<i>Lutjanus guttatus</i>	-	74	81	87	Hernández <i>et al.</i> , 2015

Harina de Ave	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	-	-	64-78	-	Dong <i>et al.</i> , 1993
	<i>O. mykiss</i>	-	52	68	71	Cho <i>et al.</i> , 1982
	<i>O. mykiss</i>	-	76-77	87-91	77-87	Bureau <i>et al.</i> , 1999)
	<i>O. mykiss</i>	-	36	56	54	Glencross, 2011
	<i>O. tshawytscha</i>	66-76	-	74-85	65-72	Hajen <i>et al.</i> , 1993
	<i>Sciaenops ocellatus</i>	75.6	-	48.7	59	Gaylord y Gatlin, 1996
	<i>Bidyanus bidyanus</i>	-	86	85	94	Allan <i>et al.</i> , 2000
	<i>Symphysodon aequifasciata</i>	-	65	67	-	Chong <i>et al.</i> , 2002
	<i>Micropterus salmoides</i>	-	83	81	85	Portz y Cyrino, 2004
	<i>Pagrus auratus</i>	88	-	85	91	Booth <i>et al.</i> , 2005
	<i>Oreochromis niloticus</i>	-	-	90	-	Guimarães <i>et al.</i> , 2008
	<i>Acipenser baerii</i>	-	59	86	76	Liu <i>et al.</i> , 2009
	<i>Lepomis macrochirus</i>	-	83	-	87	Masagounder <i>et al.</i> , 2009
	<i>Micropterus salmoides</i>	-	76	-	84	Masagounder <i>et al.</i> , 2009

<i>Salminus brasiliensis</i>	-	80	91	90	Borghesi <i>et al.</i> , 2009
<i>Morone chrysops</i> x <i>M. saxatilis</i>	-	-	80-84	-	Rawles <i>et al.</i> , 2010
<i>Morone chrysops</i> x <i>M. saxatilis</i>	-	-	75-78	-	Metts <i>et al.</i> , 2011
<i>Lates calcarifer</i>	-	10	40	52	Glencross, 2011
<i>Gadus morhua</i>	-	-	80	-	Tibbetts <i>et al.</i> , 2011
<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	-	-	99	86	Silva <i>et al.</i> , 2013
<i>Huso huso</i>	90	-	92	93	Safari <i>et al.</i> , 2014
<i>Centropomus undecimalis</i>	-	-	69-72	-	Lemus A. y Gaxiola C., 2015
<i>Lutjanus guttatus</i>	-	77	82	88	Hernández <i>et al.</i> , 2015
<i>Rachycentron canadum</i>	-	81	91	91	Zhou <i>et al.</i> , 2004

MO, digestibilidad aparente materia orgánica; DAM, digestibilidad aparente de materia seca; DAP, digestibilidad aparente de proteína cruda; DAE, digestibilidad aparente de energía.

Para el *M. anguillicaudatus* obtuvo una alta digestibilidad para ingredientes de origen animal entre un 81.5 % a 85.3 % y para los de origen vegetal fueron más bajos con excepción de harina de soya fermentada (Chu *et al.*, 2014). También esta tendencia fue descrita con *R. canadum* donde las mejores fuentes de proteína para reemplazar la harina de pescado fue harina de ave y harina de gluten de maíz (Zhou *et al.*, 2004). En *Melanogrammus aeglefinus* la harina de arenque *Clupea spp.*, puede ser reemplaza por harina de soya porque esta presenta altos coeficientes de digestibilidad aparente y energía digerible. (Tibbetts, *et al.*, 2004).

3.- Hipótesis.

La evaluación de la digestibilidad *in vivo* e *in vitro* en juveniles de pargo canané *O. chrysurus* se espera que sea mayor en fuentes de proteína de origen animal terrestre, presentando una mejor asimilación para la sustitución de la harina de pescado, por su conducta alimenticia carnívora.

4.- Objetivos.

4.1.- Objetivo General.

Determinar la digestibilidad *in vitro* y en *in vivo* de harinas de origen animal terrestre y vegetal utilizados como fuente de proteína para pargo canané *Ocyurus chrysurus*.

4.2.- Objetivos específicos.

1. Conocer la digestibilidad *in vitro* por el método de pH-Stat de las distintas materias primas a utilizar a partir de enzimas extraídas de estómagos, ciegos pilóricos e intestinos de juveniles del pargo canané.
2. Evaluar la digestibilidad aparente de materia seca, proteína y energía de las fuentes de proteína con mejor resultado en digestibilidad *in vitro* en el pH-Stat.

5.- Justificación

Para aliviar las presiones de pescas que se ejercen sobre los pargos (Lutjanidae) se dan alternativas como la maricultura en el que se tienen que desarrollar técnicas de cultivo eficaces para el crecimiento en cultivo de los organismos (Davis *et al.*, 2000). Siendo los pargos con una tendencia en aumento sobre su demanda en el comercio internacional y con potencial de desarrollo de cultivo (Benetti *et al.*, 2003)

Se ha logrado con éxito la reproducción y producción de larvas de *O. chrysurus* (Soletchnik *et al.*, 1989; Álvarez-Lajonchere *et al.*, 1992; Riley *et al.*, 1995; Turano *et al.*, 2000), sin embargo, los estudios de los requerimientos de proteína en pargos son escasos (Miller *et al.*, 2005).

Para poder elaborar una dieta del pargo canané se necesita conocer la digestibilidad de los ingredientes y obtener un mejor aprovechamiento de los nutrientes aportados, actualmente no existe información sobre digestibilidad de fuentes de proteína para pargo canané.

6.- Material y métodos.

6.1.- Digestibilidad *in vitro*.

6.1.1.-La obtención de organismos.

Los pargos canané utilizados para realizar la extracción de las enzimas fueron capturados de jaulas de engorde colocadas frente a las costas de Sisal y pertenecen a la empresa INPESMAR (Industrializadoras de Pescados y Mariscos S.A). Estos fueron trasladados a las instalaciones de Unidad Académica Sisal (UAS), por medio de bines isotérmicos con aireación continua proporcionada por un blower de 0.5 HP y dos aireadores. Luego se colocaron en cuarentena por 48 horas sin alimentación, se les dio un tratamiento de baño de agua dulce por 5 min y otro de azul de metileno al 5 ups, todo esto bajo un sistema de flujo contante.

6.1.2.- Diferentes fuentes de proteínas de origen animal y origen vegetal:

El análisis químico proximal y de digestibilidad *in vitro* se realizaron en las diferentes fuentes de proteínas:

Origen Animal:

- 1.- Harina de pollo
- 2.- Harina de pescado 53%
- 3.- Harina de ave
- 4.- Protiblend

Origen Vegetal:

- 1.- Pasta de soya
- 2.- Pasta de canola
- 3.- Harina gluten de trigo francés.

6.1.3.- Análisis químico proximal de los ingredientes

Las materias primas son homogenizadas a un tamaño de partícula de 250 μm , se analizaron bajo un tren proximal bajo la metodología AOAC. (1990), donde se determinó la humedad por medio de una termobalanza, las cenizas en incineración por mufla, la extracción de lípidos por medio de solventes orgánicos y las proteínas se usó un analizador elemental (ver anexos).

6.2.- Procedimiento para análisis de extractos enzimáticos.

Se realizó la extracción de los órganos tanto de estómago, ciegos e intestinos para extraer los concentrados enzimáticos. Los organismos se dejaron 48 horas sin alimentación, se trasladaron al laboratorio central de la UAS. Se mantuvieron en un recipiente con 50 L de capacidad con agua de mar y aireación, los organismos que fueron sacrificados se movieron a un recipiente de 10 L a la cual se le agregó 1 mL de esencia de clavo por cada litro para tranquilizarlos y se llevaron a cabo las mediciones biométricas de longitud total, longitud patrón, altura máxima, altura mínima y peso total. Se sacrificaron los organismos y se realizó la extracción de los distintos órganos (estómagos, ciegos pilóricos e intestinos), en una placa congelante, depositando cada órgano en un vaso de precipitado previamente identificado, que se encuentran en recipientes con hielo, se enjuagaron con agua inyectable a pH 3 y 8 (estómagos y ciegos e intestinos respectivamente), se pesaron individualmente. Se guardaron en bolsas previamente identificadas y se congelaron en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -80°C .

Para realizar los extractos enzimáticos de los órganos. Se maceraron en un homogeneizador de tejidos (ULTRA TURRAX®) con agua inyectable a pH 3 (en el caso de proteasas ácidas y pH 8 (en el caso de proteasas alcalinas) en una relación 2:1 (2 mL de agua inyectable por cada gramo de tejido) para los ciegos e intestinos, para los tejidos de estómago una relación 1:5, el macerado que se obtuvo fueron colocados en tubos eppendorf de 2 mL y se procedió a centrifugar a 12,000 rpm/15 min a 4°C en una centrifuga refrigerada. Luego de esto se distinguían tres capas en los tubos eppendorf la cual se extrajo la capa media donde se encuentran las enzimas, esta se transfirió a otro tubo eppendorf de 500 μL y se introducen en nitrógeno líquido y posteriormente se guardan en una mantenedora a -80°C .

6.3.- Determinación de la actividad de proteasas ácidas y alcalinas.

Para la determinación de la actividad de proteasas ácidas se utilizó el método de Anson (1938) y en alcalinas el de Kunitz (1947), se realizaron 2 diluciones

por cada órgano 1:10 y 1:100 (con tres replicas cada uno), para la medición de la absorbancia, se adicionó 1 mL de la preparación a una celda de cuarzo y con un espectrofotómetro (Genesys 10 UV) a una longitud de onda de 280 nm para leerlas.

Posteriormente se procedió a determina las unidades enzimáticas por mililitro por medio de la siguiente fórmula:

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

Donde:

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 mililitros.

6.4.- Digestibilidad ácida.

Se utilizó el pH STAT (Metrohm *Metrohm Titrande 842 pH-Stat*), en el caso de la digestión ácida se utilizó como en un vaso de 10 mL con circulación de agua que proviene de un baño María que mantiene una temperatura de 37 °C. A este recipiente se le agregan 5 mL de agua inyectable y 8 mg de fuente proteica por mL de agua inyectable.

Se ajustó el pH a 2 con HCl al 0.1 N manteniéndola en agitación continua a una velocidad de 6, se sube el pH a 3.5 e inmediatamente se agregan 50 unidades de enzima, se deja corriendo el programa hasta los 15 min. El grado de hidrólisis se calcula a partir de los mililitros de HCl que se utilizaron para mantener el pH 3.5 durante los 15 min que duró la prueba.

6.5.- Digestibilidad alcalina.

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 10 con NaOH al 0.05 N, se mantiene en agitación constante la mezcla una velocidad de 6 y se baja el pH a 8, una vez que se llega a este pH se agregan 250 unidades de enzima a la mezcla y se continua con el proceso de mezclado durante 45 min. El grado de hidrólisis se calcula a partir de los mililitros de NaOH que se utilizaron para mantener el pH en 8 durante los 45 min que duró la prueba.

6.6.- Grado de hidrólisis.

El grado de hidrólisis es presentado en porcentaje del número de enlaces hidrolizados. Se determinaron con la fórmula propuesta de Adler- Nissen (1986):

$$\text{GH (\%)} = B \times N_b \times (1/\alpha) \times (1/\text{MP}) \times (1/\text{H}_{\text{tot}}) \times 100\%.$$

Donde:

B: volumen de base consumida en mililitros.

N_b: normalidad de la base.

α: Promedio del grado de disociación de los grupos α-NH (1/ α= 1.5 para pH 8.0 a 25 °C)

MP= masa de sustrato proteico en gramos.

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

6.7.- Metodología sobre determinación de digestibilidad *in vivo*.

Los organismos que se utilizaron para el experimento fueron obtenidos a partir de desoves de los reproductores capturados del medio silvestre de las costas de Sisal, Yucatán en las instalaciones de la Facultad de Ciencias, Unidad Académica Sisal (UAS).

6.8.- Diseño experimental y dietas

Para evaluar la digestibilidad *in vivo* se utilizó un diseño aleatorio con 6 tratamientos con 3 réplicas cada uno, los ingredientes utilizados se muestran en la tabla 3. Se utilizaron tanques de 80 L de capacidad y se emplearon 10 juveniles por tanque con un peso aproximado de 30 g provenientes del área de reproducción de peces marinos de la UAS. Se colocaron en un sistema de recirculación de agua y con aireación continua las 24 horas del día.

Tabla 3. Composición de ingredientes de las dietas de referencia y prueba.

Ingredientes	Dietas (g / 100g en base seca)	
	Referencia	Prueba
H. Pescado ^a	70	49
H. de trigo ^b	21.95	15.05
Aceite de pescado ^a	3	2.1
Lecitina de soya ^a	1	0.7
Premezcla de vitaminas ^c	2	1.4
Zeolita ^a	1.05	1.05
Carboximetilcelulosa	1	0.7
Ingrediente prueba		30
TOTAL	100	100

^a MaltaCleyton S.A. de C.V., Mérida, Yucatán, México

^b Comercializadora Mayorista del Golfo S.A. de C.V., Mérida, Yucatán, México.

^c DMS Nutritional Products México S.A. de C. V.

6.9.- Elaboración de los alimentos balanceados

El método general para la elaboración de las dietas, consiste en lo siguiente; todas las materias primas a utilizar son tamizadas a un tamaño de partícula mínima de 250 µm, luego son pesados previamente de acuerdo a la formulación de cada dieta.

Se mezclaron las materias primas secas por 15 min después se agregaron los ingredientes húmedos como los aceites y se mezclaran durante otros 10 min, previamente se preparó el aglutinante gelatinizándolo (en un recipiente aparte se agregó agua hirviendo junto con el aglutinante en forma seca), se añade este

aglutinante para continuar mezclando por otros 10 min, al finalizar se obtuvo una masa homogénea.

Esta masa homogénea se extruye con una máquina de moler carne la cual formo los pellets que fueron puestos en un horno a 60 °C por 12 horas para obtenerlos secos, estos fueron almacenados en un lugar seco a temperatura ambiente.

6.10.- Digestibilidad aparente.

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, se determinó de manera indirecta con un marcador inerte.

El método de digestibilidad aparente se realizó, usando como marcador la zeolita (Cuzon *et al.*, 1998), 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 utilizaron 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, de las cuales también se obtiene el marcador recolectado. Para calcular el porcentaje de cenizas insolubles en ácido, se realizó por el método de Atkinson *et al.*, (1984).

Para el análisis de la digestibilidad de materia seca y proteína se utilizó la técnica de AIA (Ceniza Libre de Carbono) usando como marcador la zeolita. Las fórmulas 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) $\%DAMS = 100 \times (1 - (\% \text{ zeolita en la dieta} / \% \text{ zeolita en las heces}))$.

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

Para determinar la digestibilidad aparente por ingrediente se utilizó la fórmula descrita por (Cho *et al.*, 1982).

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

Para cuantificar la digestibilidad aparente de cada ingrediente y nutriente, los organismos permanecieron en ayuno durante 48 horas para vaciar el tubo digestivo antes de iniciar la alimentación, la cual se suministró en un 10% de la biomasa durante todo el periodo experimental. Diariamente previo a cada nueva alimentación, se retiró los restos de alimento no consumido y heces mediante sifoneo, empleando un papel filtro de 400 μm ; posteriormente el material colectado fue lavado con agua destilada, para eliminar las sales, secadas a 60 °C hasta peso constante para luego ser pesado para su posterior análisis.

6.11.- Análisis estadístico.

Se utilizó un Análisis de varianza de una sola vía (ANDEVA) para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos, cuando éstas se presentaron se aplicó la prueba de rangos múltiples de Tuckey, para ponderar las diferencias entre los mismos. El nivel de probabilidad fue de 95%.

7.- Resultados

7.1 Digestibilidad *in vitro*.

La composición proximal de los ingredientes se presenta en la tabla 4. Los valores de grado de hidrólisis de estómago, ciegos pilóricos e intestinos se muestran en la tabla 5; el grado de hidrólisis total y porcentaje de digestibilidad proteínica en la tabla 6.

Tabla 4. Composición proximal (g/ 100g) de los ingredientes de prueba para la digestibilidad *in vitro* del pargo canané *Ocyurus chrysurus*. (Promedio \pm DS)

Componentes	Ingredientes de prueba						
	HP	HAVF	HAS	PCM	PROT	PS	GTF
Humedad	11.10 \pm 0.03	9.70 \pm 0.10	7.60 \pm 0.08	10.60 \pm 0.09	8.90 \pm 0.07	12.30 \pm 0.06	10.30 \pm 0.02
Proteína	57.55 \pm 3.43	53.51 \pm 1.59	53.96 \pm 1.04	38.79 \pm 0.62	59.80 \pm 0.66	44.03 \pm 0.4	71.10 \pm 0.37
Lípidos	6.92 \pm 0.01	14.05 \pm 0.13	14.93 \pm 0.30	1.51 \pm 0.04	11.46 \pm 0.27	1.20 \pm 0.10	1.56 \pm 0.17
Ceniza	15.19 \pm 0.20	21.36 \pm 0.05	28.53 \pm 1.99	6.38 \pm 0.07	16.16 \pm 0.35	5.42 \pm 0.06	0.79 \pm 0.02
Carbohidrato*	20.34	11.08	2.58	53.42	12.58	49.35	26.55

HP, harina de pescado; HAS, harina de ave súper; HAVF, harina de ave food grade; PCM, pasta de canola; PROT, protiblend⁶⁰; PS, pasta de soya; GTF, Gluten de trigo Francés. *Carbohidrato, se calcularon como 100-(proteína + lípidos + ceniza)

Según los extractos enzimáticos preparados de los estómagos de los pargos canané *O. chrysurus*, se utilizó la hemoglobina como base estándar y estos valores son considerados como el 100 % del grado de hidrólisis (GH) proteica. Para los ingredientes con mayor grado de hidrólisis son la harina de ave food grade (HAVF), harina de ave súper (HAS) seguido del protiblend (PROT) y harina pescado (HP). En las fuentes vegetales presentaron un GH de entre 0.77 %-0.45 %, siendo la más alta la pasta de canola.

Para las digestibilidades alcalinas en los ciegos pilóricos e intestinos se utilizó a la caseína como base para determinar el 100 % del grado de hidrólisis enzimática. La HAVF, HAS y HP obtuvieron valores de GH superiores a los presentados por la caseína en los ciegos pilóricos, entre las fuentes vegetales la PCM obtuvo mayor GH y el gluten de trigo francés (GTF) el valor más bajo.

Tabla 5. Grado de Hidrólisis proteica de estómago, ciego pilórico e intestino de los distintos ingredientes probados para el pargo canané mediante la técnica de pH-Stat.

Ingredientes	Grado de Hidrólisis (%)		
	Estómago	Ciego	Intestino
Hemoglobina/Caseína	2.17 \pm 0.67 ^a	3.49 \pm 1.14 ^a	2.29 \pm 0.29 ^a
Pasta de soya	0.45 \pm 0.06 ^b	1.93 \pm 0.92 ^a	1.36 \pm 0.28 ^a
Pasta de canola	0.77 \pm 0.12 ^b	2.33 \pm 0.81 ^a	1.42 \pm 0.89 ^a
Gluten de trigo francés	0.59 \pm 0.09 ^b	1.12 \pm 0.65 ^b	0.53 \pm 0.33 ^b

Protiblend	1.87 ±0.59 ^a	2.08 ±0.78 ^a	1.14 ±0.23 ^a
Harina de pescado	1.89 ±0.26 ^a	3.96 ±1.27 ^a	2.19 ±0.38 ^a
Harina de ave food grade	2.38 ±0.32 ^a	3.96 ±0.87 ^a	2.61 ±0.56 ^a
Harina de ave súper	2.17 ±0.84 ^a	3.78 ±0.90 ^a	2.07 ±0.61 ^a

Valores son el promedio ± desviación estándar, $n = 3$, cada n consiste en 3 observaciones, y los valores en las mismas columnas pero con diferente superíndice de letras son diferentes significativamente ($P < 0.05$) $a > b$.

Las harinas que presentaron un porcentaje de digestibilidad mayor al 100% fueron la HAVF, HAS y HP. Las que presentaron el porcentaje de digestibilidad más bajo fue el GTF y pasta de soya (PS).

Tabla 6. Grado de Hidrólisis total y porcentaje de digestibilidad de las distintas fuentes de proteína usando extractos multienzimáticos del pargo canané.

Ingredientes	Digestibilidad proteica	
	GH Total	%Digestibilidad
Hemoglobina/Caseína	7.95 ±0.62 ^a	100
Pasta de soya	3.74 ±1.13 ^b	47.05
Pasta de canola	4.51 ±1.55 ^b	56.75
Gluten de trigo francés	2.24 ±0.87 ^c	28.22
Protiblend	5.09 ±0.41 ^b	64.08
Harina de pescado	8.04 ±1.89 ^a	101.16
Harina de ave food grade	8.80 ±0.75 ^a	110.71
Harina de ave súper	8.29 ±1.25 ^a	104.33

Valores son el promedio ± desviación estándar, y los valores en las mismas columnas pero con diferente superíndice de letras son diferentes significativamente ($P < 0.05$) $a > b > c$.

7.2 Digestibilidad aparente

La composición proximal y contenido de energía de las dietas está presente en la tabla 7. La cantidad de proteína en las dietas se mantuvo entre 58.3-57.6 g/100g con excepción de la dieta de referencia y canola con valores de 52.6 y 51 g/100g, respectivamente, y el contenido de energía resulto de 19.97-18.78 mJ/Kg y con mayor cantidad de energía las dietas de HAVF y HAS con 21.43 y 21.30 mJ/Kg, respectivamente. La cantidad de ceniza se presentaron entre 14.4 -12.2 g /100g, siendo el mayor la dieta de PROT. Los coeficientes de digestibilidad aparente de materia orgánica, proteína cruda y energía se encuentran en la tabla

8 y los contenidos total y digestible de materia seca y proteína se muestran en la tabla 9.

Tabla 7. Composición proximal (g / 100g en base seca) de la dieta de referencia y prueba para el pargo canané *Ocyurus chrysurus*. (Promedio \pm DS)

Componentes	Dietas					
	Referencia	HP	HAS	HAVF	PCM	PROT
Proteína	52.6 \pm 0.3	57.6 \pm 1	58 \pm 0.5	57.9 \pm 0.5	51 \pm 0.6	58.3 \pm 1.2
Lípidos	13.5 \pm 0.1	13.5 \pm 0.1	13.7 \pm 0.1	13.8 \pm 0.1	10.7 \pm 0.2	9.2 \pm 0.1
Ceniza	13.4 \pm 0.07	14.3 \pm 0.02	13 \pm 0.08	13 \pm 0.22	12.2 \pm 0.1	14.4 \pm 0.04
Carbohidrato*	20.5	14.6	15.3	15.3	26.1	18.1
Energía (mJ/Kg)	18.95 \pm 1.13	18.78 \pm 0.93	21.30 \pm 2	21.43 \pm 0.64	19.69 \pm 0.31	19.97 \pm 0.74

HP, harina de pescado; HAS, harina de ave súper; HAVF, harina de ave food grade; PCM, pasta de canola; PROT, Protiblend⁶⁰. *Carbohidrato, se calcularon como 100-(proteína + lípidos + ceniza)

Los coeficientes de digestibilidad aparente de materia seca (DAMS) presentados en los ingredientes estuvieron entre un intervalo de 36% - 66%. La DAMS con mayor porcentaje fue para la HP pero no presento diferencias significativas con PCM y HAVF. El valor de DAMS más bajo fue para el PROT con un 36 % y la HAS obtuvo un 54 % presentado un valor intermedio y significativamente mayor ($p < 0.05$) que el PROT.

Los coeficientes de digestibilidad aparente de proteína (DAP) estuvo entre un rango de 69.1% - 92.9%; presentando el valor más alto la PCM sin diferencias significativas con la HP con 90.6 %, seguido de la HAVF que presento un valor de 85.7 %. La DAP con menor valor se presentó en PROT con 69.1% en la cual no se presentaron diferencias significativas con respecto a la HAS.

Tabla 8. Coeficientes de digestibilidad aparente (ADC %) de materia seca, proteína y energía de los distintos ingredientes de prueba.

Componentes	ADC % ingredientes				
	HP	HAS	HAVF	PCM	PROT
Materia seca	66.22 \pm 7.64 ^a	54.96 \pm 1.8 ^b	65.11 \pm 3.33 ^a	64.09 \pm 9.29 ^a	36.04 \pm 10.95 ^c
Proteína cruda	90.67 \pm 3.30 ^a	69.64 \pm 14.71 ^c	85.73 \pm 0.81 ^b	92.97 \pm 0.44 ^a	69.12 \pm 4.31 ^c
Energía	84.64 \pm 1.07 ^a	77.11 \pm 2.69 ^b	79.61 \pm 5.97 ^b	70.39 \pm 7.36 ^c	59.71 \pm 7.94 ^d

HP, harina de pescado; HAS, harina de ave súper; HAVF, harina de ave food grade; HCM, pasta de canola; PROT, Protiblend⁶⁰. Valores son el promedio \pm desviación estándar, y los valores en la misma fila pero con diferente superíndice de letras son diferentes significativamente ($P < 0.05$) $a > b > c > d$.

Los valores presentados en coeficientes de digestibilidad aparente de energía (DAE) estuvieron entre 59.7% y 84.6%. La HP obtuvo el mayor valor de DAE, en el cual presentó diferencias significativas con la HAVF y HAS. La PCM alcanzó un 70 % siendo significativamente mayor ($p < 0.05$) que la harina de PROT.

Tabla 9. Contenido total y digestible de materia seca y proteína de las fuentes de proteína utilizadas para el pargo canané *Ocyurus chrysurus*.

Ingredientes	Materia seca		Proteína	
	Total	Digestible	Total	Digestible
Pescado	88.9	58.87	59.5	53.95
Ave food grade	92.4	60.16	54	46.29
Ave súper	90.3	49.63	53.5	37.26
Canola	89.4	57.30	38.8	36.07
Protiblend	91.1	32.83	59.7	41.26

Materia seca total = 100 – Humedad ingrediente

Contenido digestible = contenido total nutriente x ADC.

8.- Discusión

8.1 Digestibilidad *in vitro*.

La técnica de pH-Stat fue más eficiente en la determinación del grado de hidrólisis enzimática, cuando se utilizan extractos enzimáticos digestivos, al contrario de la utilización de proteasas, tripsina y quimiotripsina que son enzimas purificadas de mamíferos o bacterias (Anderson *et al.*, 1993; Dimes y Haard, 1994; Dong *et al.*, 1993); esta técnica se puede utilizar para distinguir fuentes proteínicas en que el organismo tenga una mayor capacidad de hidrólisis en su tracto digestivo (Yasumaru y Lemos, 2014). En este estudio se utilizaron extractos enzimáticos de estómago, ciegos pilóricos e intestino, donde se evaluó su grado de hidrólisis de diferentes fuentes de proteína en pargo canané *O. chrysurus*.

Dentro de las fuentes de proteína animal la harina de ave tiene potencial para ser usado como un ingrediente de bajo costo a las dietas de peces (Lee y Degani, 1988), en especies carnívoras se a presentado un GH elevado y que se puede comparar con diversas fuentes de harinas de pescado (Tibbetts *et al.*, 2011; Yasumaru y Lemos, 2014), sin embargo, diversas fuentes de harina de ave muestran variaciones en su contenido de cenizas y puede ocasionar una incorporación de fósforo en los efluentes de agua (Dong *et al.*, 1993).

En el GH total la HP, HAVF y HAS fueron similares a los presentadas por la hemoglobina y caseína, por lo tanto, son fuentes de proteína que son fácilmente hidrolizables, en *Solea senegalensis* la caseína, harina de pescado y concentrado proteico de soya tuvieron esta misma tendencia y representado una mayor disponibilidad de aminoácidos (Sáenz *et al.*, 2011), aunque en el presente estudio la hidrólisis de la PS fue baja, esto pueda deberse al tratamiento empleado en la producción del concentrado proteico de soya. Los valores GH de HP y HAVF son similares a los reportados para *Gadus morhua* (Tibbetts *et al.*, 2011) y *Oncorhynchus mykiss* (Yasumaru y Lemos, 2014).

El GH total obtenido en las fuentes de proteína vegetal fue bajo (<4%), es posible que la concentración de inhibidores enzimáticos en las muestras con proporción de enzima/sustrato utilizado sea lo suficiente como para reducir la hidrólisis (Francisco J Alarcón *et al.*, 2002), sin embargo, una pre-hidrólisis ácida en las fases alcalinas de los ciegos pilóricos e intestinos se obtienen valores más elevados y estables (Alarcón *et al.*, 2002; Tibbetts *et al.*, 2011; Yasumaru y Lemos, 2014). Una de las causas para que no se obtenga una buena hidrólisis enzimática puede ser la abundancia de determinados aminoácidos como lo son la lisina y arginina que en ellas trabaja la tripsina, tirosina y fenilamina con la quimiotripsina a la falta de estos sitios específicos en los que se unen las enzimas el grado de hidrólisis tiende a disminuir. (Sáenz de Rodrigáñez *et al.*, 2011), así como los factores anti nutricionales presentes en algunas fuentes de proteína vegetal que son inhibidores de las proteasas (Drew *et al.*, 2007; Francis *et al.*, 2001).

En la PS y GTF se presentaron valores de GH similares en *Rachycentron canadum*, pero valores más altos en *Oreochromis niloticus* (Yasumaru y Lemos, 2014), esta discrepancia puede deberse a que es un organismo herbívoro y puede asimilar mejor las fuentes de proteína vegetal .

En dietas de salmónidos utilizando harina de soya se determinó que su digestibilidad fue influenciada negativamente por la presencia de inhibidores de proteasa, principalmente la tripsina se ve afectada (Dimes *et al.*, 1996; Krogdahl *et al.*, 1994), aunque en *G. morhua* el GH mejoró cuando se utilizó aislados proteicos de soya y concentrado proteicos de soya, que provienen de un refinamiento en la proteína de la soya (Tibbetts *et al.*, 2011). En pargos *Lutjanus argentiventris* y *L. novemfasciatus* dietas con semillas de leguminosas causaron una inhibición mayor del 50 % de proteasas alcalinas (F. J. Alarcón, García-Carreño, & Navarrete Del Toro, 2001). En el presente estudio la PS y GTF presentaron el menor GH, posiblemente se debe a la presencia de diversos factores anti-nutricionales que inhiben la actividad de las proteasas.

8.2 Digestibilidad aparente.

En el presente estudio la DAMS de la HP fue similar a la presentada por HAVF, en las ultimas decadas las mejoras en el procesamiento de ingredientes como las fuentes de proteína terrestres pueden mejorar la digestibilidad aparente, en *O. mykiss* la harina de ave presentó una alta digestibilidad (Bureau *et al.*, 1999), en dietas para salmones se puede sustituir hasta un 50% de la proteína y lípidos sin efectos negativos en el crecimiento utilizando este tipo de fuentes de proteína (Hatlen *et al.*, 2014). Para la HAS se encontró similar a la descrita para salmónidos (Cho *et al.*, 1982) y mayor para la HAVF, pero las dos harinas se encuentran en menor medida a las presentadas para *L. guttatus* (Hernández *et al.*, 2015).

En peces carnívoros el aumento de la fibra cruda presentes en ingredientes de origen vegetal disminuye la DAMS, debido a que la fibra cruda está compuesta principalmente por celulosa y esta resulta no digestible (McGoogan y Reigh, 1996; Lee, 2002), sin embargo, se ha reportado que peces carnívoros como

Salminus brasiliensis presentar valores de DAMS más altos en fuentes vegetales que en fuentes animales, esto pueda suponer que los carbohidratos presentes en esas fuentes vegetales son digeridos de manera eficiente (Borghesi et al., 2009). La PCM obtuvo un valor de DAMS mayor que los presentados para varias especies como *O. mykiss*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Pagrus auratus*, *Salmo salar*, *Salvelinus alpinusk*, *Lates calcarifer* (Burr et al., 2011; Glencross, 2011; Glencross et al., 2004; Mwachireya et al., 1999; Tibbetts et al., 2004). Para PROT se encontró un valor menor al presentado por el robalo blanco *Centropomus undecimalis* (Lemus A. y Gaxiola C., 2015).

La DAP en las dos harinas de aves analizadas presentaron una amplia diferencia, Dong et al., 1993 reporta diferencias significativas entre las DAP de harinas de aves de diferentes fuentes para *O. mykiss*, en la cual, se obtuvieron mejores resultados las que presentaron porcentajes menores de cenizas, en nuestro estudio también se encontraron diferencias entre las dos fuentes de harina de ave teniendo mayor DAP la HAVF que contiene una menor cantidad de ceniza que HAS. La DAP de HAVF fue similar a las presentadas por *S. aurata* (Lupatsch et al., 1997), *Micropterus salmoides* (Portz y Cyrino, 2004), *P. auratus* (Booth et al., 2005), *S. brasiliensis* (Borghesi et al., 2009), *Acipenser baerii* (Liu et al., 2009), *Huso huso* (Safari et al., 2014) y *L. guttatus* (Hernández et al., 2015); aunque la DAP de la HAS obtuvo valores menores a los anteriormente mencionados, este presentó valores similares a *S. aequifasciata* (Chong et al., 2002) y *M. amblycephala* (Zhou et al., 2008). La harina de ave puede ser un buen sustituto para la harina de pescado (Rawles et al., 2010), y se ha logrado sustituir hasta un 90% sin afectar su crecimiento en el pargo *L. guttatus* (Hernández et al., 2014).

La DAP en la PCM fue alto (<90%), valores similares son descritos para *O. mykiss* (Glencross, 2011; Mwachireya et al., 1999), *P. aurata* (Glencross et al., 2004), *M. amblycephala* (Zhou et al., 2008), *S. salar* (Burr et al., 2011), para otras especies se reportan valores menores entre 63-81% como *M. aeglefinus* (Tibbetts et al., 2004), *S. alpinusk* (Burr et al., 2011), *L. calcarifer* (Glencross, 2011), *H. huso* (Safari et al., 2014) y *L. guttatus* (Hernández et al., 2015). El uso de la PCM por lo general esta restringido por sus factores anti-nutricionales

(Francis *et al.*, 2001), aunque se ha reportado que para *O. mykiss* niveles de glucosinolatos y compuestos fenólicos no afectan la digestibilidad de sus nutrientes y son más influyentes los carbohidratos o ácidos fíticos (Mwachireya *et al.*, 1999) y una inclusión de un 20% en su dieta no afecta el crecimiento (Thiessen *et al.*, 2003). En *Epinephelus morio* el uso de fitasa en la PCM mejoró notablemente su digestión (Silva *et al.*, 2014). Glencross *et al.*, 2004, reporta que para *P. auratus* diferentes procesamientos de la pasta de canola puede influir en la digestibilidad de sus nutrientes. Existen algunas discrepancias en la digestibilidad y uso de la PCM esto pueden deberse a diferencias de especies en su fisiología digestiva, procesamiento de las dietas, modo de recolección de heces y calidad de la harina, sin embargo, en el presente estudio el pargo canané *O. chrysurus* la pasta de canola fue bien digerida.

En el compuesto de PROT se obtuvo la menor DAP y esto es lo contrario a lo reportado por Lemus A. y Gaxiola C., 2015, para el robalo blanco *C. undecimalis*, a pesar de ser un organismo carnívoro, probablemente esto se deba a la forma en que puedan utilizar los nutrientes estas dos especies, de forma similar se reportado que para *S. salar* puede utilizar mejor los nutrientes de plantas terrestres que *S. alpinusk*.

La DAE presente en HAVF y HAS son similares con lo reportado para *O. tshawytscha* (Hajen *et al.*, 1993), *S. aurata* (Lupatsch *et al.*, 1997), *M. salmoides* (Masagounder *et al.*, 2009; Portz y Cyrino, 2004), aunque valores más altos se ha reportado para *P. auratus* (Booth *et al.*, 2005), *S. brasiliensis* (Borghesi *et al.*, 2009), *H. huso* (Safari *et al.*, 2014) y *L. guttatus* (Hernández *et al.*, 2015), sin embargo, la harina de ave son una buena fuente de energía para peces carnívoros y el pargo canané puede aprovechar bien esta recurso energético. La PCM obtuvo una DAE menor que la HAS y HAVF por 7 % - 9 % respectivamente, probablemente estas diferencias se deban a la cantidad de fibra presente en la PCM y esto cause un menor aprovechamiento de la energía en las fuentes vegetales para peces carnívoros (Cho *et al.*, 1982; McGoogan y Reigh, 1996), aunque en este estudio no se registró la digestibilidad aparente de carbohidratos y lípidos estos pudieron influenciar que las harinas de ave tuvieran una mayor DAE, sin embargo, la DAE de la PCM es menor a la presentada por *L. guttatus*,

este pargo presentó valores de DAE en harinas de soya y canola similares a ingredientes de origen animal terrestre. La DAE de PROT fue la más baja debido a su pobre DAMS que por lo general están relacionados contrario a lo reportado por (Lemus A. y Gaxiola C., 2015).

9.- Conclusiones

El presente estudio indicó que según los datos de digestibilidad *in vitro* con extractos -multi-enzimáticos del pargo canané es capaz de hidrolizar las fuentes de proteína animal terrestre y la harina de pescado de manera similar que fuentes de proteína purificadas, como la hemoglobina y caseína. Para las fuentes vegetales la capacidad de hidrólisis estuvo por debajo de un 50 %, para soya y gluten de trigo francés, con excepción de la pasta de canola. En este estudio la digestibilidad *in vitro* se utilizó como una forma de pre-selección de ingredientes. Con base en esto se escogieron las fuentes de proteína de HP, HAVF, HAS, PCM y PROT para ser evaluados en la digestibilidad *in vivo*.

De acuerdo con los resultados de digestibilidad aparente de materia seca, proteína y energía, el pargo canané puede aprovechar de una manera eficiente los nutrientes aportados por la HP, PCM y dentro las harinas de ave evaluadas, la HAVF resultó ser la más digestible, por lo tanto, se determina que dentro de las fuentes de proteínas disponibles en la Península de Yucatán, éstas tienen el mayor potencial como ingredientes para ser incluidas en dietas de pargo canané.

10. - Referencias.

Abbas, G., Siddiqui, P. J., y Jamil, K. (2012). The optimal protein requirements of juvenile mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* fed isoenergetic diets. *Pakistan Journal of Zoology*, 44(2), 469-480.

Adler-Nissen, J., (1986). *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. Elsevier, New York, NY (427 pp.).

Aksnes, A., Hjertnes, T., y Opstvedt, J. (1996). Comparison of two assay methods for determination of nutrient and energy digestibility in fish. *Aquaculture*, 140(4), 343–359. doi:10.1016/0044-8486(95)01200-1

Alarcón, F. J., García-Carreño, F. L., y Navarrete Del Toro, M. a. (2001). Effect of plant protease inhibitors on digestive proteases in two fish species, *Lutjanus argentiventris* and *L. novemfasciatus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 24(3), 179–189. doi:10.1023/A:1014079919461

Alarcón, F. J., Moyano, F. J., y Díaz, M. (2002). Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH-stat system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(7), 697–704. <http://doi.org/10.1002/jsfa.1100>

Allan, G. L., Parkinson, S., Booth, M. A., Stone, D. A., Rowland, S. J., Frances, J., & Warner-Smith, R. (2000). Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: I. Digestibility of alternative ingredients. *Aquaculture*, 186(3), 293-310.

Alliot, E., Pastoureaud, A., (1984). Les besoins alimentaires et leur couverture chez le bar et la daurade. In: Barnabe`, G., Billard, R. _Eds., *Aquaculture du Bar et des Sparides*. INRA Publ., Paris, pp. 337–349.

Alvarez-Lajonchere, L., L. Perez, y G. Hernandez. (1992). First positive results from induced spawning experiments with yellowtail snapper in Cuba. *Revista cubana de investigaciones pesqueras*. Havana 16:49-58.

Anderson, J. S., Lallb, S. P., Anderson, D. M., y Mcniven, M. A. (1993). Evaluation of protein quality in fish meals by chemical and biological assays. *Aquaculture*, 115, 305–325. [http://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90145-O](http://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90145-O)

AOAC. (1990) Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, 15th edn. AOAC, Arlington, VA.

Atkinson, L., Hilton, J. W., y Slinger, S. J. (1984). Evaluation of Acid-Insoluble Ash as an Indicator of feed digestibility in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41(9), 1384–1386.

Bai, S. C., Choi, S., Kim, K., y Wang, X. J. (2001). Apparent protein and phosphorus digestibilities of five different dietary protein sources in Korean rock fish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Aquaculture Research*, 32(Supplement 1), 99–105. <http://doi.org/10.1046/j.1355-557x.2001.00009.x>

Benetti, D. D., Orhun, M. R., Sardenberg, B., O'Hanlon, B., Welch, A., Hoenig, R., Zink, I., Rivera, J. A., Denlinger, B., Bacoat, D., Palmer, K. y Cavalin, F. (2003). Advances in hatchery and grow out technology of marine finfish candidate species for offshore aquaculture in the Caribbean. In *Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* (Vol. 54, pp. 475-487). Gulf and Caribbean Fisheries Institute.

Booth, M., Allan, G. L., y Anderson, A. J. (2005). Investigation of the nutritional requirements of Australian snapper *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider, 1801): apparent digestibility of protein and energy sources. *Aquaculture Research*, 36(4), 378–390. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01219.x>

Borghesi, R., Dairiki, J. K., y Cyrino, J. E. P. (2009). Apparent digestibility coefficients of selected feed ingredients for dourado *Salminus brasiliensis*. *Aquaculture Nutrition*, 15(5), 453–458. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00610.x>

Bureau, D. ., Harris, A., y Cho, C. (1999). Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 180, 345–358. doi:10.1016/S0044-8486(99)00210-0

Bureau, D. P., Kirkland, J. B., y Cho, C. Y. (1998). In “Energy Metabolism of Farm Animals” (K. J. McCracken, E. F. Unsworth, and A. R. G. Wylie, eds.), pp. 163–166. CAB International Press, Wallingford, UK.

Burr, G. S., Barrows, F. T., Gaylord, G., y Wolters, W. R. (2011). Apparent digestibility of macro-nutrients and phosphorus in plant-derived ingredients for Atlantic salmon, *Salmo salar* and Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Aquaculture Nutrition*, 17(5), 570–577. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00855.x>

Catacutan MR, Pagador GE y Teshima S, (2001). Effect of dietary protein and lipid levels and protein to energy ratios on growth, survival and body composition of the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* (Forsskal 1775). *Aquaculture Research*, 32(10):811-818.

Catacutan, M. R., y Pagador, G. E. (2004). Partial replacement of fishmeal by defatted soybean meal in formulated diets for the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* (Forsskal 1775). *Aquaculture Research*, 35(3), 299-306.

Cho, C. Y., Slinger, S. J., y Bayley, H. S. (1982). Bioenergetics of salmonid fishes: energy intake, expenditure and productivity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 73(1), 25–41. doi:10.1016/0305-0491(82)90198-5

Chong, A. S. C., Hashim, R., y Ali, A. B. (2002). Assessment of dry matter and protein digestibilities of selected raw ingredients by discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) using in vivo and in vitro methods. *Aquaculture Nutrition*, 8, 229–238.

Chu, Z. J., Yu, D. H., Yuan, Y. C., Qiao, Y., Cai, W. J., Shu, H., y Lin, Y. C. (2014). Apparent digestibility coefficients of selected protein feed

ingredients for loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture Nutrition*. doi:10.1111/anu.12174

Chu, Z. J., Yu, D. H., Yuan, Y. C., Qiao, Y., Cai, W. J., Shu, H., y Lin, Y. C. (2015). Apparent digestibility coefficients of selected protein feed ingredients for loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture Nutrition*, 21(4), 425–432. doi:10.1111/anu.12174

Claro, R. (1983). Ecología y ciclo de vida del caballero *Lutjanus griseus* (Linnaeus), en la plataforma Cubana. Identidad, distribución y hábitat, alimentación y reproducción. *Rep. Invest. Oceanol. Acad. Cienc. Cuba* 7:1-30.

Cocheret de La Morinière, E., Pollux, B. J. A., Nagelkerken, I., y Van der Velde, G. (2002). Post-settlement life cycle migration patterns and habitat preference of coral reef fish that use seagrass and mangrove habitats as nurseries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 55(2), 309-321.

Cocheret de la Morinière, E., Pollux, B. J. A., Nagelkerken, I., y Van der Velde, G. (2003). Diet shifts of Caribbean grunts (Haemulidae) and snappers (Lutjanidae) and the relation with nursery-to-coral reef migrations. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 57(5), 1079-1089.

Cocheret, E., Nagelkerken, I., van der Meij, H., y van der Velde, G. (2004). What attracts juvenile coral reef fish to mangroves : habitat complexity or shade ? *Marine Biology*, 144, 139–145. doi:10.1007/s00227-003-1167-8

Cui, X. J., Zhou, Q. C., Liang, H. O., Yang, J., y Zhao, L. M. (2010). Effects of dietary carbohydrate sources on the growth performance and hepatic carbohydrate metabolic enzyme activities of juvenile cobia (*Rachycentron canadum* Linnaeus.). *Aquaculture Research*, 42(1), 99-107.

Cuzon, G., Guillaume, J., y Cahu, C., (1998). Composition, preparation and utilization of feeds for crustacean. *Aquaculture* 124, 253-267.

Davis, D. A., K. L. Bootes, y C. R. Arnold. (2000). Snapper (Family Lutjanidae) culture. Pages 884-889 in R.R. Stickney, editor. Encyclopedia of aquaculture. John Wiley & Sons, Inc., New York, New York, USA.

Deng, J., Mai, K., Ai, Q., Zhang, W., Tan, B., Xu, W., y Liufu, Z. (2009). Alternative protein sources in diets for Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel): II. Effects on nutrient digestibility and digestive enzyme activity. *Aquaculture Research*, 41(6), 861–870. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02363.x

Diermayr, P., y Dehne, L., (1990). Controlled enzymatic hydrolysis of proteins at low pH values: 1. Experiments with BSA. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 190, 516–520.

Dimes, L. E., Haard, N. F., Arndt, R. E., y Dong, F. M. (1996). Estimation of Protein Digestibility IV. Digestive Proteinases from the Pyloric Caeca of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) Fed Diets Containing Soybean Meal. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 115(4), 533–540. doi:10.1016/S0305-0491(96)00189-7

Dimes, L. E., y Haard, N. F. (1994). Estimation of protein digestibility-I . Development of an *in vitro* method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 108(2-3), 349–362. [http://doi.org/10.1016/0300-9629\(94\)90106-6](http://doi.org/10.1016/0300-9629(94)90106-6)

Dong, F., Hardy, R. W., Haard, N. F., Barrows, F. T., Rasco, B. A., Fairgrieve, W. T., y Forster, I. P. (1993). Chemical composition and protein digestibility of poultry by-product meals for salmonid diets. *Aquaculture*, 116(2-3), 149–158. [http://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90005-J](http://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90005-J)

Drew, M. D., Borgeson, T. L., y Thiessen, D. L. (2007). A review of processing of feed ingredients to enhance diet digestibility in finfish. *Animal Feed Science and Technology*, 138(2), 118–136. doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.06.019

Emata, A. C., y Borlongan, I. G. (2003). A practical broodstock diet for the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*. *Aquaculture*, 225, 83–88. doi:10.1016/S0044-8486(03)00279-5

FAO. (2014). The state of world fisheries and aquaculture 2014. FAO. Roma.

Faulk, C. K., Holt, G. J., y Davis, D. A. (2005). Evaluation of fatty acid enrichment of live food for yellowtail snapper *Ocyurus chrysurus* larvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36(3), 271-281.

Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., y Carpenter, K. E. (1995). Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca: Pacífico centro-oriental. Volumen 3. FAO.

Forster, I. (1999). A note on the method of calculating digestibility coefficients of nutrients provided by single ingredients to feeds of aquatic animals. *Aquaculture Nutrition*, 5(2), 143.

Francis, G., Makkar, H. P. S., y Becker, K. (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 199(3-4), 197–227. doi:10.1016/S0044-8486(01)00526-9

García-Ortega, A. (2009). Nutrition and feeding research in the spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) and bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*), new species for marine aquaculture. *Fish physiology and biochemistry*, 35(1), 69-80.

Glencross, B. (2011). A comparison of the digestibility of diets and ingredients fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) or barramundi (*Lates calcarifer*) - the potential for inference of digestibility values among species. *Aquaculture Nutrition*, 17(2), 207–215. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00752.x>

Glencross, B. D., Booth, M., y Allan, G. L. (2007). A feed is only as good as its ingredients—a review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. *Aquaculture nutrition*, 13(1), 17-34.

Glencross, B., Hawkins, W., y Curnow, J. (2004). Nutritional assessment of Australian canola meals. I. Evaluation of canola oil extraction method and meal processing conditions on the digestible value of canola meals fed to the red seabream (*Pagrus auratus*). *Aquaculture Research*, 35(1), 15–24. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.00974.x>

Haard N.F. (1995). Digestibility and in vitro evaluation of plant protein for salmonid feed. In: *Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture*. Lim Ch. And Sessa D (eds). AOACS Press. Champaign, Illinois.pp. 199-219.

Hajen, W. E., Beames, R. M., Higgs, D. A., y Dosanjh, B. S. (1993). Digestibility of various feedstuffs by post-juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in sea water . 1. Validation of technique. *Aquaculture*, 112, 321–332.

Hatlen, B., Jakobsen, J.-V., Crampton, V., Alm, M., Langmyhr, E., Espe, M., Waagbø, R. (2014). Growth, feed utilization and endocrine responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets added poultry by-product meal and blood meal in combination with poultry oil. *Aquaculture Nutrition*, (Fowler 1991), n/a–n/a. doi:10.1111/anu.12194

Hemre, G. I., Mommsen, T. P., y Krogdahl, Å. (2002). Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition*, 8(3), 175-194.

Hernández, C., Hardy, R. W., Márquez Martínez, D. G., Domínguez Jimenez, P. V., y González Rodríguez, B. (2015). Evaluation of apparent digestibility coefficients of individual feed ingredients in spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Aquaculture Nutrition*. <http://doi.org/10.1111/anu.12214>

Hernández, C., Sanchez, Y., Hardy, R. W., Benitez, A., Domínguez, P., González, B., y Tortoledo, O. (2014). The potencial of pet-grade poultry

by-product meal to replace fish meal in the diet of the juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Aquaculture Nutrition*, 20, 623–631. <http://doi.org/10.1111/anu.12122>

Krogdahl, A., Berg, T., y Olli, J. (1994). Soybean proteinase inhibitors affect intestinal trypsin activities and amino acid digestibilities in. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 107(1), 215–219.

Krogdahl, Å., Hemre, G. I., y Mommsen, T. P. (2005). Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture nutrition*, 11(2), 103-122.

Lazo, J. P., y Mart, E. (2012). *In vitro* Protein Digestibility of Dietary Ingredients Throughout Ontogeny of California Halibut, *Paralichthys californicus*, Larvae, 43(1), 51–62.

Lee, M., y Degani, G. (1988). Poultry Meal and Poultry Oil as Sources of Protein and Lipid in the Diet of European Eels (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture*, 73(1-4), 177–187. doi:10.1016/0044-8486(88)90052-X

Lee, S. M. (2002). Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for juvenile and grower rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Aquaculture*, 207(1), 79-95.

Lemus, A., y Gaxiola, M., y (2015). Efecto de diferentes fuentes de proteína sobre la digestibilidad in vitro y aparente en juveniles del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*). Universidad Nacional Autónoma de México.

Liu, H., Wu, X., Zhao, W., Xue, M., Guo, L., Zheng, Y., y Yu, Y. (2009). Nutrients apparent digestibility coefficients of selected protein sources for juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*), compared by two chromic oxide analyses methods. *Aquaculture Nutrition*, 15(6), 650–656. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00634.x>

Lupatsch, I., Kissil, G. W., Sklan, D., y Pfeffer, E. (1997). Apparent digestibility coefficients of feed ingredients and their predictability in compound diets for gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture Nutrition*, 3(2), 81–89. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2095.1997.00076.x>

Masagounder, K., Firman, J. D., Hayward, R. S., Sun, S., y Brown, P. B. (2009). Apparent digestibilities of common feedstuffs for bluegill *Lepomis macrochirus* and largemouth bass *Micropterus salmoides* using individual test ingredients. *Aquaculture Nutrition*, 15(1), 29–37. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00565.x>

McGoogan, B. B., y Reigh, R. C. (1996). Apparent digestibility of selected ingredients in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. *Aquaculture*, 141(3-4), 233–244. doi:10.1016/0044-8486(95)01217-6

Miller, C. L., Allen Davis, D., y Phelps, R. P. (2005). The effects of dietary protein and lipid on growth and body composition of juvenile and sub-adult red snapper, *Lutjanus campechanus* (Poey, 1860). *Aquaculture Research*, 36(1), 52-60.

Moyano, F. J., Saéñz de Rodrigáñez, M., Díaz, M., y Tacon, A. (2014). Application of in vitro digestibility methods in aquaculture: constraints and perspectives. *Reviews in Aquaculture*, 6, 1–20. doi:10.1111/raq.12065

Mwachireya, Beames, Higgs, y Dosanjh. (1999). Digestibility of canola protein products derived from the physical, enzymatic and chemical processing of commercial canola meal in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) held in fresh water. *Aquaculture Nutrition*, 5(2), 73–82. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2095.1999.00089.x>

Nagelkerken, I., y Van der Velde, G. (2004). Are Caribbean mangroves important feeding grounds for juvenile reef fish from adjacent seagrass beds?. *Marine Ecology Progress Series*, 274, 143-151.

National Research Council, (1993). National Research Council Nutrient Requirements of Fish, National Academy Press, Washington, DC, p. 114

Nieto López, M., Cruz Suárez, L., Ricque Marie D., y Ezquerria M., (2005) Técnica de digestibilidad in vitro en ingredientes y alimentos para camarón. Ciencia UANL, 8 (1). ISSN 1405-9177

Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J. L., y Moon, T. W. (2012). Glucose metabolism in fish: a review. Journal of Comparative Physiology B, 182(8), 1015-1045.

Portz, L., y Cyrino, J. E. P. (2004). Digestibility of nutrients and amino acids of different protein sources in practical diets by largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepede, 1802). Aquaculture Research, 35(4), 312–320. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.00984.x>

Quartararo, N., Allan, G. L., y Bell, J. D. (1998). Replacement of fish meal in diets for Australian snapper, *Pagrus auratus*. Aquaculture, 166(3), 279-295.

Randall, J. E. (1967). Food habits of reef fishes of the West Indies. Stud. Trop. Oceanogr. 5: 665-847

Rawles, S. D., Thompson, K. R., Brady, Y. J., Metts, L. S., Gannam, a. L., Twibell, R. G., y Webster, C. D. (2010). A comparison of two faecal collection methods for protein and amino acid digestibility coefficients of menhaden fish meal and two grades of poultry by-product meals for market-size sunshine bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). Aquaculture Nutrition, 16(1), 81–90. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00643.x>

Riley, C. M., Holt, G. J., y Arnold, C. R. (1995). Growth and morphology of larval and juvenile captive bred yellowtail snapper, *Ocyurus chrysurus*. Fishery Bulletin, 93, 179-185.

Rincón, L. A., Brulé, T., Montero, J. L., y Pérez, E. (2009). Dieta de la Rabirrubia *Ocyurus chrysurus* (Lutjanidae: Lutjaninae) y su variación temporal en la Costa de Yucatán. In *Gulf and Caribbean Fisheries Institute* (Vol. 62, pp. 207–218).

Rungruangsak-Torrissen, K., Rustad, a, Sunde, J., Eiane, S., Jensen, H., Opstvedt, J., y Venturini, G. (2002). *In vitro* digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(6), 644–654. doi:10.1002/jsfa.1089

Sáenz de Rodrigáñez, M. Á., Medina, E., Moyano, F. J., y Alarcón, F. J. (2011). Evaluation of protein hydrolysis in raw sources by digestive proteases of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) using a combination of an *in vitro* assay and sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis analysis of products. *Aquaculture Research*, 42(11), 1639–1652. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02758.x

Safari, O., Naserizadeh, M., y Mohammadi Arani, M. (2014). Digestibility of selected feedstuffs in subadult Caspian great sturgeon, *Huso huso* using settlement faecal collection and stripping methods. *Aquaculture Nutrition*, n/a–n/a. <http://doi.org/10.1111/anu.12246>

Sargent, J. R., Henderson, R. J., y Tocher, D. R. (1989). In “Fish Nutrition,” 2nd ed. (J. E. Halver, ed.), p. 153. Academic Press, New York.

Silva, A. F., Escalante, K., Alvarez, C., Guerrero, M., Cuzon, G., y Gaxiola, G. (2014). Protein Digestibility by *in vitro* and *in vivo* Methods in Red Grouper *Epinephelus morio*. *Journal of Aquaculture Bamidgeh*.

Soletchnik, P., M. Susquet, E. Thouard, y J. P. Mesdouze. (1989). Spawning of the yellowtail snapper (*Ocyurus chrysurus* Bloch 1791) in captivity. *Aquaculture* 77:287-289.

Suárez, M. D., Sanz, A., Bazoco, J., y García-Gallego, M. (2002). Metabolic effects of changes in the dietary protein: carbohydrate ratio in eel (*Angilla anguilla*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*, 10(2), 143-156.

Sugiura, S. H., Dong, F. M., Rathbone, C. K., y Hardy, R. W. (1998). Apparent protein digestibility and mineral availabilities in various feed ingredients for salmonid feeds. *Aquaculture*, 159(3-4), 177–202. doi:10.1016/S0044-8486(97)00177-4

Tacon, A., y Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285(1-4), 146–158. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.08.015

Thiessen, D. L., Campbell, G. L., y Adelizi, P. D. (2003). Digestibility and growth performance of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with pea and canola products. *Aquaculture Nutrition*, 9(2), 67–75. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2003.00203.x>

Tibbetts, S. M., Lall, S. P., y Milley, J. E. (2004). Apparent digestibility of common feed ingredients by juvenile haddock, *Melanogrammus aeglefinus*. *Aquaculture Research*, 35(7), 643-651.

Tibbetts, S. M., Verreth, J. A. J., y Lall, S. P. (2011). *In vitro* pH-Stat protein hydrolysis of feed ingredients for Atlantic cod, *Gadus morhua*. 2. *In vitro* protein digestibility of common and alternative feed ingredients. *Aquaculture*, 319(3-4), 407–416. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.07.020>

Tocher, D. R. (1995). In “Biochemistry and Molecular Biology of Fishes” (P.W. Hochachka and T. P. Mommsen, eds.), Vol. 4. Metabolic and Adaptational Biochemistry, p. 119. Elsevier, Amsterdam.

Tocher, D. R. (2010). Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*, 41(5), 717-732.

Trejo-Martínez, J., Brulé, T., Mena-Loría, A., Colás-Marrufo, T., y Sánchez-Crespo, M. (2011). Reproductive aspects of the yellowtail snapper *Ocyurus chrysurus* from the southern Gulf of Mexico. *Journal of fish biology*, 79(4), 915-936.

Turano, M. J., Davis, D. A., y Arnold, C. R. (2000). Observations and techniques for maturation, spawning, and larval rearing of the yellowtail snapper *Ocyurus chrysurus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 31(1), 59-68.

Watanabe, W. O., Ellis, S. C., y Chaves, J. (2001). Effects of dietary lipid and energy to protein ratio on growth and feed utilization of juvenile mutton snapper *Lutjanus analis* fed isonitrogenous diets at two temperatures. *Journal of the World Aquaculture Society*, 32(1), 30-40.

Wee, K. L., (1992). Aquaculture nutrition research in Australia. In: G. L. Allan and W. Dall (Editors), *Proc. Aquaculture Nutrition Workshop*, Salamander Bay, 15-17 April 1991. NSW Fisheries, Brackish Water Fish Culture Research Station, Salamander Bay, Australia, p. 243-244.

Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Smith, D. y Sporns, P. (2005) Biochemical Compositional Analyses of Proteins, in *Handbook of Food Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.

Yasumaru, F., y Lemos, D. (2014). Species specific in vitro protein digestion (pH-stat) for fish: method development and application for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), cobia (*Rachycentron canadum*), and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 426-427, 74–84. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.01.012

Zhou, Q. C., Tan, B. P., Mai, K. S., y Liu, Y. J. (2004). Apparent digestibility of selected feed ingredients for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, 241(1), 441-451.

Zhou, Z., Ren, Z., Zeng, H., y Yao, B. (2008). Apparent digestibility of various feedstuffs for bluntnose black bream *Megalobrama amblycephala*. *Aquaculture Nutrition*, 14(2), 153–165. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00515.x>

11.- Anexos

Tabla 10.- Biometría de pargos canané capturados para la extracción de enzimas.

Organismo	Longitud Total	Longitud Furcal	Longitud estándar	Peso (gr)	Peso estomago (gr)	Peso Ciegos Pilóricos (gr)	Peso Intestino (gr)	Hígado (gr)	Grasa (gr)	Factor de condición	Índice de grasa viscerosomática (IGV)	Índice hepatosomático (IHS)
1	20.4	17.5	15.5	140.74	0.8663	0.6641	0.4395	1.656	6.858	1.66	4.87	1.18
2	27	23.5	22	214.76	1.6743	0.9162	1.1583	2.1746	19.2365	1.09	8.96	1.01
3	27	23	21.5	220.44	1.8357	0.6303	1.0513	1.5142	7.6912	1.12	3.49	0.69
4	23.8	20.9	19	146.38	1.2347	0.6769	0.8572	1.2623	11.5474	1.09	7.89	0.86
5	24	21	19.5	164.92	1.5872	0.785	1.3974	1.8549	11.9487	1.19	7.25	1.12
6	26.5	22	19	171.9	1.9799	0.8361	1.3165	2.0998	0.9999	0.92	0.58	1.22
7	23.2	20.2	18.5	142.83	1.8297	0.7492	0.7194	2.0316	9.8664	1.14	6.91	1.42
8	24.5	23	19	194	2.2932	0.8293	0.9224	1.7117	5.9706	1.32	3.08	0.88
9	26.6	23	21	200.59	1.5533	0.8706	1.5094	1.4153	5.9042	1.07	2.94	0.71
10	27.3	23	21.3	212.45	2.165	0.8212	1.1635	1.8341	8.8398	1.04	4.16	0.86
11	23.8	20.5	19	152.4	1.3384	0.79	1.1097	1.4628	10.134	1.13	6.65	0.96
12	21.5	18.2	16.8	107.91	1.1043	0.5757	0.8733	1.475	2.5876	1.09	2.40	1.37
13	24.3	21	19.2	163.11	1.5587	1.0142	0.981	1.0444	8.2517	1.14	5.06	0.64
14	23	20	18.5	133.1	1.4404	0.9174	1.4673	1.9293	5.4373	1.09	4.09	1.45
15	18	16	14	70.32	0.9033	0.4215	0.5011	0.6691	2.6432	1.21	3.76	0.95
16	20.4	17.5	16	121.7	1.1467	0.694	1.0236	1.9498	7.79	1.43	6.40	1.60
17	16	14.5	12.5	46.91	0.5953	0.1893	0.6475	0.4183	2.0275	1.15	4.32	0.89
18	12.1	10.8	9	22.29	0.1684	0.1322	0.2826	0.3988	0.4158	1.26	1.87	1.79
19	13	11.8	10.8	25.3	0.2902	0.1652	0.2477	0.2805	0.4828	1.15	1.91	1.11
20	13	11.5	10.5	27.11	0.3038	0.1865	0.3046	0.2608	0.3687	1.23	1.36	0.96

Procedimientos de análisis químico proximal en ingredientes y dietas.

Humedad.

Los métodos de secado son los más comunes para evaluar el contenido de humedad en las muestras. En este método se calcula la humedad por una pérdida de peso debida al calentamiento de la muestra. La humedad es removida de la muestra mediante una lámpara de halógeno integrada en el equipo y un vaporizador de humedad. Durante la operación de secado, la termobalanza marca Ohaus MB45 registro el peso inicial de la muestra, donde por diferencia de peso entre la muestra fresca y la muestra seca, se estima el contenido de humedad perdido y se expresa como porcentaje de humedad en la muestra.

Cenizas.

En este método toda la materia orgánica se oxida en ausencia de flama a una temperatura que fluctúa entre 550-600 °C; el material inorgánico que no se volatiliza a esta temperatura se conoce como cenizas. En general, para el análisis proximal de una muestra se expresa en términos de composición total de una muestra seca. Se puso a peso constante los crisoles, previamente identificados, durante 4 horas aproximadamente en la mufla a 550 °C, se dejó enfriar el crisol a 100 °C y se colocó en un desecador durante 20 min. Se pesó el crisol en una balanza analítica marca Ohaus EP214C se anotara el peso en un formato correspondiente y este paso se repitió dos veces más hasta que el peso de los crisoles quede constante. Se colocaron 3 g de muestra por crisol y esto se analizó por triplicado. Posteriormente se introdujo a la mufla durante 12 horas, cuidando que la temperatura no pase de 550 °C esto se realizó hasta conseguir unas cenizas blancas o ligeramente grises y homogéneas. Se bajó la temperatura a 100 °C y se dejó enfriar en desecador por 30 minutos y se pesó en la balanza analítica. La fórmula utilizada para determinar el porcentaje de cenizas es:

$$\% \text{ de cenizas} = \frac{B \times 100}{A}$$

A

A= Peso de la muestra en gramos.

B= Peso de las cenizas en gramos.

Lípidos.

Se utilizó el método oficial 920.39, 4.5.01 AOAC (1990). Los lípidos totales son extraídos por medio de un solvente orgánico como el hexano que está en contacto directo y constante con la muestra, a través del reflujo producido en un sistema cerrado, por medio de la evaporación y condensación del solvente sobre la muestra en un tiempo de 4 horas. La cuantificación de los lípidos totales se efectúa por un método gravimétrico, donde se pesa el contenido del aceite recuperado y se expresa como porcentaje de aceite en la muestra. Se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de lípidos} = \frac{\text{gramos de aceite extraído} \times 100}{\text{Gramos de muestra}}$$

Proteínas.

Se utilizó un analizador elemental, este tipo de análisis nos 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 está en los rangos 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 obtuvo el porcentaje de cada elemento a determinar contenido en la muestra.

Procedimiento para medir proteasa ácida y alcalina en estómago, ciego e intestinos en pargo canané.

Proteasa ácida

Se preparó el sustrato con un mililitro de hemoglobina al 1% en tampón glicina-HCl al 0.1 molar todo esto a pH 2, se le agregaron 5 µL del extracto enzimático (del estómago) todo esto en tubos eppendorf de 2 mL, luego se dejaron incubar por 5 min a 37 °C y se detuvo la reacción con 0.5 mililitros de ácido tricloroacético (TCA) al 20 %. Posteriormente se dejó reposar la mezcla de la reacción por 15 minutos a 4 °C para que se precipiten las proteínas, pasado el tiempo requerido los tubos eppendorf se centrifugan a 12,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos seguidos a 4 °C, se separa el sobrenadante y se coloca en las celdas de cuarzo para medir su absorbancia a 280 nm en el espectrofotómetro marca Genesys 10V.

7.3.2.- Proteasa alcalina.

En un tubo eppendorf se agregaron 0.5 mL de caseína al 1 % a pH 9 en 0.5 mL de tampón Tris-HCl 100 mM + CaCl₂ 10 mM a pH 9 a esto se le agregaron 10 µL de extracto enzimático (del intestino o ciegos pilóricos), todo esto se incubó a 37 °C durante 40 min. Se detuvo la reacción con 0.5 mL de TCA al 20 %, posteriormente se dejó reposar a 4°C por 15 minutos para que se precipiten las proteínas, luego de esto se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos se separó el sobrenadante y se colocaron en las celdas de cuarzo para medir su absorbancia a 280 nm en el espectrofotómetro marca Genesys 10V.

Procedimiento para calcular el porcentaje de cenizas insolubles en ácido.

- 1) Medir el peso de un crisol limpio y seco
- 2) Medir el peso de los ejemplares (S) 10, -20g dieta- o 4-8 g heces) en un crisol (C+S).
- 3) Colocar C+S en una estufa a 105 °C por 24 horas.
- 4) Enfriamiento C+S en un desecador a temperatura ambiente.

- 5) Recolectar el peso de C+S y calcular % MATERIA SECA (DM).
- 6) Colocar C+S del punto 5) en una mufla a 500°C por 4 horas.
- 7) Remover C+S de la mufla y enfriar en un desecador a temperatura ambiente.
- 8) Registro del peso de C+S y calcular el % de cenizas.
- 9) Remover todas las cenizas del punto 8) en un frasco de 200 ml usando un embudo.
- 10) Adicionar 100 ml de 4N de HCl al frasco.
- 11) Colocar los frascos en una plancha caliente y poner el contenido a hervir por aproximadamente 30 minutos en una campana de extracción.
- 12) Filtrar el contenido del frasco del punto 11, a través de papel filtro libre de cenizas (whatman No 40, medio rápido) en un frasco mientras el contenido está todavía caliente.
- 13) Usar agua destilada caliente (85-100°C) para enjuagar por fuera de los frascos y lavar los residuos del filtro.
- 14) Transferir los papeles filtro que contienen los residuos (Folt. It) del punto 12/13 dentro del crisol original.
- 15) Colocar Cenizas C+S toda la noche en la mufla a la 500°C.
- 16) Remover las C+S de la mufla y seguidamente enfriarán en el desecador a temperatura ambiente (1-2 hrs).