



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

Requerimiento de proteína en robalo blanco *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792), cultivado en alta y baja salinidad

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARTÍN ALBERTO ARENAS PARDO

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. OCTUBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México
Coordinación del Posgrado, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología,
Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510
Teléfono y Fax: (52) 56-22-5803, 5829, 5990 y 5991
Correo electrónico: posgrado@mar.icmyl.unam.mx
http://www.unam.mx/ciencias_mar_posgrado



Requerimiento de proteína en robalo blanco *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792), cultivado en alta y baja salinidad

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

MARTIN ALBERTO ARENAS PARDO

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

Agradecimientos

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 llevé a cabo todos mis estudios y experimentos de posgrado, con el apoyo financiero CONACyT-SAGARPA 164673 bajo la dirección de la Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés y con apoyo técnico de Dra. Claudia Durruty, M.A Jaime Suárez, M. En C. Adolfo Sánchez, Dr Juan Carlos Maldonado, M en C. Eduardo Pacheco, M. En C Gabriela Palomino y Tec Patricia Balám,

Al CONACyT por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

Un eterno agradecimiento a mi directora, la Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés, por brindarme la oportunidad de poder continuar con mi formación profesional.

A mi mamá, la señora Marisela Pardo Ramírez y mi hermano Javier Paul Arenas Pardo, por todo lo que me han enseñado y por el apoyo que me han brindado, en las buenas y en las malas.

Un infinito agradecimiento a Margarita Murúa Castillo, incondicional en todo momento, la pieza más importante en esta etapa de mi vida, también su familia por todo el apoyo que me han brindado, principalmente la señora Margarita Castillo y Agustín Murúa.

Un especial agradecimiento a la Dra. Maite Mascaró Miquelajauregui por su apoyo en las cuestiones estadísticas, su colaboración permitió plasmar información muy importante en este proyecto.

A mis amigos los meros: Álvaro, Humberto y Rubén, quienes hicieron de este proceso, una experiencia muy agradable. A los compañeros del cubículo de maestría, que nunca dejaron que el ánimo callera, siempre positivos, sobre todo en fechas de exámenes tutorales.

Un profundo agradecimiento a mi familia de Sisal, la familia Flores Puerto por haberme abierto las puertas de su casa y tratarme como un miembro más de la familia.

A las personas encargadas de que todo esté en perfectas condiciones en el Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, la Dra. Gloria Villaclara Fatjó, M. en C. Diana Juárez Bustos, Mtra. Chantal Ruíz Guerrero, Guadalupe Godoy Medina y Gabriela Almaraz Mejía.

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 bioquímicos requeridos en éste trabajo, a la M. en C. Martha Galindo Ortiz, M. en C. Karla Susana Escalante Herrera y la Bióloga Marina Elisa Chan Vivas, por sus asesorías en el laboratorio. Al M. en C. Jaime Suarez Bautista, por el apoyo brindado en las biometrías de los robalos (*Centropomus undecimalis*) durante el experimento y a los técnicos Adriana del Carmen Paredes Medina, Concepción Guadalupe Uc Burgos y al Dr. Juan Carlos Maldonado

Índice

Índice de tablas.....	6
Índice de figuras.....	8
Resumen.....	9
Abstract.....	10
1. Introducción	11
2. Antecedentes	13
2.1. Importancia económica de <i>Centropomus undecimalis</i>	13
2.2. Aspectos generales de <i>Centropomus undecimalis</i>	14
2.3. Clasificación taxonómica del genero <i>Centropomus</i>	16
2.4. Requerimientos de proteína en peces	17
2.5. Fuentes alternativas de proteína	18
2.6. Harinas de origen animal.....	19
2.7. Harinas de origen vegetal	20
2.8. Requerimiento de lípidos	21
2.9. Requerimiento de carbohidratos.....	22
2.10. Enzimas digestivas.....	23
2.11. Osmorregulación	25
3. Justificación	26
4. Hipótesis.....	26
5. Objetivo general.....	27
6. Objetivos particulares	27
7. Metodología	27
7.1. Obtención de los organismos.....	27
7.2. Sistema de cultivo	28
7.3. Aclimatación de los organismos.....	28

7.4.	Elaboración de las dietas.....	30
7.5.	Diseño experimental	31
7.6.	Parámetros zootécnicos.....	32
7.7.	Parámetros biológicos	33
7.8.	Parámetros hematológicos.....	33
7.9.	Composición proximal de los peces.....	34
7.10.	Actividad enzimática	35
7.11.	Preparación de los homogenizados	35
7.12.	Proteasas ácidas	35
7.13.	Proteasas alcalinas	36
7.14.	Tripsina.....	36
7.15.	Quimotripsina	36
7.16.	Leucina aminopeptidasa	37
7.17.	Lipasas	37
7.18.	α -amilasas	38
7.19.	Cálculo de las actividades enzimáticas	38
8.	Análisis estadístico	39
9.	Resultados	41
9.1.	Parámetros zootécnicos.....	41
9.2.	Parámetros hematológicos.....	47
9.3.	Análisis de condición	48
9.4.	Análisis bioquímicos	49
9.5.	Actividad enzimática	51
10.	Discusión	57
11.	Conclusiones	66
12.	Anexos	68
13.	Bibliografía	70

Índice de tablas

Tabla 1. Composición bioquímica del alimento Otohime EP3.....	28
Tabla 2. Formulación y análisis químicos de las dietas con diferente contenido de proteína.....	30
Tabla 3. Valores de las variables físicas y químicas del agua durante el cultivo de los juveniles de robalo blanco <i>C. undecimalis</i> cultivados en 3 y 35 ups, alimentados con cinco diferentes niveles de proteína durante 104 días.....	40
Tabla 4. Valores del peso inicial, final y ganancia de peso (GP) en juveniles de robalo blanco <i>C. undecimalis</i> cultivados en 3 y 35 ups, alimentados con cinco diferentes niveles de proteína durante 104 días.....	41
Tabla 5. Valores del factor de conversión alimenticia (FCA), consumo de alimento diario (CAD) y tasa de crecimiento (TCE) en juveniles de robalo blanco <i>C. undecimalis</i> cultivados en 3 y 35 ups, alimentados con cinco diferentes niveles de proteína durante 104 días.....	42
Tabla 6. Coeficientes (ordenada al origen y pendiente) de las regresiones correspondientes a las distintas combinaciones de salinidad y nivel proteico de la dieta de juveniles de <i>C. undecimalis</i>, estimados por el modelo lineal mixto. Intercepto: ln peso (g); pendiente: g/día.....	43
Tabla 7. Valores de probabilidad de los términos del modelo lineal mixto evaluado en los juveniles de robalo blanco <i>C. undecimalis</i> cultivados en 3 y 35 ups, alimentados con cinco diferentes niveles de proteína durante 104 días.....	46
Tabla 8. Valores de presión osmótica y hematocrito de los juveniles de robalo blanco <i>C. undecimalis</i> cultivados en 3 y 35 ups, alimentados con cinco diferentes niveles de proteína durante 104 días.....	47

Tabla 9. Valores de los índices de grasa mesentérica (IGM), Índice hepatosomático (IH) y Factor de condición (FC) de los juveniles de robalo blanco *C. undecimalis* cultivados en 3 y 35 ups, alimentados con cinco diferentes niveles de proteína durante 104 días.....48

Tabla 10. La tasa de eficiencia proteica (TEP) y la composición bioquímica en peso seco (proteína, lípidos y cenizas) del cuerpo completo de juveniles de robalo blanco *C. undecimalis* cultivados en 3 y 35 ups, alimentados con cinco diferentes niveles de proteína durante 104 días.....49

Tabla 11. Actividad enzimática de proteasas ácidas en estomago de juveniles de robalo blanco *C. undecimalis* cultivados en 3 y 35 ups, alimentados con cinco diferentes niveles de proteína durante 104 días...51

Tabla 12. Correlación de las diferentes enzimas digestivas con los componentes del PCA (análisis de componentes principales) en juveniles de robalo blanco *C. undecimalis* cultivados en 3 y 35 ups, alimentados con cinco diferentes niveles de proteína durante 104 días.....52

Tabla 13. Resultados del análisis PERMANOVA de la actividad de proteasas alcalinas totales, tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa, lipasas y α -amilasa por tratamiento, en juveniles de robalo blanco *C. undecimalis* cultivados en 3 y 35 ups, alimentados con cinco diferentes niveles de proteína (37, 42, 47, 52 y 57%) durante 104 días.....53

Índice de figuras

Figura 1. Distribución Geográfica del robalo blanco <i>Centropomus undecimalis</i> en las costas del Océano Atlántico (Rivas, 1986).....	14
Figura 2. Ciclo de vida del robalo blanco <i>Centropomus undecimalis</i>.....	15
Figura 3. Respuesta de crecimiento de juveniles de robalo blanco <i>Centropomus undecimalis</i> cultivado en 3 ups de salinidad y alimentado con 5 diferentes niveles de proteína durante 104 días; 37 (morado), 42 (rojo), 47 (naranja), 52 (verde) y 57 (azul). Eje Y representa el peso (transformados al logaritmo natural), el eje X representa el tiempo (cada unidad representa 15 días).....	44
Figura 4. Respuesta de crecimiento de juveniles de robalo blanco <i>Centropomus undecimalis</i> cultivado en 35 ups de salinidad y alimentado con 5 diferentes niveles de proteína durante 104 días; 37 (morado), 42 (rojo), 47 (naranja), 52 (verde) y 57 (azul). Eje Y representa el peso (transformados al logaritmo natural), el eje X representa el tiempo (cada unidad representa 15 días).....	45
Figura 5. Actividad enzimática en ciegos pilóricos de alcalinas totales, tripsina, amilasa, lipasas, leucina aminopeptidasa y quimotripsina en juveniles de robalo blanco <i>Centropomus undecimalis</i> cultivado en 3 y 35 ups de salinidad, alimentado con 5 diferentes niveles de proteína (57, 52, 47, 42 y 37%) durante 104 días.....	52
Figura 6. Actividad enzimática en intestino de alcalinas totales, tripsina, amilasa, lipasas, leucina aminopeptidasa y quimotripsina en juveniles de robalo blanco <i>Centropomus undecimalis</i> cultivado en 3 y 35 ups de salinidad, alimentado con 5 diferentes niveles de proteína (57, 52, 47, 42 y 37%) durante 104 días.....	54

Resumen

Se determinó el requerimiento de proteína dietética en 3 y 35 ups de salinidad sobre el crecimiento en juveniles de robalo blanco *Centropomus undecimalis*. Se formularon cinco dietas experimentales con un incremento en el contenido de proteína (37, 42, 47, 52 y 57%) y una concentración de lípidos que varió de 15.6 a 11.1%. Se utilizaron grupos de 15 peces por triplicado, distribuidos aleatoriamente en cada tratamiento con un peso promedio inicial de 11.85 ± 1.8 g, los cuales se cultivaron durante 104 días en tanques rectangulares de un volumen de 100 litros, en dos sistemas similares de recirculación. Basado en un modelo lineal mixto, el mejor crecimiento se registró en los peces alimentados con 57% proteína en cada salinidad, sin embargo fue mayor en 57:35 (proteína/salinidad) respecto a 52:3, en 3 ups los peces alimentados con 52 y 57% proteína registraron crecimientos similares. El factor de conversión alimenticia disminuyó en los peces alimentados con las dietas que contenían mayor cantidad de proteína, no obstante fueron menores en 35 ups respecto a 35. La tasa de crecimiento específico, el consumo de alimento, el hematocrito, la presión osmótica, el índice de grasa mesentérica y la composición bioquímica de lípidos fueron mayores en 35 ups. La actividad proteolítica en el tracto digestivo de robalo blanco fue mayor en 35 ups, a excepción de α amilasas y lipasas. La actividad de proteasas alcalinas totales (ciegos pilóricos) y quimotripsina aumentaron con el nivel de proteína, no obstante tripsina, leucina aminopeptidasa y lipasas se registró un comportamiento opuesto. La actividad proteolítica de estas enzimas fue mayor en ciegos pilóricos respecto a intestino. Estos resultados sugieren que el requerimiento dietético de proteína en robalo blanco es entre 52% y 57% en 3 ups de salinidad, en 35 ups no se encontró un resultado similar, por lo que posiblemente requieran mayor proteína dietética en esta condición, en base a los crecimientos y actividad proteolítica, se establece 35 ups como la mejor condición de cultivo para *C. undecimalis*, debido a una mayor eficiencia en el uso de los nutrientes del alimento, principalmente de proteína.

Abstract

The dietary requirement protein was determined in 3 and 35 ups salinity for optimal growth performance of juveniles common snock *Centropomus undecimalis*. Five experimental extruded diets were formulated to contain increasing levels of protein [37, 42, 47, 52 y 57% dry matter (DM)] and a lipid concentration ranged from 15.6 a 11.1% DM. Triplicate groups of 15 fish were randomly to each tratament with an initial average weight of 11.85 ± 1.8 g, were grown over 104 days in 100 L rectangular tanks in two similar recirculation systems. Based on a linear mixed model (LMM) the fish fed the diet 57% protein obtained the highest growth in both salinities, however 57:35 (protein/salinity) was higher than 57:3, the values observed in 3 ups 52% y 57% were similar. The feed conversion was significantly lower in fish fed higher protein level diets, however were lowest in 35 ups than those found in 3 ups. Growth rate, feed intake, haematocrit, mesenteric fat, lipid content of whole fish were highest in 35 ups. Proteolytic activity in the gastrointestinal tract of common snock was highest in 35 ups, except amylase and lipase. Non specific protease (pyloric caeca) and chymotrypsin increased with dietary protein, contrarily to trypsin, leucine aminopepdase, amylase and lipase. Proteolytic activity of these enzymes was higher in the pyloric caeca than intestine. These results indicate that the requirement of protein of common snock is between 52% and 57% in 3 ups but not in 35 ups, probably it require more protein in this condition. Based on growth and proteolytic activity, the best culture condition for *C. undecimalis* 35 ups, due to more efficient use of the feed nutrients, primarily of protein.

1. Introducción

La acuicultura es una de las actividades productoras de alimentos que más ha crecido en los últimos años, presentando una tasa promedio de crecimiento anual del 6.1%. La mayor producción la representan los peces de agua dulce, seguido por moluscos, crustáceos, peces diádromos y peces marinos (FAO, 2010). Los principales países que sobresalen en la producción de animales cultivados son China, India, Viet Nam, Indonesia, Bangladesh, Tailandia, Noruega, Egipto, Chile y Myanmar, representando el 88% del valor total de la producción mundial (FAO, 2011).

En 2011 un total 132.3 millones de toneladas, aproximadamente el 85% de la producción total pesquera se destinó para el consumo humano, el 15% restante equivalente a 23.9 millones de toneladas se destinó a la fabricación de harinas y aceite de pescado, principalmente en los países de América latina (FAO, 2010). Existe una fuerte dependencia de la acuicultura hacia las producciones pesqueras, especialmente de la pesquería de anchoveta, por ser la principal especie utilizada en la elaboración de harinas de pescado por sus características nutricionales.

Dentro de los subsectores de cría de animales, la acuicultura es la actividad que más depende del aceite y harina de pescado, principalmente el cultivo de camarón, peces marinos y salmones en todo el mundo (FAO, 2012). Esta dependencia ha originado con el paso de los años el aumento en el precio de este insumo, especialmente cuando las capturas de peces destinados a la elaboración de harinas de pescado disminuyen considerablemente. No obstante el uso de harina de pescado en la acuicultura se ha reducido gradualmente en los últimos 10 años (FAO, 2012).

Desde hace varias décadas se ha buscado sustituir la harina de pescado por fuentes alternas de proteína de origen animal y vegetal de bajo costo con un contenido nutricional similar a ésta, sin embargo el uso de estas últimas en la manufactura de alimentos balanceados representa varias desventajas, como el bajo contenido de proteína (excepto por los concentrados), deficiencia en aminoácidos esenciales y ácidos grasos, baja palatabilidad y digestibilidad, alta cantidad de fibra y carbohidratos, presencia de factores antinutricionales endógenos que alteran la digestión y el metabolismo de los organismos en cultivo (Sanz *et al.*, 2000).

Las principales fuentes alternas a la harina de pescado que han sido evaluadas en diferentes especies de peces, son las harinas de origen animal, como las harinas de subproductos de la carne, de aves y de plumas hidrolizadas (Fowler, 1991; Steffens, 1994; Bureau, 2000; Nengas *et al.*, 1999; Takagi *et al.*, 2000; Turker *et al.*, 2005; Rawles *et al.*, 2006; Subhadra *et al.*, 2006; Yigit *et al.*, 2006; Shapawiet *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Abdul Kader *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2011), de fuentes vegetales como la soya y canola (Storebakken *et al.*, 2000; Francis *et al.*, 2001; Fournier *et al.*, 2004; Dias *et al.*, 2005; Helland & Grisdale-Helland, 2006; Glencross *et al.*, 2011; Nagel *et al.*, 2012; Silva-Carrillo *et al.*, 2012; Slawski *et al.*, 2011; Tusche *et al.*, 2013) y de origen microbiano (FAO, 2012).

La formulación de dietas balanceadas con óptimos perfiles de aminoácidos y apropiada cantidad de proteína son requisitos indispensables para que el pez pueda canalizar de manera eficiente la proteína en crecimiento y retención de nitrógeno en forma de proteína. El requerimiento de proteína en peces ha sido para muchos investigadores objeto de estudio desde varias décadas. Para esto se han considerado tres aspectos importantes; la concentración de energía en

la dieta, la composición de aminoácidos de la proteína y la digestibilidad de la misma por parte del pez, sin embargo muchas ocasiones se sobre estima este requerimiento porque no se toma en cuenta alguno de estos tres aspectos (Wilson, 2012).

El presente estudio tiene como objetivo determinar el requerimiento de proteína en juveniles de robalo blanco *Centropomus undecimalis* en dos diferentes condiciones de salinidad (3 y 35 ups), utilizando fuentes de proteína alternas a la harinas de pescado, principalmente de origen animal y vegetal. También se evaluará el efecto que ejercen la salinidad y el contenido de proteína en el alimento sobre la actividad de seis diferentes enzimas digestivas (pepsina, proteasas totales, tripsina, quimiotripsina, leucina-aminopeptidasas, lipasas y α amilasas) en estómago, ciegos pilóricos e intestino.

2. Antecedentes

2.1. Importancia económica de *Centropomus undecimalis*

El robalo blanco *Centropomus undecimalis* es un pez marino con importancia recreativa en las costas de Florida, EUA y económica pesquera en el Golfo de México (Muller & Taylor, 2012), especialmente en los estados de Tamaulipas, Tabasco, Campeche y Veracruz (SAGARPA, 2012). En el estado de Tabasco desde hace varios años se ha practicado de forma artesanal el cultivo de peces del genero *Centropomus sp* en jaulas flotantes por pescadores de la región, esta actividad consiste en encierros de peces silvestres en las zonas ribereñas, sin embargo no se cuenta con un registro oficial de producción para esta actividad.

2.2. Aspectos generales de *Centropomus undecimalis*

El robalo blanco *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) es un depredador visual, de hábitos carnívoros con tendencia piscívora (McMichael *et al.*, 1989), se considera un depredador oportunista debido a su alimentación en el medio natural, el cual comprende 37 taxones, dentro de los cuales encontramos organismos pelágicos, demersales y bentónicos (Blewett *et al.*, 2006). Es un forrajero de comportamiento crepuscular-nocturno (Rock, 2009), posee una adaptación morfológica ocular que le permite detectar a sus presas en poca presencia de luz, debido a que posee una visión de tipo escotópica (Eckelbarger *et al.*, 1980).

Es una especie hermafrodita protándrica (Taylor *et al.*, 1996), diádroma, eurihalina (Perez-pinzon & Lutz, 1991) y estenoterma (Gilmore *et al.*, 1978) con distribución geográfica comprende desde Carolina del Norte hasta Rio de Janeiro, incluyendo las Bahamas, el Golfo de México y algunas islas de las Antillas (Figura. 1). Su abundancia y distribución tiene una estrecha relación con la presencia de ambientes costeros, salobres y dulceacuícolas donde la fluctuación de salinidad van de 0 hasta 45 ppm, la salinidad es un factor importante en su distribución (Rivas, 1986).

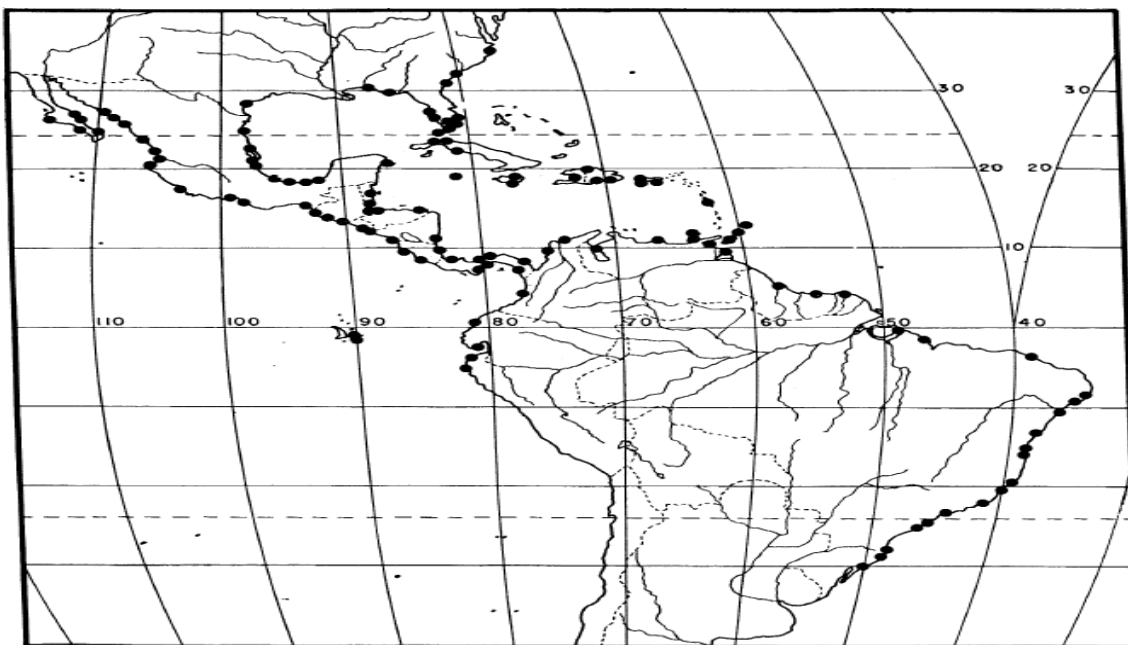


Figura 1. Distribución Geográfica del robalo blanco *Centropomus undecimalis* en las costas del Océano Atlántico (Rivas, 1986).

La zona de reproducción de esta especie es en las costas y la época en la cual se lleva a cabo en el golfo de México es en el mes de Abril a Septiembre (Figura. 2), con un pico de mayor actividad en Junio y Agosto cuando las temperaturas alcanzan los 25-30°C; similar ocurre en las costas de Florida, EUA (Taylor *et al.*, 1998; Lorán-Núñez *et al.*, 2012). La talla de primera madures para los machos es de aproximadamente 50 cm (4 años) y para hembras es de 80 cm (7.5 años), iniciando la reversión sexual macho-hembra después de los primeros desoves (Taylor *et al.*, 1996; Perera-García *et al.*, 2011)

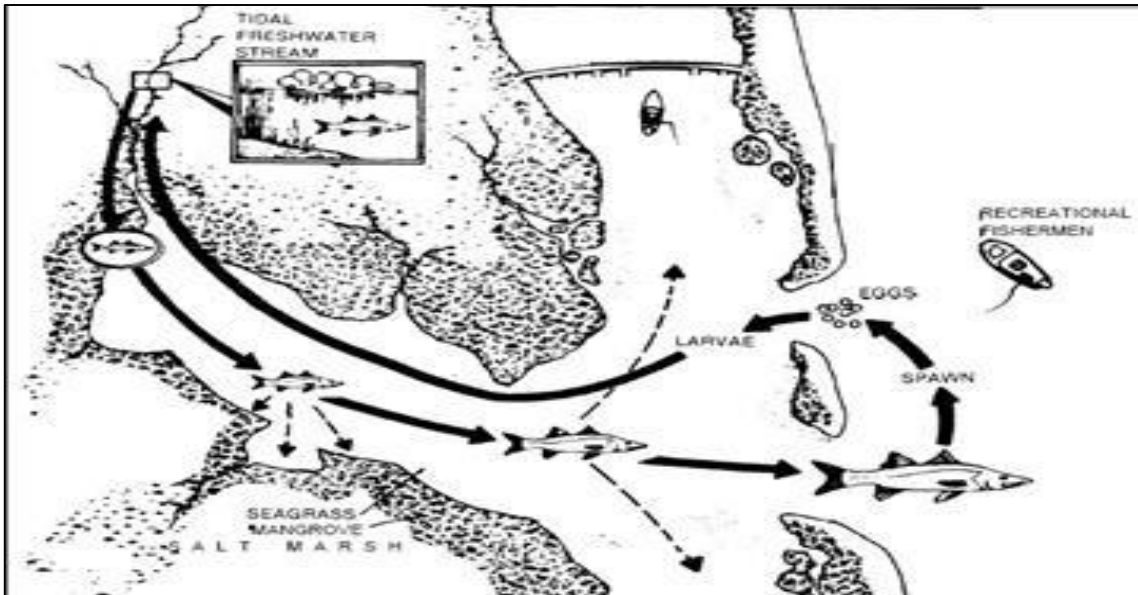


Figura 2. Ciclo de vida del robalo blanco *Centropomus undecimalis*.

2.3. Clasificación taxonómica del género *Centropomus*

La familia *Centropomidae* se encuentra constituida por 12 especies, representadas por un solo género *Centropomus*, la cual está confinada en la zona tropical y subtropical de América. Habita ambientes costeros, salobres y dulceacuícolas, en el Atlántico occidental se encuentra: *C. undecimalis*, *C. mexicanus*, *C. paralellus*, *C. poeyi*, *C. pectinatus* y *C. ensiferus*, por otra parte en el Pacífico Oriental encontramos a *C. viridis*, *C. unionensis*, *C. robalito*, *C. medius*, *C. armatus* y *C. nigrescens* (Rivas, 1986).

A continuación se desglosa la descripción taxonómica de la familia *Centropomidae* y género *Centropomus* (Nelson, 2006):

Phylum	Chordata
Subphylum	Craniata
Superclase	Gnatostomata
Clase	Actinopterygii
Subclase	Neopterygii

División	Teleostei
Subdivisión	Euteleostei
Superorden	Acanthopterygii
Serie	Percomorpha
Orden	Perciforme
Suborden	Percoidei
Familia	Centropomidae (Poey, 1868)
Género	<i>Centropomus</i> (Lacepède, 1802)
	<i>Centropomus mexicanus</i> (Bocourt, 1868)
	<i>Centropomus paralellus</i> (Poey, 1860)
	<i>Centropomus poeyi</i> (Chávez, 1961)
	<i>Centropomus pectinatus</i> (Poey, 1860)
	<i>Centropomus ensiferus</i> (Poey, 1860)
	<i>Centropomus undecimalis</i> (Bloch, 1792)
	<i>Centropomus viridis</i> (Lockington, 1887)
	<i>Centropomus unionensis</i> (Bocourt, 1868)
	<i>Centropomus robalito</i> (Jordan y Gilbert, 1881)
	<i>Centropomus medius</i> (Gunther, 1864)
	<i>Centropomus armatus</i> (Gill, 1863)
	<i>Centropomus nigrescens</i> (Gunther, 1864)

2.4. Requerimientos de proteína en peces

La proteína es uno de los insumos más caros en la acuicultura, el uso adecuado de este nutriente es un factor importante en el crecimiento y desarrollo de los organismos en cultivo. En peces carnívoros de aguas tropicales como de templadas es común observar altos requerimientos de

proteína en la dieta: barramundi *Lates calcarifer* (Catacutan & Coloso, 1995), trucha *Salmo trutta* (Arzel *et al.*, 1995), lubina *Dicentrarchus labrax* (Pérez *et al.*, 1997), dorada *Sparus aurata* L. (Santinha *et al.*, 1999), cabrilla *Paralabrax maculatofasciatus* (Alvarez-González *et al.*, 2001), lucioperca *Sander lucioperca* (Schulz *et al.*, 2007), lubina negra *Centropristis striata* (Alamet *et al.*, 2008), lenguado *Solea senegalensis* (Rema *et al.*, 2008), pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* (Abdo de la Parra *et al.*, 2010), chucumite *Centropomus parallelus* (Souza *et al.*, 2011) y pargo amarillo *Lutjanus argentimaculatus* (Abbas & Siddiqui, 2013), en los cuales excede el 40% en la dieta.

El robalo blanco *C. undecimalis* es una especie carnívora con tendencia piscívora (McMichael *et al.*, 1989), por lo tanto el requerimiento de proteína en esta especie es alto, los estudios que se han realizado al respecto en diferentes condiciones de salinidad (dulce, salobre y marina), reportan requerimientos mayores al 50% de proteína en la dieta (Tucker, 1987; Cabrera & Amador del Angel, 1998; Soligo *et al.*, 2011; Gracia-López *et al.*, 2003), sin embargo no se ha establecido un requerimiento de proteína específico para esta especie.

2.5. Fuentes alternativas de proteína

Actualmente la harina de pescado es el recurso más utilizado en la elaboración de alimentos balanceados en la acuicultura, especialmente en el cultivo de especies carnívoras (Tacon & Metian, 2008). El alto costo de este insumo derivado principalmente de la demanda, ha motivado a los nutricionistas en la búsqueda de fuentes alternativas de proteína de menor costo que sustituyan parcial o completamente la harina de pescado, sin embargo las características

nutricionales de estas fuentes alternas son deficientes en nutrientes esenciales para el organismo en cultivo.

Desde hace varias décadas se ha buscado sustituir la harina de pescado por proteína de origen animal y vegetal de bajo costo con similar contenido nutricional a ésta, no obstante su uso en la confección de alimentos balanceados representa varias desventajas como bajos contenido de proteína (excepto por los concentrados), deficiencia de ciertos aminoácidos esenciales y ácidos grasos, baja palatabilidad y digestibilidad, alta cantidad fibra y carbohidratos, presencia de factores anti-nutricionales endógenos que alteran la digestión y el metabolismo de los organismos en cultivo (Sanz *et al.*, 2000).

2.6. Harinas de origen animal

Las proteínas de origen animal (harina de carne, hueso, sangre, ave y plumas hidrolizadas) contienen altos niveles de proteína. Durante varios años se ha evaluado el porcentaje de estos insumos que puede ser utilizada en la elaboración de alimentos para peces carnívoros (Jamil *et al.*, 2007), los resultados obtenidos han sido favorables para algunas especies, con remplazos del 25-30% respecto a la harina de pescado, sin su comprometer crecimiento (Wang *et al.*, 2008; Abdul Kader *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2011).

Otra fuente de proteína de origen animal considerada como fuente alternativa a la harina de pescado es la de ave, la cual se produce a partir de los subproductos de desechos, tales como cabezas, patas y viseras. La harina de ave contiene altas cantidades de proteína y lípidos, pero es deficiente en aminoácidos como metionina y lisina. Esta deficiencia de aminoácidos esenciales en la dieta de algunos peces carnívoros solo permite reemplazos del

20-30% en el alimento (Fowler, 1991; Nengas *et al.*, 1999; Turker *et al.*, 2005; Yigit *et al.*, 2006).

La combinación de harina de ave con otras fuentes de proteínas vegetales o animales, así como también la suplementación de aminoácidos esenciales en los cuales son deficientes, ha permitido aumentar la cantidad de inclusión en la dieta, sin comprometer el crecimiento (Steffens, 1994; Rawles *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2011). En algunas especies de peces carnívoros se ha remplazo más del 50% y en otras hasta un 100%, con respuestas de crecimiento similares al utilizar harina de pescado como fuente única de proteína, sin tener que adicionar metionina o lisina en el alimento (Takagi *et al.*, 2000; Subhadra *et al.*, 2006; Shapawi *et al.*, 2007).

Los estudios que se han realizado en robalo blanco sobre la digestibilidad *in vitro* de fuentes de proteína alternas a la harina de pescado, han reportado resultados favorables en harinas de pollo, ave, suero de leche, gluten de maíz, canola, concentrado proteico de soya, cerdo, jaiba y sangre. Estos resultados sugieren que estas harinas podrían utilizarse como ingredientes y como fuentes de proteína en la formulación de alimentos balanceados para esta especie (Conchas-Frías, 2008; Lemus, 2015).

2.7. Harinas de origen vegetal

Actualmente existe una gran cantidad de harinas de origen vegetal que han sido utilizadas en la sustitución de harina de pescado, a continuación se citan algunas, soya *Glycine maxima*, girasol *Helianthus annuus*, cacahuete *Arachis hipogea*, canola *Brassica napus* y *B. campestris*, ajonjolí *Sesamum indicum*, *Spirulina sp*, *Clorella vulgaris*, *Cladophora glomerata*, *Hydrodictyon reticulatum* y *Mycrocystis aeruginosa*, lupinus *Lupinus albus*, haba *Vicia faba*,

trigo *Triticum aestivum*, maíz *Zea mayz*, papa *Solanum sp.*(García-Ortega *et al.*, 2010), sin embargo solo en una pequeña cantidad se ha profundizado al respecto.

Los almidones de trigo y maíz son los más ampliamente usados como fuentes de proteína alterna a la de pescado, principalmente por su alta digestibilidad en especies carnívoras. Pero debido a su deficiencia en aminoácidos esenciales como lisina y arginina, solo se sustituye de manera parcial en la dieta, en cantidades que van del 10-20%, debido a que altas cantidades en el alimento comprometen el crecimiento de los peces (Storebakken *et al.*, 2000; Fournier *et al.*, 2004; Helland & Grisdale-Helland, 2006).

Los concentrados de proteínas de origen vegetal como la soya, la papa y la canola contienen un perfil de aminoácidos esenciales similares a los de harina de pescado e incluso mayor, sin embargo en peces carnívoros la presencia de factores anti-nutricionales como inhibidores de proteasas, lecitinas, ácido fítico, saponinas, glucosinolatos, taninos, fitoestrógenos, ácido ciclopropenoico, gossipol y alcaloides, solo permiten una inclusión máxima del 20-30% en la dieta (Francis *et al.*, 2001; Glencross *et al.*, 2011; Nagel *et al.*, 2012; Slawski *et al.*, 2011; Silva-Carrillo *et al.*, 2012; Tusche *et al.*, 2013).

2.8. Requerimiento de lípidos

Los lípidos juegan un papel importante en la manufactura de los alimentos balanceados, son la mayor fuente de energía en la dieta de los peces marinos, particularmente en especies carnívoras debido a su baja eficiencia en la utilización de los carbohidratos (Oliva-Teles, 2012), la cantidad adecuada de lípidos en la dieta inducen un efecto ahorrador en el uso de proteína como fuente de energía por gluconeogénesis (Sargent *et al.*, 2002). La habilidad de

los peces para digerir y absorber los lípidos se basa principalmente en la composición de ácidos grasos, especialmente por el grado de insaturación y longitud de cadena (Bowyer *et al.*, 2013).

El requerimiento de ácidos grasos varía de acuerdo a la temperatura del agua, los peces de aguas frías requieren ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) del tipo omega tres, mientras que los de aguas cálidas requieren más del tipo omega seis (Webster & Lim, 2002). Por otra parte los peces de aguas dulce a diferencia de los marinos, tienen la capacidad de alargar y desaturar ácidos grasos de cadenas de 18 carbonos de la serie omega tres y seis altamente insaturados, como el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3) y docohexaenoico (22:6n-3), principalmente (Glencross, 2009).

Existe una gran variedad de aceites vegetales y animales, pero sólo unos pocos, como el aceite de pescado cubren por completo las necesidades del pez en el alimento, debido a la deficiencia en el contenido de ácidos grasos esenciales, principalmente omegas tres. Los ácidos grasos esenciales son importantes en la síntesis celular, el desarrollo neuronal, en el control endocrino, la regulación iónica, en la modulación del sistema inmune y en la reproducción (Oliva-Teles, 2012), por lo tanto una deficiencia de ácidos grasos esenciales en la dieta, puede afectar el crecimiento y adecuado desarrollo de los organismos en cultivo.

2.9. Requerimiento de carbohidratos

El requerimiento de carbohidratos en peces varía ampliamente dependiendo de sus hábitos alimenticios, cuando no se proveen carbohidratos en la dieta, las proteínas son utilizados en la obtención de energía e intermediarios metabólicos para la síntesis de componentes biológicamente importantes

(Wilson, 1994), sin embargo altos niveles de este nutriente en la dieta ocasiona en muchos de los casos bajos crecimientos acompañado de prolongadas condiciones de hiperglicemia, principalmente en especies de aguas frías (Walton, 1986; Viaplana-Marín *et al.*, 2005; Mohseni *et al.*, 2011), por otra parte en especies tropicales se estimula la síntesis de *novo* de lípidos y la disminución en el uso de aminoácidos como sustrato en los procesos de gluconeogénesis (Pérez-Jiménez *et al.*, 2009; Leung & Woo, 2012)

La utilización de carbohidratos en el pez está directamente relacionada con la complejidad de los mismos. Fuentes de carbohidratos simples (monosacáridos) en la dieta pueden ser absorbidos más rápidamente que fuentes complejas (polisacáridos), no obstante elevados niveles de glucosa en cortos periodos de tiempo pueden ser desechados antes de ser utilizados por las células del organismo (Cui *et al.*, 2010), debido a bajos niveles de insulina en la sangre o deficiencia en la recepción de la misma.

El robalo blanco *C. undecimalis* es una especie que aparentemente tolera altos porcentajes de carbohidratos en la dieta (Tucker, 1987; Soligo *et al.*, 2011; Gracia-López *et al.*, 2003), esta característica también se observa en otras especies carnívoras como sea bass *Dicentrarchus labrax* (Ballestrazzi *et al.*, 1994); dentex *Dentex dentex* (Pérez-Jiménez *et al.*, 2009), cobia *Rachycentron canadum* (Cui *et al.*, 2010), sea beluga *Huso huso* (Mohseni *et al.*, 2011), pargo rojo *Lutjanus argentimaculatus* (Abbas *et al.*, 2011) y pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* (Silva-Carrillo *et al.*, 2012).

2.10. Enzimas digestivas

Las enzimas en su mayoría son proteínas capaces de catalizar reacciones químicas específicas a una velocidad de aproximadamente 10^{12-20} veces más

rápido que las reacciones no catalizadas por estas, poseen un alto grado de especificidad respecto a sus sustratos, actúan en secuencias organizadas catalizando cientos de reacciones consecutivas sin degradarse (Lehninger, 2005). Las enzimas se clasifican de acuerdo a la Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica en 6 grupos: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas

Las enzimas encargadas de la digestión de los alimentos en el tracto digestivo de los organismos son las hidrolasas. Estas enzimas están compuestas por proteasas (pepsina, tripsina, quimotripsina, elastasa y colagenasa), peptidasas (carboxipeptidasas A y B, aminopeptidasas, di y tri peptidasas), lipasas (lipasas y estereasas) y glucosidasas (amilasa, quitinasa, celulasas y disacaridasas). En peces los procesos digestivos son muy poco conocidos respecto de los vertebrados superiores, sin embargo son muy similares cualitativamente entre vertebrados (Hidalgo *et al.*, 1999).

La actividad de las diferentes enzimas digestivas puede ser afectada por la concentración de sales disueltas en el medio, principalmente de proteasas alcalinas (Tsuzuki *et al.*, 2007), un ejemplo es la tripsina, la cual exhibe una relación directa con la salinidad del agua, presentando una actividad más elevada en bajas salinidades respecto a altas (Woo & Kelly, 1995; Moutou *et al.*, 2004). Este fenómeno indica que la digestibilidad y absorción nutrientes provenientes del alimento, puede ser afectada dependiendo de la salinidad del medio (Psochiou *et al.*, 2007).

Las características cualitativas y cuantitativas de los diferentes nutrientes en la dieta también ejercen un efecto sobre la composición y actividad de las diferentes enzimas en el tracto digestivo de los peces, como lo es el contenido de proteína cruda en la dieta (Alliot *et al.*, 1983; Woo & Kelly, 1995; Eusebio

& Coloso, 2002; Fountoulaki *et al.*, 2005; Papoutsoglou & Lyndon, 2006; Debnath *et al.*, 2007; Pérez-Jiménez *et al.*, 2009) y el origen de la misma (Rodiles *et al.*, 2012). El sistema digestivo de los peces, puede reflejar independientemente de su patrón digestivo, una amplia capacidad fisiológica de adaptación en relación a la calidad y cantidad de nutrientes en la dieta.

2.11. Osmorregulación

La salinidad es uno de los principales factores medioambientales que ejercen mayor presión en el desarrollo de los organismos acuáticos (Bœuf & Payan, 2001). El proceso de osmorregulación es una actividad fisiológica que involucra órganos como el esófago, ciegos pilóricos, intestino, branquias, riñón y vejiga urinaria en el transporte de iones de Na⁺ y Cl⁻ principalmente (Whittamore, 2012). Los mecanismos involucrados en este proceso dependen del medio osmótico en el que se encuentre el pez. Uno de los principales mecanismos en la regulación osmótica intra- y extracelular es el uso de aminoácidos como osmolitos celulares, principalmente glicina, alanina y taurina (Lasserre & Gilles, 1971; Assem & Hanke, 1982; Buentello & Gatlin, 2002).

La cantidad de energía utilizada por el pez en el proceso de osmorregulación depende de la salinidad del medio, debido al costo energético que representa el transporte activo de iones (Swanson, 1998; Bœuf & Payan, 200; Rocha *et al.*, 2005; Wuenschel *et al.*, 2005), en salinidades intermedias se ha observado un menor gasto en el proceso de osmorregulación, debido a que en esta condición la concentración de iones internos del pez y del medio son iguales (punto isotónicos), observándose mejores respuestas de crecimiento debido a una mayor canalización de energía al crecimiento (Bœuf & Payan, 200; Dietz *et al.*, 2013).

3. Justificación

El robalo blanco *Centropomus undecimalis* es una especie carnívora con alto potencial para ser cultivada de forma semi-intensiva e intensiva en diferentes condiciones de salinidad (Tucker, 1987), se adapta fácilmente al cautiverio y al consumo de alimento inerte (Gracia-López *et al.*, 2003; Soligo *et al.*, 2011), sin embargo existe una gran deficiencia en el conocimiento sobre el requerimiento nutricional de esta especie. Los estudios que se han realizado al respecto solo señalan que *C. undecimalis* demanda un alto requerimiento proteico en la dieta (Tucker, 1987; Cabrera y Amador, 1998; Gracia-López 2003; Soligo *et al.*, 2011) por lo que es necesario establecer un requerimiento específico de proteína y establecer cuál es la menor condición de cultivo, alta o baja salinidad.

4. Hipótesis

El requerimiento de proteína en los juveniles de robalo blanco *Centropomus undecimalis* cultivados en agua 35 ups será mayor que aquellos cultivados en 3 ups.

La actividad de pepsina, proteasas totales, tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasas, lipasas y α – amilasas en robalo blanco *Centropomus undecimalis*, se modificará con la salinidad del medio y el contenido de proteína en la dieta, lo cual repercutirá directamente en el crecimiento.

5. Objetivo general

Determinar el requerimiento de proteína en la dieta de juveniles de robalo blanco *Centropomus undecimalis* en 3 y 35 ups de salinidad.

6. Objetivos particulares

Determinar la mejor condición de cultivo en *Centropomus undecimalis*, alta o baja salinidad, a partir de la evaluación de parámetros zootécnicos.

Determinar el efecto de la dieta y la salinidad sobre el contenido bioquímico final de los juveniles de robalo blanco *Centropomus undecimalis*.

Evaluar el efecto del contenido de nutrientes en la dieta y salinidad del medio, sobre la actividad de siete diferentes enzimas digestivas:

Pepsina, proteasas totales, tripsina, quimotripsina, leucina-aminopeptidasas, lipasas y α – amilasas.

7. Materiales y métodos

7.1. Obtención de los organismos

El experimento se llevó a cabo en el Iglú de Nutrición ubicado dentro de las instalaciones de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de Sisal (UMDI), de la Facultad de Ciencias Yucatán. Los juveniles de robalo blanco *Centropomus undecimalis* que se usaron para este experimento se obtuvieron del Laboratorio de Reproducción ubicado dentro de las instalaciones de la UMDI. Los organismos se obtuvieron de reproductores silvestres de aproximadamente ocho años de edad, los cuales fueron inducidos a desovar mediante la aplicación de sGnRH α (Ibarra-Castro *et al.*, 2011), en el mes de octubre del 2013.

La fertilización de los huevos fue asistida, posterior a esto se incubaron a una temperatura de 28°C y una salinidad de 37 ppm. La eclosión ocurrió entre las 17 y 25 horas post-fertilización, después de 48 horas post-eclosión se les alimento con rotífero enriquecido hasta el día 18, del día 18 al 35 con artemia enriquecida y posteriormente con alimento balanceado marca Otohime. El contenido de proteína y el tamaño del alimento vario de acuerdo a la edad del pez, el primer alimento **S1** fue de 610-1410 µm con un contenido de proteína de 52 y 14% lípidos como mínimo, el segundo alimento **S2** fue de 920-1800 µm con un contenido similar al anterior, el tercero **EP1** tenía una medida de 1.7 mm, el cuarto **EP2** de 2.3 y el quinto **EP3** de 3.1 mm, con un contenido proteico de 48 y 14.5% de lípidos.

7.2. Sistema de cultivo

Los sistemas de recirculación estaban compuestos por 18 tinas rectangulares cada uno, con dimensiones de 0.73 metros de largo, 0.44 de ancho y 0.33 de altura, con capacidad de contener 106 litros. Cada sistema contaba con un filtro de arena marca Pentair de forma cilíndrica, un reservorio con capacidad de contener 555 litros de agua, una bomba eléctrica Pentair con 1.5 caballos de fuerza de potencia y un soplador eléctrico marca Baldor con 1.0 caballos de fuerza de potencia. El tamaño de la tubería del sistema de recirculación era de dos pulgadas con una reducción de una pulgada en las llaves de entrada y de dos en la salida de agua, cada sistema poseía un recambio de 3 litros de agua por minuto.

7.3. Aclimatación de los organismos

Un total de 648 organismos con peso aproximadamente de 8.0 g y cinco meses de edad, se trasladaron al Iglú de Nutrición de la UMDI el día 4 de marzo del

2014, se aclimataron al sistema de cultivo por un periodo de 35 días, durante este tiempo se les alimento *ad libitum* con pellet extruido marca Otohime EP3 cuatro veces en el transcurso del día en los horarios de 08:00, 11:30, 13:00 y 18:30 horas (Tabla No. 1). Del día 1 al 10 se adaptaron al sistema, del día 10 al 20 se aclimató la mitad de los juveniles de robalo en agua dulce, disminuyendo 3 ups de salinidad cada día hasta alcanzar la salinidad del agua dulce de la zona (3 ups). Del día 25 al 30 se empezó a sustituir el alimento Otohime por las dietas experimentales hasta reemplazar por completo este alimento.

Tabla 1. Composición bioquímica del alimento Otohime EP3.

Composición reportada (g/100 g dieta)	
Proteína min.	48
Lípidos min.	14.5
Fibra cruda max.	2.0
Ceniza cruda max.	14
Calcio min.	2.2
Fosforo min.	1.7
Humedad max.	6.5

Marbeni Nisshin Feed Co., Ltd, Tokio, Japon.
 Importado por Reed Mariculture, Inc. Cambell, CA, 95008, USA.

Se realizó una biometría el día 24 para seleccionar a los organismos que se utilizarían en el experimento, tomando en cuenta el peso y la longitud total individual de cada pez, para esto se utilizó un ictiometro convencional, una balanza eléctrica marca OHAUS® y esencia de clavo como anestésico 0.3 ml/L. Un total de 450 peces fueron seleccionados, 225 organismos por cada sistema con un peso promedio de 11.85 ± 1.8 g y longitud total de 12.01 ± 0.62 cm (120 ± 6.2 mm)

7.4. Elaboración de las dietas

Se formularon cinco dietas con diferente contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos (Tabla 2). Para su confección se utilizaron diferentes fuentes de proteína de origen animal y vegetal, alternas a la harina de pescado, las harinas protiblend⁶⁰ y de ave^{55c} fueron previamente tamizadas en un tamaño de 250 μm por partícula, posteriormente se mezclaron los ingredientes secos de la dieta A y E en un equipo Blazer-Modelo SSD-20A, en orden de mayor a menor porcentaje de insumo por dieta durante un intervalo de 30 minutos hasta quedar completamente homogéneas.

Las dietas B, C y D se prepararon a partir de mezclas de los ingredientes secos de las dietas A y E (Tabla. 2), en la dieta B se utilizaron 2/3 de la dieta A y 1/3 de la E, para la dieta C se utilizó 1/2 de la dieta A y E, finalmente para la dieta D se utilizaron 2/3 de la dieta E y 1/3 de la dieta A. Seguido de esto se les agregaron los ingredientes húmedos y se mezclaron nuevamente por 20 a 30 minutos aproximadamente, hasta alcanzar la consistencia adecuada. En la elaboración de los pellets, se utilizó un molino convencional para moler carne, con un cedazo de tamaño de poro de 2.4 μm .

Una vez que los pellets fueron elaborados se colocaron en charolas de aluminio cubiertas con papel arroz sobre las cuales se colocó una sola capa de alimento para evitar retención de humedad y tiempos de secado diferente al resto del alimento. Las charolas se colocaron dentro de un horno a una temperatura de 60 °C por un periodo de 18 horas. Una vez que paso el tiempo en el horno se retiraron las dietas y se dejaron enfriar a temperatura ambiente por un periodo de 30 minutos, posteriormente se almacenaron y guardaron en

bolsas de plástico previamente rotuladas en un lugar libre de humedad a una temperatura de 24° C.

Tabla 2. Formulación y análisis químicos de las dietas con diferente contenido de proteína

Formulación (g/100 g dieta en peso seco)	A 37%	B 42%	C 47%	D 52%	E 57%
Protiblend ^{60a}	20	24	26	28	32
CPSP ^{70b}	5	5	5	5	5
Harina de aves ^{55c}	25	28	30	32	35
Gluten de Trigo ^{80d}	5	9	12	14	18
Harina de Trigo ^{11e}	33	24	19	14	5
Aceite de Pescado ^f	6	4	3	2	0
Lecitina ^g	2	2	2	1	1
Premix ^h	2	2	2	2	2
Carboximetilcelulosa	2	2	2	2	2
Análisis proximales (peso seco g/100 g)					
Proteína	38.4 ± 0.80	43.2 ± 0.27	48.2 ± 0.62	51.8 ± 0.82	57.2 ± 0.26
Lípidos	15.6 ± 0.42	14.9 ± 0.16	14.3 ± 0.06	12.0 ± 0.10	11.1 ± 0.06
Ceniza	10.0 ± 0.05	11.4 ± 0.00	11.9 ± 0.06	12.4 ± 0.04	13.1 ± 0.00
Carbohidratos ^l	36	30.5	25.3	24.4	18.2
Energía (cal/g)	4720.7 ± 15.2	4678.1 ± 12.6	4642.4 ± 16.9	4670.5 ± 19.8	4613.9 ± 14.9

^{a y c} MaltaCleyton S.A. de C.V., Mérida, Yucatán, México.

^b Wachsen Industry CO., LTD., Quingdao, China.

^d Roquette Frères S.A., Francia.

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

^f Productos Químicos de Yucatán S.A. de C.V., Mérida, Yucatán, México.

^g Proteínas y Oleicos S.A. de C.V., Mérida, Yucatán, México.

^h DMS Nutritional Products México S.A. de C. V., Composición: Vitamina A, Vitamina D3, Vitamina E, , Vitamina K3, Vitamina B1, Vitamina B2, , Vitamina B12, Ácido Fólico, Vitamina B6, Ácido Pentoténico, Niacina, Biotina, Colina, Vitamina C, Hierro, Manganeso, Sodio, Cobre, Yodo, Zinc, Cobalto, Selenio, Molibdeno, Calcio, Fosforo, Magnesio, Sodio, Potasio, Carophyll, Lisina, Treonina, Carbonato de Calcio, Metionina, Triptofano, Lasolacid de Sodio, Monensina, Tilosina, Salinomicina, Avoparcina, Flavomicina, Ácido Arsanílico, Amprolio, Bacitracina de Zinc, Virginiamicina, Propinato de Calcio, Ácido Silícilico, Lignosulfonato, Lecitina, BHT, BHA, Probióticos, Ceta Gluconasa, Lipasa, Proteasas, Amilasas, Celulasas y Acemita.

^lCarbohidratos se calcularon como 100 – (% proteína + % lípidos + % cenizas)

7.5. Diseño experimental

Se utilizaron 450 organismos con peso promedio inicial de 11.85 ± 1.8 g de desviación estándar y una longitud total de 12.01 ± 0.62 cm (120 ± 6.2 mm) de desviación estándar, los cuales se distribuyeron en 15 tinas por sistema (agua dulce y marina), en una densidad de 15 organismos por cada 100 litros (150 org/m^3). Se asignaron cinco tratamientos por sistema, uno por cada nivel de proteína, los cuales fueron distribuidos al azar por triplicado cada uno. Se

alimentó cuatro veces al día en raciones iguales, en los horarios de 08:00, 11:30, 13:00 y 18:30 horas, la cantidad de alimento suministrada por día correspondía al 3% de la biomasa total por tratamiento.

Durante el periodo del experimento se midió dos veces al día la temperatura con un termómetro de mercurio, el oxígeno disuelto con un equipo YSI 55 y el pH con un equipo HANNA, en los horarios de las 08:00 y 17:00 horas, cada medición consistió en tres valores por tratamiento tomados en tinas al azar. El amonio, nitritos y nitratos se midieron semanalmente, para esto se utilizó un kiteXact® Eco-Check, USA. El objetivo de llevar un registro de las variables físicas y químicas de cada sistema fue con el fin de verificar que se encontrara en las condiciones apropiadas y requeridas para el cultivo.

7.6. Parámetros zootécnicos

Durante el experimento se realizaron ocho biometrías quincenales durante 104 días, en los cuales se registraba el peso y longitud total de cada pez. La cantidad de alimento consumido se calculó diariamente, al final de la segunda y cuarta alimentación se recolectó el alimento no consumido en charolas de aluminio previamente rotuladas de acuerdo al tratamiento correspondiente, seguido de esto se les retiraba la humedad en una estufa a 60 °C durante 24 horas para posteriormente registrar su peso seco.

Se evaluó la ganancia en peso diario mediante un modelo lineal mixto, también se calculó la ganancia de peso total (GP) el porcentaje de supervivencia (S), la tasa específica de crecimiento (TEC), el factor de conversión alimenticia (FCA) y el consumo de alimento diario (CAD), se obtuvieron a partir de las biometrías y la recolección de alimento. Se calcularon de la siguiente manera:

$$GP = (\text{biomasa final} - \text{biomasa inicial})$$

$$S = (\text{n}^\circ \text{ organismos finales} / \text{n}^\circ \text{ organismos iniciales}) * 100$$

$$FCA = (\text{alimento consumido} / \text{peso ganado})$$

$$CAD = (\text{alimento ingerido} / \text{número de peces}) / \text{días}$$

$$TEC = (\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{días} * 100$$

7.7. Parámetros biológicos

Se evaluó el índice de grasa mesentérica (IGM), el índice hepatosomático (IH), el factor de condición (FC) como indicadores del estatus nutricional del pez al final del cultivo, los cuales se calcularon de la siguiente manera:

$$IGM = (\text{peso de la grasa mesentérica} / \text{peso del pez}) * 100$$

$$IH = (\text{peso húmedo del hígado} / \text{peso eviscerado de los peces}) * 100$$

$$FC = (\text{peso final promedio} / \text{longitud total final promedio}^3) * 100$$

7.8. Parámetros hematológicos

Para evaluar los parámetros hematológicos, los peces se anestesiaron previamente con esencia de clavo a una concentración de 3 ml/L, posteriormente con una jeringa BD Ultra –Fine™ de un 1 ml, se les extrajo sangre de la arteria caudal, la cual se utilizó para medir presión osmótica (mOm kg^{-1}) en un equipo MICRO – OSMOMETER modelo 3MO plus. Para medir hematocrito se utilizaron tubos capilares microhematocrito heparinizados de una longitud de 75 mm con diámetro de 1.1 -1.2 mm, los cuales se centrifugaron a 2500 rpm durante 60 minutos, posteriormente fueron medidos con un vernier para calcular el porcentaje del paquete celular.

7.9. Composición proximal de los peces

Al inicio del experimento se tomaron 10 peces al azar, igual que al final, pero esta vez de cada tratamiento. Con el objetivo de conocer el efecto de la dieta y la salinidad sobre la composición bioquímica de los organismos durante 104 días de cultivo, se determinó el porcentaje de humedad por la pérdida de peso de la muestra por evaporización del agua, utilizando una estufa a 60 °C por 120 horas. La cantidad de cenizas totales se calculó por calcinación de la materia orgánica en una mufla a 500 °C por 5 horas. Para analizar la cantidad de lípidos totales se empleó el método de Goldfisch, utilizando n- hexano como solvente orgánico.

Para analizar el contenido de proteína del alimento y de los peces se utilizó un analizador elemental ECS-4010 Costech. Se basa en la combustión directa e instantánea de la muestra en una atmósfera de oxígeno puro, a temperaturas de 950-1400 °C. El C, H, N y S se transforman por combustión a CO₂, N₂ y SO₂. Los gases CO₂ y SO₂ son llevados por un gas portador (He) hasta unas celdas individuales de infrarrojos durante el proceso de combustión. Estos gases son eliminados y posteriormente se mide el N₂ por termo conductividad diferencial, luego fueron procesados teniendo en cuenta el peso de la muestra y los datos obtenidos a partir de un patrón, con esto se obtiene el porcentaje de cada elemento a determinar en la muestra. Utilizando los resultados de proteína de cada tratamiento se evaluó la eficiencia en que los organismos utilizaron la proteína del alimento, calculándose la tasa de eficiencia proteica (TEP) de la siguiente manera:

$$\text{TEP} = (\text{peso ganado} / \text{proteína consumida})$$

7.10. Actividad enzimática

7.11. Preparación de los homogenizados

Se tomaron 15 peces provenientes de cada tratamiento (5 por replica), previamente sometidos a un ayuno de 48 horas, antes de sacrificar a cada organismo se pesó y posteriormente se les retiró el estómago, ciego e intestino, los cuales se trituraron en nitrógeno líquido y almacenaron en tubos eppendorf de 10 ml a una temperatura de -80 °C. Para obtener el extracto enzimático, se le agregó buffer glicina-HCl 0.1 M a pH 3 al estómago y Tris-HCl 30 mM + CaCl₂ 12.5 mM pH 7.5 a ciego e intestino en una dilución de 1:5 y 1:2 respectivamente.

Después de agregar el buffer los extractos se homogenizaron con un ULTRA TURRAX® IKA T18 Basic durante 15 segundos en cada muestra, siempre en frío. Después se centrifugó a 13,000 rpm a una temperatura de 4°C por 20 minutos, al final se retiró el sobrenadante y se colocó en tubos eppendorf de 0.5 ml, los cuales se congelaron en nitrógeno líquido y se colocaron a una temperatura de -80 °C para posteriormente ser utilizados. La actividad enzimática para cada nivel de proteína fue de tres pooled con tres repeticiones cada uno por tratamiento, cada pooled contenía 5 órganos.

7.12. Proteasas ácidas

Para determinar la actividad de esta enzima se utilizó la técnica de Anson (1938), un 1 ml de hemoglobina en tampón glicina-HCl 0.1 M a pH 2 al 1%, al cual se le añadió 5 µl del extracto multienzimático y se incubó durante 5 minutos a 37°C. Para detener la reacción se le adicionó 0.5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20%. Después se dejó reposar la mezcla de reacción 15 minutos a 4°C, posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm durante 5

minutos, posteriormente se retiró el sobrenadante para medir la actividad. La actividad se definió como 1 μg de tirosina hidrolizada por minuto. Usando como coeficiente de extinción molar de 0.008 a 280 nm.

7.13. Proteasas alcalinas

Se utilizó el método de Kunitz (1947) modificado por Walker (1984), usando como sustrato caseína al 1% en tampón 100 mM Tris-HCl + 10 mM CaCl_2 a pH 9. Se le agregó 0.5 ml de caseína, más 0.5 ml de tampón Tris-HCl 100mM + CaCl_2 10 mM a pH 9 y 10 μl de extracto enzimático, se incubó por 10 minutos a 25 °C, posteriormente la reacción se detuvo con 0.5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos, la actividad se definió de acuerdo al apartado anterior.

7.14. Tripsina

Para determinar la actividad de esta enzima se empleó el método de Erlanger *et al.* (1961), usando como sustrato BAPNA (N- α - benzoil-DL-arginina 4-nitroanilida) al 3.5 mM en buffer Tris-HCl 50 mM + CaCl_2 10 mM a pH 8, el BAPNA se diluyó previamente en 200 μl de dimetilsulfoxido (DMSO). Para iniciar la reacción se mezcló 990 μl del sustrato con 10 μl del extracto enzimático y se incubó por 30 minutos a 25°C. La reacción se detuvo adicionando 250 μl de ácido acético al 30%, se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos. La actividad se definió de acuerdo con Dimes *et al.* (1994), como 1 μmol de p-nitroanilida hidrolizada por minuto, usando como coeficiente de extinción molar 8.2 a 410 nm.

7.15. Quimotripsina

Se determinó por el método de Lainé *et al.* (1993), utilizando como sustrato Suc-AAFP-pNA(N-succinyl-alanine-alanine-proline-phenylalanine-p-nitroanilide) en dimetilsulfoxido (DMSO), como buffer Tris 0.1 M a pH 8.

Para iniciar la reacción se agregó en una celda de cuarzo de un mililitro 960 μ l de buffer Tris y 10 μ l de Suc-AAFP-pNA, posteriormente se tapó con papel parafilm y se agitó, después se midió en el espectrofotómetro y se calibró a cero, seguido de esto se le agregaron 20 μ l del extracto, se agitó nuevamente y se midió su absorbancia en el minuto uno y dos a 405 nm. La actividad se definió como 1 μ mol de p-nitroanilida hidrolizada entre el minuto uno y dos, usando como coeficiente de extinción molar 8.2 a 405 nm.

7.16. Leucina aminopeptidasa

Para determinar la actividad de esta enzima se empleó el método de Maroux *et al.* (1973), usando como sustrato leucina p-nitroanilida 1 nM, el cual se disolvió previamente en 200 μ l de DMSO, y se aforó a 100 ml con buffer fosfato de sodio 50 mM a pH 7.2. La reacción se inició con 20 μ l de extracto enzimático en 980 μ l de sustrato, se incubó por 10 minutos a 25°C. La reacción se detuvo con 250 μ l de ácido acético al 30%, se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos. La actividad se definió de acuerdo a lo descrito en tripsina.

7.17. Lipasas

La actividad de esta enzima se determinó con el método de Gjellesvik *et al.* (1992) con las siguientes modificaciones, se utilizó como sustrato 4-nitrofenil caproato a una concentración de 100 mM en etanol en buffer Tris 0.5 M pH 7.4 con taurocolato de sodio a una concentración de 6 mM. La reacción se inició con 10 μ l del extracto enzimático y 200 μ l del sustrato, posteriormente se midió la absorbancia a 400 nm por 12 minutos en intervalos de un minuto en un espectro de microplaca marca BIO RAD modelo Benchmark Plus, utilizando un coeficiente de extinción molar de 16300.

7.18. α -amilasas

La actividad de esta enzima se determinó por la técnica de Somoyi-Nelson descrito por Robyt y Whelan (1968), almidón al 2% en solución fosfato de sodio y citrato de sodio 100 mM + NaCl 50 mM pH 7.5. La reacción inició agregando 0.125 ml de almidón soluble 1 %, 0.125 ml de tampón 0.1 M citrato-fosfato pH 7.0 y 5 μ l de extracto enzimático, después de 30 minutos de incubación a 37°C. La actividad se definió como un μ g de maltosa hidrolizada liberada por minuto, usando como coeficiente de extinción molar 0.0034 a 540 nm.

7.19. Cálculo de las actividades enzimáticas

Para determinar la actividad enzimática de cada extracto enzimático en unidades por ml y por g de tejido fresco se utilizaron las siguientes ecuaciones.

Ecuación 1. Cálculo de la actividad en unidades por ml.

$$\text{Unidades/ml} = \frac{\Delta \text{abs} \times \text{vol. final reacción (ml)}}{\text{CEM} \times \text{tiempo (min)} \times \text{vol. extracto (ml)}}$$

Donde:

Δ abs = incremento de absorbancia a una determinada longitud de onda

Volumen final = volumen final de la reacción (ml)

CEM = Coeficiente de extinción molar del producto obtenido calculado de la recta de regresión (ml x mg⁻¹ x cm⁻¹)

Tiempo = tiempo de incubación de la reacción catalizada (min)

Vol. Extracto= volumen de extracto multienzimático (ml)

Ecuación 2. Cálculo de la actividad en unidades por gramo de tejido fresco.

$$\text{Unidades/(g de tejido fresco)} = \frac{\text{unidades/ml}}{\text{g de tejido fresco/ml}}$$

8. Análisis estadístico

Al final del experimento a cada parámetro evaluado, incluyendo la actividad de proteasas ácidas, se les aplicó un ANOVA bifactorial (p 0.05), previo a esto se comprobó su normalidad con la prueba de Shapiro Wilk y la homocedasticidad con Bartlett, para determinar si existían diferencias significativas entre los diferentes tratamientos se utilizó HSD de Tukey. Para analizar el efecto de la salinidad del agua y la cantidad de proteína en el alimento sobre el incremento en peso (g) de juveniles de robalo blanco, *Centropomus undecimalis* a lo largo de 104 días de cultivo, se ajustó un modelo lineal mixto que incluyó el factor proteína (5 niveles: 37, 42, 47, 52, y 57), el factor salinidad (2 niveles: 3 y 35 ups) y el tiempo como variable continua que evaluó el incremento en peso en periodos de 15 días. El incremento en peso fue previamente transformado (logaritmo natural) y evaluado de manera individual en 15 juveniles mantenidos dentro de cada una de 3 peceras sometidas a cada una de las 10 combinaciones proteína-salinidad. El modelo estadístico utilizado puede representarse de la siguiente manera:

$$Y_i = \alpha + \beta_1 \text{ Tiempo} + \text{factor Proteína} + \text{factor Salinidad} + e_i$$

Dónde Y es el incremento en peso expresado como una función de la constante α y el tiempo, y podía diferir (o no) dependiendo de la combinación

de proteína y salinidad en cada combinación. De esta manera, los coeficientes parciales de la regresión (coeficientes β) o pendientes de las rectas ajustadas, representan la tasa de crecimiento de los peces (g/día) sometidos a cada combinación de nivel proteico y salinidad del agua. Si las pendientes de las rectas diferían, entonces las tasas de crecimiento en peso de los peces eran distintas; si las pendientes eran similares, los peces habían crecido a la misma tasa. El factor “pecera” fue incluido en el modelo como un factor aleatorio anidado en cada combinación y fue evaluado mediante una prueba de hipótesis (L. ratio). El coeficiente σ asociado a este factor estimó la variación del peso de los robalos entre peceras dentro de un mismo tratamiento.

El modelo de regresión fue ajustado usando un procedimiento de mínimos cuadrados generalizados (máxima verosimilitud restringida, REML), e incorporaron estructuras de varianza para asegurar que los requisitos de homocedasticidad eran cumplidos. Para escoger las estructuras de varianza óptimas, varios modelos con distintas estructuras fueron comparados utilizando el AIC (Criterio de Información de Akaike), así como pruebas de hipótesis que usaron la razón de verosimilitud (likelihood ratio) como estadístico. Una vez que la significancia de los coeficientes de la regresión había sido comprobada, el modelo fue validado mediante una inspección visual de los residuales estandarizados *versus* tiempo.

Para analizar descriptivamente en conjunto la actividad de las diferentes enzimas digestivas en ciegos pilóricos e intestino, se utilizó un análisis de componentes principales (PCA), previo a esto los datos de las diferentes enzimas digestivas fueron normalizados, restándoles su media y dividiéndolos entre su desviación estándar. Para evaluar la respuesta simultanea de las diferentes enzimas digestivas en cada nivel de proteína y salinidad, se utilizó un PERMANOVA en cada órgano por separado, para calcular el p-valor

(pseudo-F), se creó una distribución empírica a partir de permutaciones al azar de los datos de actividad enzimática, bajo la condición de la hipótesis nula.

Para establecer si existían diferencias significativas entre los diferentes niveles de proteína por órganos, se utilizaron pruebas t a partir de permutaciones.

9. Resultados

Los juveniles de robalo blanco *Centropomus undecimalis* cultivados en baja y alta salinidad, alimentados con diferentes contenidos de proteína durante un periodo de 104 días, presentaron el 100% de supervivencia en todos los tratamientos. Las variables de calidad de agua como la temperatura, oxígeno disuelto (OD), amonio y nitritos presentaron valores similares en las dos salinidades, sin embargo el pH y nitratos (Tabla 3), fueron mayores en 3 respecto a 35 ups, con valores de 9.2 ± 0.2 y 5.25 ± 2.3 mg/L respectivamente.

Tabla 3. Valores de las variables físicas y químicas del agua durante el cultivo de los juveniles de robalo blanco *C. undecimalis* cultivados en 3 y 35 ups, alimentados con cinco diferentes niveles de proteína durante 104 días.

Salinidad (ups)	Temp. (°C)	OD (mg/L)	pH	NH ⁺ ₄ (mg/L)	NO ⁻ ₂ (mg/L)	NO ⁻ ₃ (mg/L)	Dureza (mg/L)
3.1 ± 0.01	28.6 ± 1.0	6.2 ± 0.2	9.2 ± 0.1	0.04 ± 0.04	0.01 ± 0.00	5.25 ± 2.3	129.8 ± 4.8
35.1 ± 0.1	28.6 ± 1.0	6.2 ± 0.2	8.7 ± 0.1	0.05 ± 0.06	0.002 ± 0.01	1.14 ± 0.7	55.3 ± 3.7

Valores (media ± desviación estándar, $n = 98$ y cada n consiste en seis observaciones en salinidad, temperatura, OD y pH, $n = 13$ en NH⁺₄, NO⁻₂, NO⁻₃ y Dureza)

9.1. Parámetros zootécnicos

Las mayores ganancias en peso (GP) se registraron al aumentar la salinidad y el nivel de proteína en el alimento (Tabla 4). En 3 ups el mayor GP se registró en el tratamiento 3:57 (salinidad-nivel de proteína), el cual fue estadísticamente similar a 3:52 y diferente al resto. En 35 ups la GP no

presentó diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, sin embargo fueron numéricamente mayores aquellos tratamientos alimentados con la mayor cantidad de proteína dietética. Por otra parte, basado en el modelo lineal mixto, el menor crecimiento se observó en 3:37 con 0.046 g/día, seguido por 3:47 y 3:42, los tratamientos 35:42, 3:52, 35:37 y 3:57 fueron mayores y similares entre sí, por otra parte 35:47 y 35:52 presentaron crecimientos superiores al resto, no obstante el valor más alto fue registrado en 35:57 con 0.127 g/día (Tabla 5).

Tabla 4. Valores del peso inicial, final y ganancia de peso (GP) en juveniles de robalo blanco *C. undecimalis* cultivados en 3 y 35 ups, alimentados con cinco diferentes niveles de proteína durante 104 días.

Salinidad (ups)	Nivel de proteína (%)	Peso inicial (g)	Peso final (g)	GP (g)
3	37	12.1 ± 1.9	16.9 ± 0.6	4.9 ± 0.9 ^c
	42	11.8 ± 1.7	19.1 ± 1.5	7.2 ± 1.3 ^{bc}
	47	11.4 ± 1.8	18.2 ± 0.3	6.8 ± 0.6 ^c
	52	12.4 ± 1.9	25.6 ± 4.1	13.2 ± 3.5 ^{ab}
	57	12.1 ± 1.5	26.3 ± 1.2	14.1 ± 1.2 ^a
35	37	11.9 ± 1.9	25.3 ± 2.4	13.4 ± 2.1 ^{ab}
	42	11.8 ± 1.8	24.6 ± 2.3	12.8 ± 1.6 ^{ab}
	47	12.1 ± 2.1	28.5 ± 1.5	16.4 ± 1.1 ^a
	52	11.7 ± 1.8	28.9 ± 4.6	17.2 ± 4.7 ^a
	57	12.4 ± 2.2	35.7 ± 9.2	23.3 ± 8.9 ^a
ANOVA bifactorial				
Salinidad				0.0000
Nivel de proteínas				0.0000
Salinidad x Nivel de proteínas				0.0387

Valores (media ± desviación estándar, $n = 3$).

El factor de conversión alimenticia (FCA) aumentó al disminuir la salinidad y la proteína en el alimento, reportándose el valor más alto en 3:37 con 3.0 ± 0.4 (Tabla 5). En los tratamientos alimentados con los niveles más alto de proteína como 3:57, 35:52 y 35:57, se observó un FCA numéricamente más bajo que el resto, con valores de 1.3 y 1.2 respectivamente, sin diferir estadísticamente

con la mayoría de los tratamientos, a excepción de 3:42, 3:47 y 35:37 quienes presentaron un FCA más alto. El consumo de alimento diario (CAD) aumentó con respecto al nivel de proteína y la salinidad (Tabla 3), los valores extremos se registraron en 3:47 y 35:57 con 0.12 ± 0.01 y 0.26 ± 0.07 g respectivamente, numéricamente los tratamientos de la salinidad 35 ups fueron más alto que 3 ups, observándose CAD más elevados al aumentar el contenido de proteína en la dieta.

Tabla 5. Valores del factor de conversión alimenticia (FCA), consumo de alimento diario (CAD) y tasa específica de crecimiento (TEC) en juveniles de robalo blanco *C. undecimalis* cultivados en 3 y 35 ups, alimentados con cinco diferentes niveles de proteína durante 104 días.

Salinidad (ups)	Nivel de proteína (%)	FCA	CAD (g)	TEC (%)
3	37	3.0 ± 0.39^a	0.14 ± 0.01^{bcd}	0.33 ± 0.06^c
	42	1.9 ± 0.33^{bc}	0.13 ± 0.02^{cd}	0.46 ± 0.06^{bc}
	47	1.9 ± 0.23^b	0.12 ± 0.01^d	0.44 ± 0.04^{bc}
	52	1.5 ± 0.05^{bcde}	0.19 ± 0.05^{abcd}	0.67 ± 0.11^{ab}
	57	1.3 ± 0.10^{de}	0.18 ± 0.01^{abcd}	0.74 ± 0.05^{ab}
35	37	1.71 ± 0.10^a	0.22 ± 0.05^{ab}	0.72 ± 0.07^{ab}
	42	1.53 ± 0.04^{bcde}	0.19 ± 0.02^{abcd}	0.70 ± 0.06^{ab}
	47	1.41 ± 0.07^{cde}	0.22 ± 0.01^{abc}	0.83 ± 0.05^a
	52	1.28 ± 0.06^e	0.21 ± 0.06^{abc}	0.86 ± 0.16^a
	57	1.19 ± 0.14^e	0.26 ± 0.07^a	1.01 ± 0.26^a
ANOVA bifactorial				
-Salinidad		0.00000	0.00002	0.00000
-Nivel de proteínas		0.00000	0.03557	0.00000
-Salinidad x Nivel de proteínas		0.00581	0.25368	0.40733

Valores (media \pm desviación estándar, $n = 3$, cada n consiste en 15 observaciones, en CAD es de 94 observaciones. Los valores de FCA y CAD fueron transformados al logaritmo natural y TCE a la raíz del arcoseno para poder ser analizados estadísticamente

La TEC (%) presentó el comportamiento similar a lo registrado e CAD, obteniéndose los crecimientos más altos en los tratamientos de agua marina respecto a los de agua dulce, el valor más bajo fue de $0.33 \pm 0.06\%$ en 35:37 y la más alta de $1.01 \pm 0.26\%$ en 35:57, el cual fue estadísticamente similar a 35:52 y 35:47. Por otra parte los tratamientos con el nivel de proteína más alto

en agua dulce, fueron similares a los niveles más bajos en agua marina (Tabla 5). El tratamiento 3:42 presentó un mayor crecimiento que 3:47, pero no difirieron estadísticamente.

Tabla 6. Coeficientes (ordenada al origen y pendiente) de las regresiones correspondientes a las distintas combinaciones de salinidad y nivel proteico de la dieta de juveniles de *C. undecimalis*, estimados por el modelo lineal mixto. Intercepto: ln peso (g); pendiente: g/día.

Salinidad 3 ups			Salinidad 35 ups		
Nivel de Proteína	Ordenada al origen	Pendiente	Nivel de Proteína	Intercepto	Pendiente
37	2.53	0.046	37	2.50	0.098
42	2.48	0.069	42	2.47	0.091
47	2.45	0.061	47	2.46	0.104
52	2.51	0.096	52	2.45	0.109
57	2.47	0.099	57	2.47	0.127

Los valores de probabilidad asociada a los distintos términos en el modelo lineal mixto del incremento en peso (ln; g) de robalo blanco *Centropomus undecimalis* en función del tiempo, nivel de proteína y salinidad, fueron todos significativos a excepción de la interacción salinidad-proteína (Tabla 7). El factor “pecera” resultó significativo (L. ratio = 246.06; $p < 0.0001$), indicando que existe una variación del peso de los robalos entre peceras. Dicha variación fue considerada aleatoria en el modelo y fue estimada en un valor de 0.07 g.

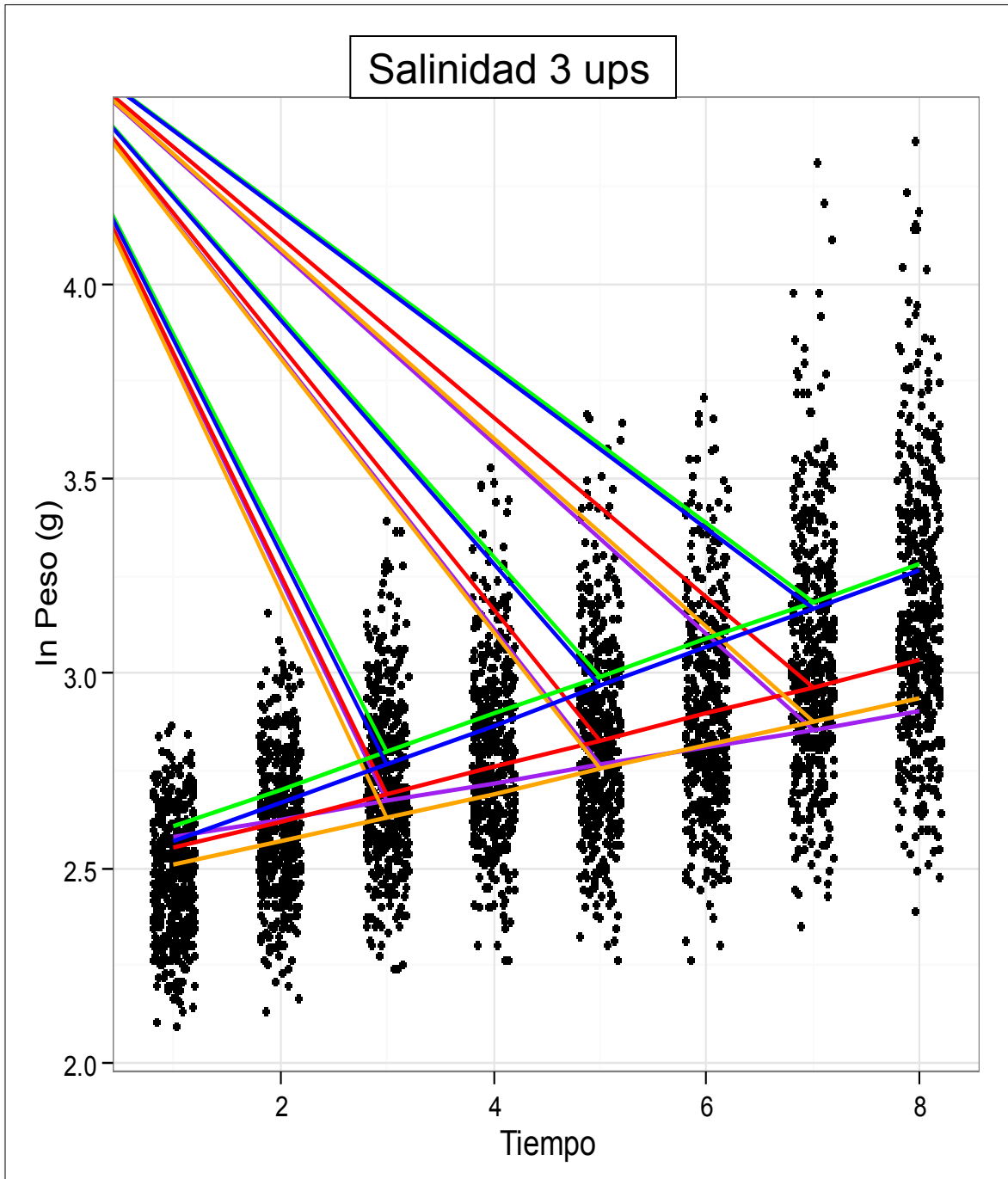


Figura 3. Respuesta de crecimiento de juveniles de robalo blanco *Centropomus undecimalis* cultivado en 3 ups de salinidad y alimentado con 5 diferentes niveles de proteína durante 104 días; 37 (morado), 42 (rojo), 47 (naranja), 52 (verde) y 57 (azul). Eje Y representa el peso (transformados al logaritmo natural), el eje X representa el tiempo (cada unidad representa 15 días).Figura

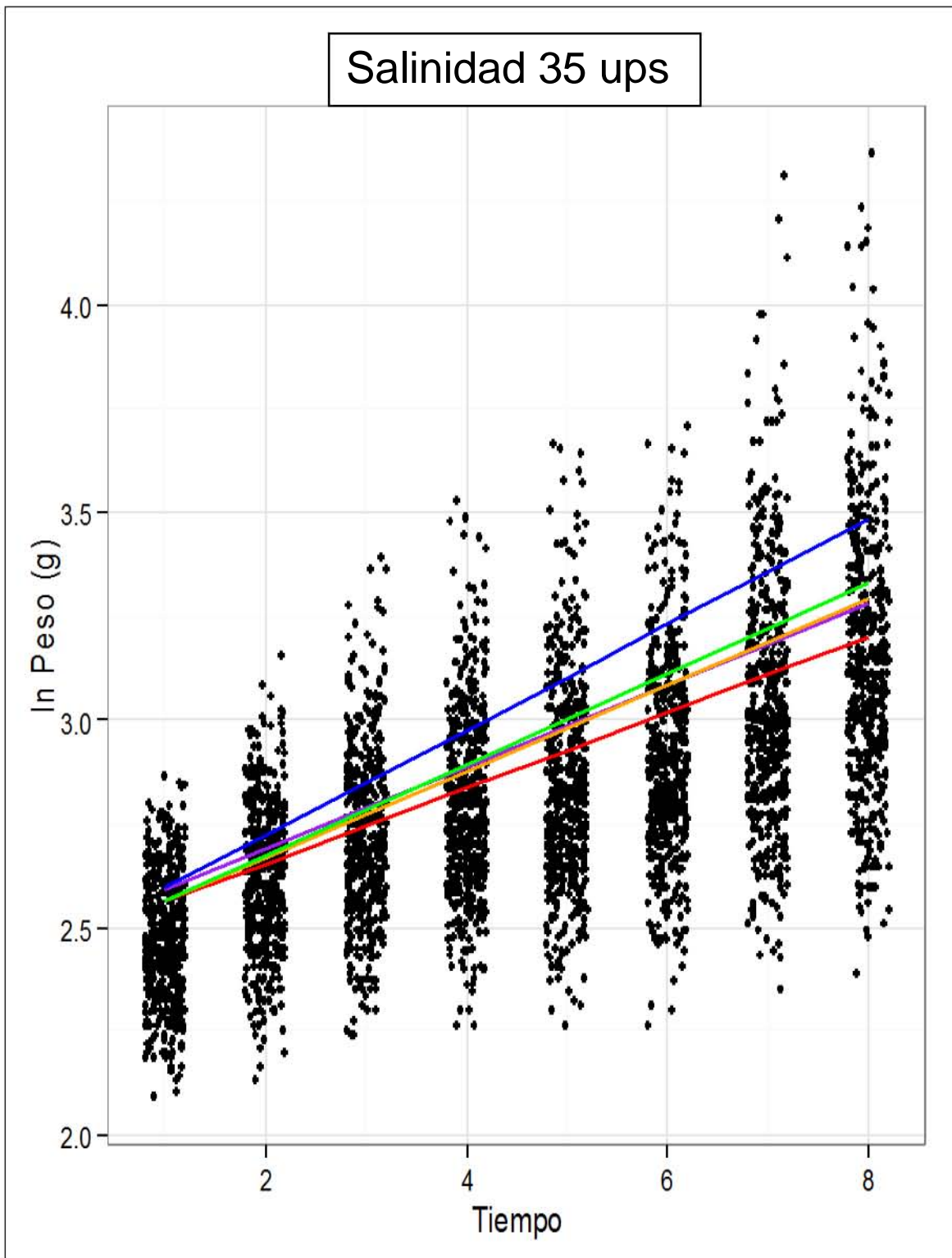


Figura 4. Respuesta de crecimiento de juveniles de robalo blanco *Centropomus undecimalis* cultivado en 35 ups de salinidad y alimentado con 5 diferentes niveles de proteína durante 104 días; 37 (morado), 42 (rojo), 47 (naranja), 52 (verde) y 57 (azul). Eje Y representa el peso (transformados al logaritmo natural), el eje X representa el tiempo (cada unidad representa 15 días).

9.2. Parámetros hematológicos

La presión osmótica en la sangre de los peces aumentó con la salinidad y el nivel de proteína en el alimento, registrándose diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Tabla 8). El valor más bajo lo presentó 3:37 con 361 ± 15.1 mOsm kg^{-1} , seguido por 3:47 con 387.5 ± 19.19 mOsm kg^{-1} , por otra parte los tratamientos 3:42, 3:52, 3:57, 3:37, 35:47, 35:52 y 35:57 fueron similares entre sí, con valores próximos a 390 mOsm kg^{-1} , sin embargo 35:47 fue numéricamente mayor al resto con 408.2 ± 13.1 mOsm kg^{-1} .

Tabla 7. Valores de probabilidad de los términos del modelo lineal mixto evaluado en los juveniles de robalo blanco *C. undecimalis* cultivados en 3 y 35 ups, alimentados con cinco diferentes niveles de proteína durante 104 días.

Termino	F	P
Ordenada al origen	46769	< 0.0001
Tiempo (T)	3394.67	< 0.0001
Salinidad (S)	15.94	< 0.001
Nivel de proteína (P)	4.46	< 0.01
T x S	118.32	< 0.0001
T x P	31.48	< 0.0001
S x P	1.63	0.21
T x S x P	5.39	< 0.001

El hematocrito expresado en porcentaje, presento una tendencia similar al de presión osmótica (Tabla 8). El valor más bajo se registró en 3:37 con un promedio de $31.4 \pm 3.6\%$, el cual no difirió de 3:52. Por otra parte los tratamientos 3:42, 3:47, 3:52 y 3:57 fueron similares entre sí, con promedio aproximado de 36%. En agua marina 35:47, 35:42 y 35:57 presentaron los porcentajes más altos de esta variable, obteniendo valores cercanos al 42%, por otra parte los tratamientos 35:37 y 35:52, fueron numéricamente inferiores, pero estadísticamente similares a los anteriores.

Tabla 8. Valores de presión osmótica y hematocrito de los juveniles de robalo blanco *C. undecimalis* cultivados en 3 y 35 ups, alimentados con cinco diferentes niveles de proteína durante 104 días.

Salinidad (ups)	Nivel de proteína (%)	Presión osmótica (mOsm kg ⁻¹)	Hematocrito (%)
3	37	361 ± 15.1 ^c	31.4 ± 3.6 ^d
	42	391.6 ± 18.9 ^{ab}	37.2 ± 3.4 ^{bc}
	47	387.5 ± 19.19 ^b	37.3 ± 3.8 ^{bc}
	52	389.5 ± 9.1 ^{ab}	35.9 ± 1.3 ^{cd}
	57	401.6 ± 17.2 ^{ab}	36.7 ± 4.1 ^{bc}
35	37	389.5 ± 12.3 ^{ab}	41.2 ± 3.2 ^{ab}
	42	408.2 ± 13.1 ^a	42.4 ± 3.0 ^a
	47	402.9 ± 12.2 ^{ab}	42.9 ± 2.4 ^a
	52	404.1 ± 10.4 ^{ab}	40.1 ± 3.9 ^{abc}
	57	403.9 ± 10.4 ^{ab}	42.4 ± 2.8 ^a
ANOVA bifactorial			
Salinidad		0.00000	0.00000
Nivel de proteínas		0.00000	0.00123
Salinidad x Nivel de proteínas		0.04875	0.06113

Valores (media ± desviación estándar, $n = 10$, en hematocrito cada n consiste en dos observaciones).

9.3. Análisis de condición

Se observó que la salinidad del agua y el nivel de proteína en el alimento ejercen un efecto sobre los índices biológicos. En el IH se registró el valor más alto y bajo en 35:37 y 3:37, con 1.28 ± 0.2 y 0.76 ± 0.2 respectivamente. El resto de los tratamientos fueron similares entre sí, solo 35:47 fue mayor de 3:52 y 35:52 (Tabla 9). El FC aumentó con la salinidad y nivel proteína, obteniéndose el valor más alto en 35:47 y 35:57 (0.66), sin ser diferentes de 3:52, 3:57, 35:37 y 35:42, solo de 3:42 y 3:47, tratamientos que fueron similares a 3:37, el cual obtuvo el valor más bajo con 0.59 ± 0.01 (tabla 9).

Se observó un incremento en el índice de grasa mesentérica al aumentar la salinidad del agua y disminuir la proteína en el alimento. En 3 ups se presentaron los valores más bajos (aproximadamente 1.6%), a excepción del 3:37 el cual fue similar a los tratamientos de 35 ups (Tabla 9). El valor más

alto se registró en 35:42 con $2.43 \pm 0.8\%$, sin embargo fue similar a 3:37, 35:37, 35:47 y 35:57, difiriendo de 35:52, tratamiento que obtuvo el valor más bajo de esta salinidad, el cual no fue diferente del resto de los tratamientos.

Tabla 9. Valores de los índices de grasa mesentérica (IGM), Índice hepatosomático (IH) y Factor de condición (FC) de los juveniles de robalo blanco *C. undecimalis* cultivados en 3 y 35 ups, alimentados con cinco diferentes niveles de proteína durante 104 días.

Salinidad (ups)	Nivel de proteína (%)	IGM (%)	IH (%)	FC
3	37	1.78 ± 0.5^{ab}	0.76 ± 0.2^d	0.59 ± 0.01^d
	42	1.55 ± 0.5^b	1.02 ± 0.1^{bc}	0.61 ± 0.01^{cd}
	47	1.48 ± 0.4^b	1.09 ± 0.2^{abc}	0.62 ± 0.01^{cd}
	52	1.57 ± 0.4^b	1.00 ± 0.2^{bc}	0.63 ± 0.01^{bc}
	57	1.39 ± 0.6^b	1.02 ± 0.2^{bc}	0.64 ± 0.00^{abc}
35	37	2.35 ± 0.7^a	1.28 ± 0.2^a	0.64 ± 0.01^{abc}
	42	2.43 ± 0.8^a	1.15 ± 0.2^{bc}	0.63 ± 0.01^{abc}
	47	2.27 ± 0.6^a	1.13 ± 0.1^{abc}	0.66 ± 0.01^a
	52	1.72 ± 0.5^{ab}	0.94 ± 0.2^{cd}	0.65 ± 0.01^{ab}
	57	1.84 ± 0.5^{ab}	0.99 ± 0.2^{bc}	0.66 ± 0.01^a
ANOVA bifactorial				
Salinidad		0.00000	0.00003	0.00000
Nivel de proteínas		0.00773	0.00776	0.00000
Salinidad x Nivel de proteínas		0.15012	0.00000	0.26930

Valores (media \pm desviación estándar, $n = 10$, IGM y IH, en FC $n = 3$, cada n consiste en 15 observaciones).

9.4. Análisis bioquímicos

La cantidad de lípidos registrados al final del cultivo, fue similar en los organismos cultivados en 3 ups de salinidad (aproximadamente 15.0%), con una ligera tendencia de aumento respecto a la proteína (Tabla 10). Por otra parte, en los peces de 35 ups de salinidad, se registraron los más altos niveles de lípidos, aumentando de manera significativa al disminuir el nivel de proteína en el alimento. El valor más alto registrado para esta salinidad fue en

35:37 con $20.6 \pm 0.02\%$, disminuyendo considerablemente a $17.1 \pm 0.1\%$ en 35:57, tratamiento que presentó el valor más bajo en esta salinidad.

Tabla 10. La tasa de eficiencia proteica (TEP) y la composición bioquímica en peso seco (proteína, lípidos y cenizas) del cuerpo completo de juveniles de robalo blanco *C. undecimalis* cultivados en 3 y 35 ups, alimentados con cinco diferentes niveles de proteína durante 104 días.

Salinidad (ups)	Nivel proteína (%)	Proteína (%)	Lípidos (%)	Cenizas (%)	TEP
<u>inicio</u>		<u>46.9 ± 0.5</u>	<u>21.7 ± 0.39</u>	<u>18.2 ± .05</u>	
3	37	64.7 ± 6.6 ^a	15.7 ± 0.10 ^f	21.8 ± 0.28 ^{ab}	0.11 ± 0.02 ^e
	42	61.8 ± 8.7 ^a	15.1 ± 0.09 ^h	22.4 ± 0.07 ^a	0.16 ± 0.02 ^{cd}
	47	64.5 ± 6.6 ^a	15.2 ± 0.09 ^{gh}	21.4 ± 0.26 ^b	0.16 ± 0.02 ^d
	52	65.5 ± 4.5 ^a	15.3 ± 0.02 ^{gh}	20.4 ± 0.41 ^c	0.18 ± 0.01 ^{bcd}
	57	68.4 ± 5.4 ^a	15.4 ± 0.16 ^{fg}	19.3 ± 0.08 ^d	0.21 ± 0.00 ^{abc}
35	37	60.9 ± 2.4 ^a	20.6 ± 0.02 ^a	19.4 ± 0.16 ^d	0.21 ± 0.01 ^{abc}
	42	63.4 ± 3.9 ^a	18.8 ± 0.08 ^c	19.2 ± 0.25 ^d	0.22 ± 0.01 ^{ab}
	47	60.5 ± 2.9 ^a	19.9 ± 0.13 ^b	18.2 ± 0.05 ^e	0.24 ± 0.01 ^{ab}
	52	58.7 ± 6.7 ^a	17.9 ± 0.05 ^d	19.6 ± 0.11 ^d	0.24 ± 0.01 ^{ab}
	57	63.4 ± 5.7 ^a	17.1 ± 0.10 ^e	19.4 ± 0.23 ^d	0.27 ± 0.06 ^a
ANOVA bifactorial					
-Salinidad		0.0944	0.0000	0.0000	0.0000
-Nivel de proteínas		0.7651	0.0000	0.0001	0.0000
-Salinidad x Nivel de proteínas		0.7708	0.0000	0.0000	0.0045

Valores (media ± desviación estándar, $n = 3$). Los valores de PER fueron transformados al logaritmo natural y los de porcentaje a la raíz del arco seno para poder ser analizados estadísticamente.

El porcentaje de cenizas no presentó diferencias significativas en los organismos cultivados en 35 ups de salinidad, estos tratamientos presentaron un valor de aproximado de 19.0%, a excepción del tratamiento 35:47 quien obtuvo una unidad por debajo del resto (Tabla 9). Por otra parte en 3 ups de salinidad, el porcentaje de cenizas aumentó al disminuir el nivel de proteína en el alimento, solo 3:57 fue similar a los tratamientos de 35 ups. El valor más alto se registró en 3:42 con $22.4 \pm 0.07\%$, este tratamiento fue estadísticamente similar pero numéricamente mayor a 3:37 y 3:47.

La cantidad de lípidos totales en el cuerpo completo de los peces al final del experimento difirió en los tratamientos de la salinidad 35 ups, registrándose la mayor cantidad de lípidos en 35:37 con $20.6 \pm 0.02\%$, disminuyendo con el incremento de proteína en el alimento hasta $17.1 \pm 0.10\%$ en 35:57. Por otra parte en 3 ups se registraron los valores de lípidos más bajos, observándose un incremento de manera paralela al contenido de proteína del alimento en los tratamientos 3:42, 3:47, 3:52 y 3:57 (Tabla 10), a excepción de 3:37, el cuál presentó la mayor cantidad de lípidos en esta salinidad con un valor de $15.7 \pm 0.10\%$.

La tasa de eficiencia proteica (TEP) aumentó con el contenido de proteína en el alimento y la salinidad (Tabla 10), obteniéndose el mayor valor en 35:57 con 0.27 ± 0.06 , sin embargo no difirió estadísticamente de 3:57, 35:37, 35:42, 35:47 y 35:52, los cuales fueron similares entre sí, el tratamiento que presentó el valor más bajo fue 3:37 con 0.11 ± 0.02 , por otra parte 3:42 y 3:47 fueron superiores a este último pero inferiores al resto.

9.5. Actividad enzimática

La actividad enzimática en proteasas ácidas mostró una tendencia de aumento con respecto a la salinidad y proteína del alimento (Tabla 11). Los valores más altos se registraron en los tratamientos de salinidad 35 a excepción del 35:37, el cual fue más bajo que 3:52 y 3:57. Por otra parte, en 3:37 se registró una actividad más alta que el tratamiento 3:42, siendo este el valor más bajo con 13498.18 ± 489.48 U/ml. El valor numéricamente más alto se registró en 35:57 con 28146.84 ± 808.29 U/ml, tratamiento que fue estadísticamente similar a 35:52. La unidades/ g de tejido presentaron un comportamiento similar al de la actividad, a excepción del tratamiento 3:37, el cual difirió del 3:47.

Tabla 11. Actividad enzimática de proteasas ácidas en estomago de juveniles de robalo blanco *C. undecimalis* cultivados en 3 y 35 ups, alimentados con cinco diferentes niveles de proteína durante 104 días.

Salinidad (ups)	Nivel de proteína (%)	Proteasas acidas (U/g)
3	37	276628.3 ± 9066.8 ^f
	42	256136.1 ± 7744.8 ^g
	47	242301.0 ± 5871.2 ^g
	52	346074.1 ± 14475.8 ^d
	57	402455.2 ± 15177.9 ^c
35	37	320228.1 ± 12187.1 ^e
	42	453131.5 ± 12667.5 ^b
	47	415076.3 ± 24998.9 ^c
	52	522389.1 ± 16930.1 ^a
	57	503796.8 ± 13265.6 ^a
ANOVA de dos vías		
-Salinidad		0.0000
-Nivel de proteínas		0.0000
-Salinidad x Nivel de proteínas		0.0000

Valores (media ± desviación estándar, n= 3 pooled, cada pooled consistió en 3 valores).

En el análisis de componentes principales de la actividad enzimática en ciegos pilóricos, el primer componente explica el 46% de la variación total de las enzimas, mientras que el segundo solo el 21% (Tabla 12). La enzima alcalinas totales no específicas presentaron una correlación negativa (-0.56) con el CP 1 y positiva (0.06) en CP 2, tripsina fue positiva (0.37) en PC 1 y negativa (-0.33) en PC 2, α -amilasa fue positiva (0.18 y 0.67) en CP 1 y CP 2, lipasas fueron positivas (0.52 y 0.17) en CP 1 y CP 2, leucina aminopeptidasa fue positiva (0.48) en CP 1 y negativa (-0.01) en CP 2, y quimotripsina fue negativa (-0.09) en CP 1 y positiva (0.64) en CP 2.

Tabla 12. Correlación de las diferentes enzimas digestivas con los componentes del PCA (análisis de componentes principales) en juveniles de robalo blanco *C. undecimalis* cultivados en 3 y 35 ups, alimentados con cinco diferentes niveles de proteína durante 104 días.

Ciegos pilóricos	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
Alcalinas	-0.56	0.06	-0.01	-0.21	0.22	0.77
Tripsina	0.37	-0.33	-0.43	-0.70	0.30	0.02
Alfa amilasa	0.18	0.67	0.50	-0.39	0.32	-0.11
Lipasas	0.52	0.17	0.03	-0.08	-0.64	0.53
Leucina aminopeptidasa	0.48	-0.01	-0.05	0.55	0.59	0.33
Quimotripsina	-0.09	0.64	-0.75	0.10	-0.03	-0.08
Proporción de varianza	0.46	0.21	0.14	0.10	0.07	0.02
Proporción acumulada	0.46	0.67	0.81	0.91	0.98	1.0
Intestino						
Alcalinas	-0.47	0.05	-0.32	0.29	-0.77	-0.06
Tripsina	-0.48	0.02	-0.22	-0.55	0.13	0.63
Alfa amilasa	-0.30	-0.58	0.58	-0.35	-0.20	-0.28
Lipasas	-0.45	-0.01	0.40	0.66	0.33	0.30
Leucina aminopeptidasa	-0.48	0.07	-0.35	-0.06	0.48	-0.64
Quimotripsina	-0.14	0.80	0.48	-0.24	-0.14	-0.15
Proporción de varianza	0.58	0.19	0.12	0.05	0.04	0.02
Proporción acumulada	0.58	0.77	0.89	0.94	0.98	1.0

Valores (correlación, n= 30 pooled, cada pooled consistió en 3 valores), los valores de las diferentes enzimas fueron normalizados para poder ser comparados, restando la media a cada dato por enzima y dividiéndolos entre su desviación estándar.

La actividad de alcalinas totales no específicas incrementó con la proteína en la dieta, registrándose una mayor actividad en los tratamientos de 35 respecto a 3 ups (Figura 5). La tripsina, leucina aminopeptidasa y lipasas presentaron un comportamiento inverso respecto al nivel de proteína de la dieta, registrándose una actividad más elevada en 42 y 37%, sin embargo fue mayor en 3, en relación a 35 ups. La α -amilasa y quimotripsina fueron mayores en 3 ups, con una mayor actividad en los niveles de proteína más altos en cada salinidad (57%), sobresaliendo en ambas salinidades el tratamiento alimentado con 42 sobre 47% de proteína.

Actividad enzimática en ciegos pilóricos

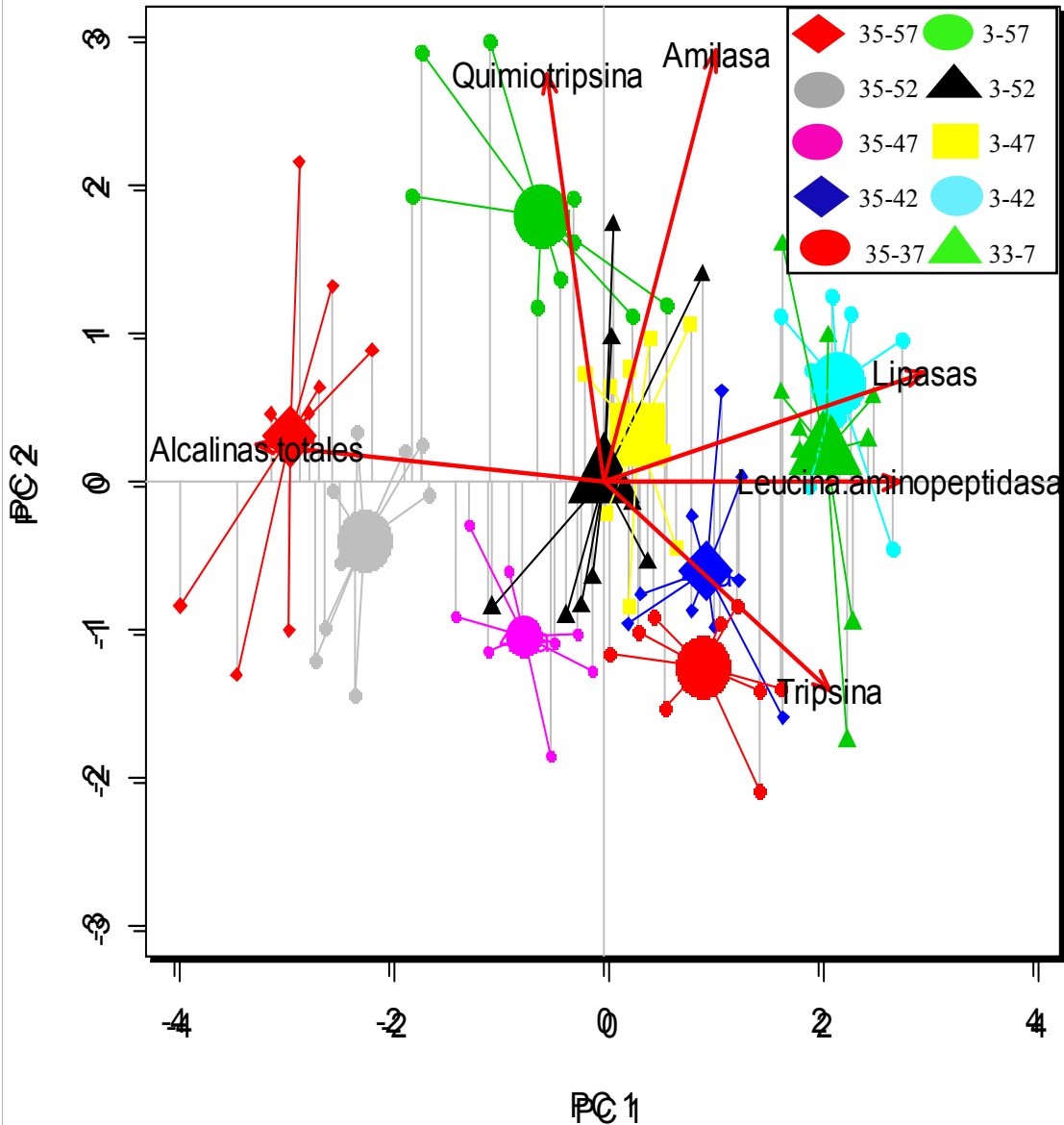


Figura 5. Actividad enzimática en ciegos pilóricos de alcalinas totales, tripsina, amilasa, lipasas, leucina aminopeptidasa y quimiotripsina en juveniles de robalo blanco *Centropomus undecimalis* cultivado en 3 y 35 ups de salinidad, alimentado con 5 diferentes niveles de proteína (57, 52, 47, 42 y 37%) durante 104 días.

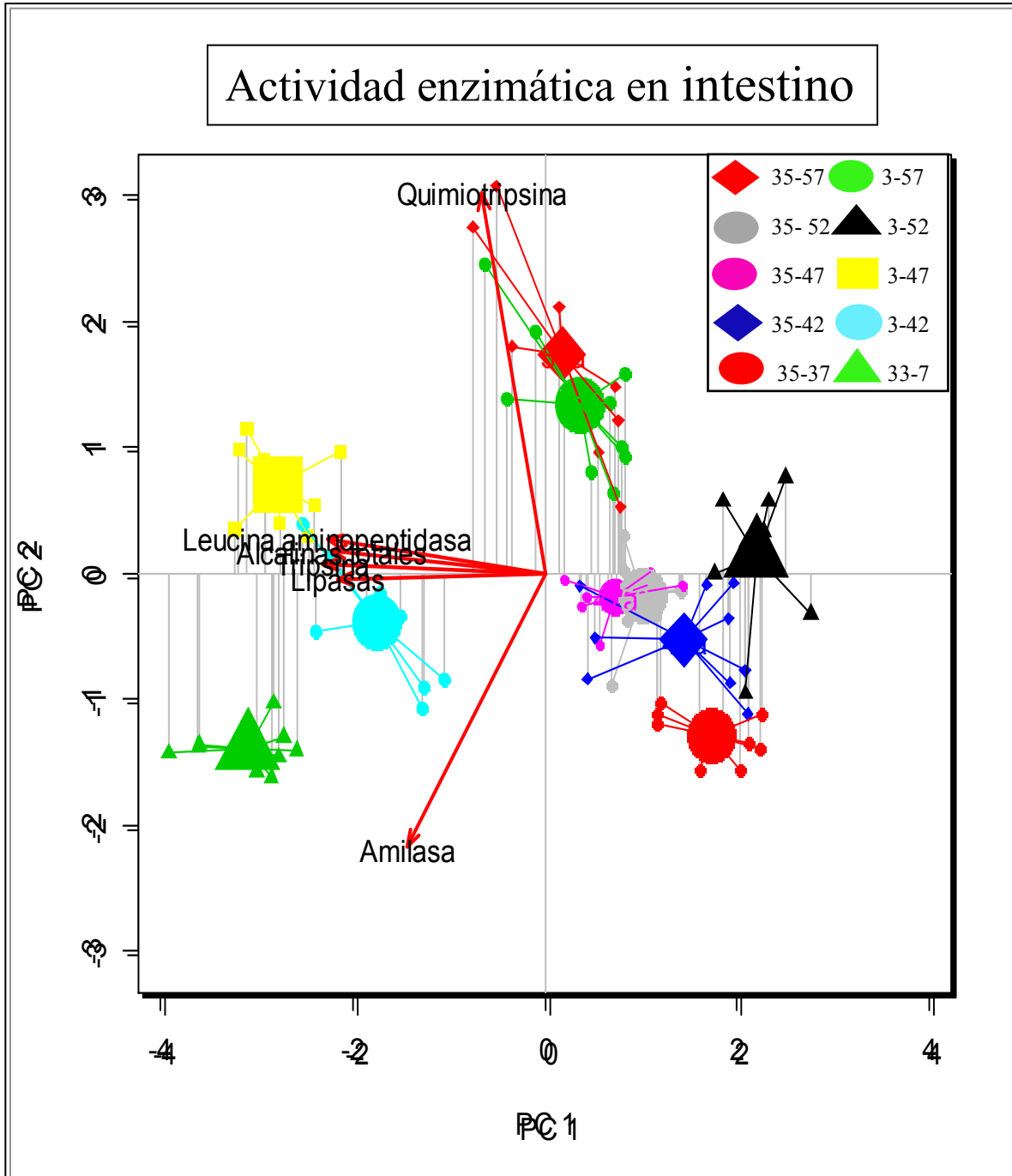


Figura 6. Actividad enzimática en intestino de alcalinas totales, tripsina, amilasa, lipasas, leucina aminopeptidasa y quimiotripsina en juveniles de robalo blanco *Centropomus undecimalis* cultivado en 3 y 35 ups de salinidad, alimentado con 5 diferentes niveles de proteína (57, 52, 47, 42 y 37 %) durante 104 días.

En el análisis de componentes principales de la actividad enzimática en intestino, el primer componente explica el 58% de la variación total de las enzimas, mientras que el segundo solo el 19% (Tabla 12). La enzima alcalinas totales no específicas presentaron una correlación negativa (-0.47) con el CP 1 y positiva (0.05) en CP 2, tripsina fue negativa (-0.48) en PC 1 y positiva (0.02) en PC 2, α -amilasa fue negativa (-0.30 y -0.58) en CP 1 y CP 2, lipasas fueron negativas (-0.45 y -0.01) en CP 1 y CP 2, leucina aminopeptidasa fue negativa (0-0.48) en CP 1 y positiva (-0.07) en CP 2, y quimotripsina fue negativa (-0.14) en CP 1 y positiva (0.80) en CP 2.

Tabla 13. Resultados del análisis PERMANOVA de la actividad de proteasas alcalinas totales, tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa, lipasas y α -amilasa por tratamiento, en juveniles de robalo blanco *C. undecimalis* cultivados en 3 y 35 ups, alimentados con cinco diferentes niveles de proteína (37, 42, 47, 52 y 57%) durante 104 días.

Salinidad (ups)	Ciegos pilóricos	Intestino
3	37 ^a	37*
	42 ^a	42*
	47*	47*
	52*	52*
	57*	57*
35	37*	37*
	42*	42*
	47*	47*
	52*	52*
	57*	57*
PERMANOVA		
-Salinidad	0.0001	0.0001
-Nivel de proteínas	0.0001	0.0001
-Salinidad x Nivel de proteínas	0.0001	0.0001

Valores (Se analizaron seis enzimas distintas por tratamiento, $n = 6$, cada n consistió en 3 pooled y cada pooled en 3 valores). Los valores de las enzimas fueron previamente estandarizados para ser analizados, a cada dato por enzima se le resto su media y dividió entre su desviación estándar. Los * significan diferencias significativas entre tratamientos y las letras igualdad estadística.

En ciegos pilóricos la actividad de alcalinas totales, tripsina, lipasas, leucina aminopeptidasa y α -amilasa presentaron el mismo patrón (Figura 6), su actividad fue mayor en los niveles de proteína 37, 47 y 42% en 3 ups respecto al resto, por otra parte en 35 ups la mayor actividad la presentaron los tratamientos alimentados con el mayor nivel de proteína, excepción de α -amilasa la cual incrementó con el nivel de carbohidratos en la dieta, observándose una reducción de la actividad al aumentar la proteína. En intestino la mayor actividad se registró en los tratamientos alimentados con el menor contenido de proteína en la dieta, principalmente en 3 ups respecto a 35, excepto quimotripsina la cual exhibió una mayor actividad en los niveles más altos de proteína, principalmente en 35 ups.

La actividad enzimática por tratamiento, analizada mediante un análisis PERMANOVA en ciegos pilóricos e intestino por separado, resultó diferente en todos los casos, a excepción de 37 y 42% de proteína en baja salinidad en la región de ciegos pilóricos (Tabla 13). Por otra parte, el factor salinidad, proteína y la interacción de ambos, también fueron significativos en ciegos pilóricos e intestino, por lo tanto cada factor evaluado influyó en la actividad digestiva de *C. undecimalis*.

10. Discusión

Los juveniles de robalo blanco cultivados durante 104 días en 3 y 35 ups de salinidad presentaron una supervivencia del 100%, los mejores resultados de crecimiento se obtuvieron en la dieta con 57% proteína en las dos salinidades. Tucker (1987) reporta un requerimiento del 50% en 0 ups, sin embargo obtiene un mayor crecimiento al aumentar el nivel de proteína a 53.8%, esto coincide con lo obtenido por Gracia-López *et al.* (2003) quienes reportan un requerimiento del 53.3% en 12 ups. En otras especies carnívoras cómo

Centropomus. parallelus (Souza *et al.*, 2011), *Dicentrarchus labrax* (Ballestrazzi *et al.*, 1994), *Lates calcarifer* (Catacutan & Coloso, 1995), y *Sander lucioperca* (Schulz, *et al.*, 2007), es común observar altos requerimiento que van del 50 al 60%.

Respecto a la salinidad los mayores crecimientos se obtuvieron en 35 respecto a 3 ups, similar a lo reportado por Rhody *et al.* (2010) al registrar mayores crecimientos en 35 respecto 25 y 15 ups. En otras especies eurihalinas de hábitos carnívoros como *Acanthopagru butchery* (Partridge & Jenkins, 2002), *Dicentrarchus labrax* (Eroldogan *et al.*, 2004), *Sparus aurata* (Laiz-Carrión *et al.*, 2005) y *Solea senegalensis* (Arjona *et al.*, 2008), se han reportado resultados similares a los obtenidos en este trabajo, al evaluar su crecimiento en bajas salinidades respecto a altas. Este comportamiento puede corresponder a una mayor canalización de energía a la regulación iónica y no al crecimiento (Bouf & Payan, 2001; Laiz-Carrión *et al.*, 2005; Arjona *et al.*, 2009), aunado a esto un posible efecto negativo en la digestibilidad y absorción del alimento en bajas salinidades (Krogdahl *et al.*, 2004).

Los resultados de crecimiento contradicen lo obtenido por Tucker (1987) en robalo blanco, quien reporta un mejor crecimiento en 0 respecto a 27 ups utilizando larvas silvestres, resultados similares obtuvo Rocha *et al.* (2004) en *Centropomus parallelus*, sin embargo Tsuki *et al* (2007) en esta misma especie al evaluar el crecimiento en organismos obtenidos de reproductores en cautiverio, obtuvieron numéricamente mejores resultados en 35 respecto 5 ups. Esta discrepancia posiblemente se debe al origen de los peces, por lo que la capacidad de respuesta a las condiciones del cultivo podría ser favorable a la que mejor se asemeje al medio en el cual se desarrollaron con anterioridad.

La mejor tasa de crecimiento fue de 1.01% y se obtuvo en 57% proteína de 35 ups manejando una densidad de 150 org/m³, en cultivos anteriores llevados a cabo en condiciones similares por Gracia-López *et al.* (2003) obtuvieron un valor de 1.33% con 100 org/m³, sin embargo cultivos realizados por Tucker (1987) y Cabrera & Amador (1998), reportan crecimientos de 2.08 y 1.8% respectivamente. Esta gran diferencia posiblemente es debido a las bajas densidades que utilizaron (8 org/m³), es perfectamente conocido que la densidad de siembra afecta el crecimiento de los organismos, lo cual fue comprobado por Souza-Filho & Cerqueira (2003), quienes reportan una reducción en las tasa de crecimiento en esta misma especie al aumentar la densidad de cultivo.

La mayor CAD y TEP se registró en los niveles más altos de proteína, en los cuales se obtuvieron los mejores FCA, similar se ha reportado en otras especies carnívoras como *Dicentrarchus labrax* (Pérez *et al.*, 1997) y *Anguilla rostrata* (Tibbetts *et al.*, 2000), no obstante se registró una mayor ingestión de alimento en 35 respecto a 3 ups, parecido a lo obtenido en *Salmo salar* (McCormick *et al.*, 1989) y *Dicentrarchus labrax* (Eroldogan *et al.*, 2003). Esta conducta probablemente es el resultado de una mayor demanda de energía al aumentar la salinidad, lo que se refleja en el porcentaje de hematocrito registrado en este trabajo, el cual fue mayor en los peces cultivados en 35 respecto a 3 ups, lo cual se asocia a una mayor demanda de oxígeno, esto a su vez a un metabolismo más elevado (Maxime *et al.*, 1990; Jarvis & Ballantye, 2003), como lo señala Gracia-López *et al.* (2006) en esta misma especie al registrar un mayor consumo de oxígeno y una disminución en la excreción amoniacal en salinidades altas respecto a bajas, lo que se

asocia a un cambio en el tipo de sustrato metabólico (Mayzaud & Conover, 1988).

El proceso de osmorregulación involucra una serie de procesos fisiológicos en los peces, principalmente una reducción en la concentración de aminoácidos, así como de iones en el interior de las células en bajas salinidades (Lasserre & Gilles, 1971; Assem & Hanke, 1982). Los resultados obtenidos en presión osmótica evaluada en la sangre de los peces cultivados durante 104 días, demuestran que esta especie posee una gran capacidad para tolerar amplios rangos de salinidad (Pérez-Pinzón & Lutz, 1991), esto a pesar del contenido nutrimental del alimento, a excepción del tratamiento 37% en 3 ups (361 mOsm kg⁻¹), el cual presentó el valor más bajo y difirió del resto. La baja cantidad de proteína en la dieta y una posible escasez en la disponibilidad de iones, tanto en el agua como en el alimento (Tabla 2), principalmente Na⁺, Cl⁻ y Ca²⁺, pudieron generar este escenario debido a su importancia en la regulación osmótica interna en los peces (Filk *et al.*, 1996; Ferreira & Baldisserotto, 2007).

El IH, IGM y el FC, son buenos indicadores del estatus nutricional y condición fisiológica del pez (Cui & Wootton, 1988), en este trabajo no se encontró una relación coherente entre el IGM y el contenido de lípidos en la dieta, solo se registraron mayores valores en 35 respecto a 3 ups. En especies como *Sciaenops ocellatus* (Serrano *et al.*, 1992), *Dicentrarchus labrax* (Pérez *et al.*, 1997), *Epinephelus coioides* (Luo *et al.*, 2005) y *Spaurs sarba* (Leung & Woo, 2012) el IH incrementa con el contenido de carbohidratos y lípidos en la dieta, en este estudio solo en 35 ups se presentó este comportamiento, obteniéndose los mejores crecimientos en los niveles con un IH más bajo, resultados similares obtuvieron (Berger & Halver, 1987) en *Morone saxatilis*.

Por otra parte Mihelakakis *et al.* (2002) mencionan que el tamaño del hígado es un buen indicador de la condición nutricional del pez, sin embargo en 3 ups el IH no presentó relación alguna con el contenido de nutrientes en la dieta.

La cantidad de proteína retenida en los peces al final puede ser muy variable, Webster *et al.* (1995) reportan en sunshine bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) una menor retención de proteína al aumentar el nivel de lípidos en la dieta, similar a Santinha *et al.* (1999) en *Sparus aurata*, por otra parte en *Anguilla rostrata* y *Solea senegalensis* se obtuvo una relación directa con el aumento de este nutriente en el alimento (Tibbetts *et al.*, 2000; Rema *et al.*, 2008). En este trabajo no se obtuvieron diferencias estadísticas entre los niveles de proteína y salinidad, trabajos análogos a este reportan el mismo resultado en *Lates calcarifer* (Catacutan & Coloso, 1995; Williams *et al.*, 2003), *Dicentrarchus labrax* (Pérez *et al.*, 1997), *Paralabrax maculatofasciatus* (Alvarez-González *et al.*, 2001), *Sander lucioperca* (Schulz *et al.*, 2007), *Centropristis striata* (Alam *et al.*, 2008), *Centropomus parallelus* (Souza *et al.*, 2011) y *Lutjanus argentimaculatus* (Abbas & Siddiqui, 2013).

Se ha reportado que el incremento de lípidos en la dieta afecta la composición bioquímica final de los peces, debido a un incremento en la acumulación de este nutriente en musculo, hígado o cuerpo completo (Serrano *et al.*, 1992; Pérez *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2005; Tuan & Williams, 2007), en el presente estudio solo en 35 ups se presentó este comportamiento, no obstante en 3 ups solo el tratamiento alimentado con la dieta que contenía la mayor cantidad de lípidos fue superior al resto, los cuales presentaron un comportamiento inverso respecto al contenido de este nutriente.

En diversos estudios se ha evaluado el efecto de factores medioambientales, especialmente la salinidad y la composición de la dieta sobre la actividad de

las diferentes enzimas digestiva en peces por separado (Nagase, 1964; Reimer, 1982; Alliot *et al.*, 1983; García-Carreño *et al.*, 2002; Lundstedt *et al.*, 2004; Moutou *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2006; Debnath *et al.*, 2007; Tsuzuki *et al.*, 2007), muy pocos estudios han evaluado el efecto de la salinidad y el contenido de proteína en la dieta sobre la actividad de las diferentes enzimas digestivas (Woo & Kelly, 1995). Este estudio se evaluó el efecto de dos niveles de salinidad (3 y 35 ups), 5 niveles de proteína sobre la actividad de siete diferentes enzimas digestivas: pepsina, proteasas alcalinas totales, tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa, lipasas y α -amilasa, en relación al crecimiento (Tabla 14 y 15, Anexos).

El sistema digestivo de los peces puede reflejar independientemente de su patrón digestivo, una amplia capacidad fisiológica de adaptación en relación a la calidad y cantidad de nutrientes en el alimento. En el presente estudio, a diferencia de *Tilapia mossambica* (Nagase, 1964), *Brycon cf. melanopterus* (Reimer, 1982), *Pseudoplatystoma corruscans* (Lundstedt *et al.*, 2004), se registró un patrón de respuesta de pepsina en estómago y alcalinas totales en ciegos pilóricos, respecto al contenido de proteína en la dieta, conductas similares se han obtenido en otras especies de peces carnívoros como *Brycon orbignyanus* (García-Carreño *et al.*, 2002) y *Dentex dentex* (Pérez-Jiménez *et al.* 2009). Por otra parte en intestino, la actividad de proteasas alcalinas totales en la salinidad de 3 ups presento una conducta opuesta respecto al estómago y ciegos, registrándose una mayor actividad de proteasas alcalinas totales en los tratamientos alimentas con la menor cantidad de proteína (Tabla 11 y Figura 5).

La tripsina es considerada una de las enzimas digestivas más importantes en la digestión de proteínas en los peces (Nagase, 1964; Reimer, 1982; Woo &

Kelly, 1995), su comportamiento varía de acuerdo al contenido de proteína en el alimento y la salinidad del medio (Moutou *et al.*, 2004; Psochiou *et al.*, 2007). Woo & Kelly (1995) reportan en *Sparus sarba* una relación directa entre la actividad de tripsina con el nivel de proteína en la dieta y la ganancia en peso en 35 ups de salinidad, no obstante los resultados obtenidos de esta enzima en ciegos pilóricos de *Centropomus undecimalis*, presentaron un comportamiento opuesto a lo reportados en *Sparus sarba*, la mayor actividad se registró en los tratamientos alimentados con la menor cantidad de proteína, una conducta similar se observó en leucina aminopeptidasa (Figura 5). Este comportamiento enzimático podría responder a un mecanismo de compensación por parte del pez ante la escasez de proteína en la dieta, con el propósito de utilizar de manera más eficiente su disponibilidad (Papoutsoglou & Lyndon, 2006). Sin embargo los mayores crecimientos en este estudio se registraron en los tratamientos alimentados con la mayor cantidad de proteína, los cuales a su vez se exhibieron la más alta actividad de pepina y proteasas alcalinas totales en estómago y ciegos pilórico.

La quimotripsina es una endopeptidasa que requiere de la presencia de tripsina para poder ser activada (Roberts, 2002), en peces cómo *Siganus canaliculatu* (Sabapathy & Teo, 1995), *Salmo salar* (Einarsson *et al.*, 1996) y *Pseudoplatystoma corruscans* (Lundstedt *et al.*, 2004), se observa un comportamiento paralelo en la actividad de estas dos enzimas, no obstante en este estudio quimiotripsina registro una conducta opuesta respecto a tripsina (Figura 5). Este resultado corrobora la hipótesis planteada por Moutou *et al.* (2004), los cuales mencionan que los mecanismos de activación la tripsina no esta relacionada con la actividad de otras proteasas.

En salinidades intermedias los peces canalizan una mayor cantidad de energía al crecimiento (Boeuf & Payan, 2001) esto fenómeno se ve reflejado en una mayor actividad de enzimas digestivas, principalmente en proteasas (Woo & Kelly, 1995; Tsuzuki *et al.*, 2007). En el presente estudio, en 35 ups de salinidad, se registró una mayor ganancia en peso y actividad de pepsina y proteasas alcalinas totales en ciegos pilóricos, respecto a 3 ups. Un patrón similar en la actividad de proteasas digestivas se registró en *Lates calcarifer* (Harpaz *et al.*, 2005) y *Centropomus parallelus* (Tsuzuki *et al.*, 2007). Por otra parte en especies de peces carnívoros como *Acanthopagrus butcheri* (Partridge & Jenkins, 2002), *Dicentrarchus labrax* (Eroldogan *et al.*, 2004), *Sparus aurata* (Laiz-Carrión *et al.*, 2005) y *Solea senegalensis* (Arjona *et al.*, 2008), se han reportado mejores crecimientos en altas salinidades respecto a bajas. Estos resultados reflejan una relación directa entre la salinidad del medio y la actividad de proteasas digestivas sobre la digestibilidad y absorción de proteína en la dieta.

Los ciegos pilóricos son señalados como el lugar donde se lleva a cabo principalmente el proceso de digestión y absorción de los nutrientes provenientes del alimento (Robert, 2002; Pérez-Jiménez *et al.*, 2009), posiblemente por esta razón este órgano exhibe una patrón de respuesta digestiva en relación al contenido de nutrientes en la dieta y una actividad digestiva superior al intestino (García-Carreño *et al.*, 2002; Moutou *et al.*, 2004; Harpaz *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2006; Pérez-Jiménez *et al.*, 2009). En este estudio se observó un patrón digestivo en la actividad de proteasas alcalinas totales, tripsina, quimiotripsina, leucina aminopeptidasa y lipasas en ciegos pilóricos, en relación al contenido de proteína y lípidos de la dieta, por

otra parte en intestino solo las proteasas alcalinas totales y α -amilasa presentaron esta conducta (Figura 6).

Independientemente del contenido de proteína, se ha observado en especies de peces carnívoros como *Pseudoplatystoma corruscans* (Lundstedt *et al.*, 2004) y *Dentex dentex* (Pérez-Jiménez *et al.*, 2009) una mayor actividad de proteasas alcalinas totales y α -amilasa cuando se maneja una inclusión entre el 20 y 30% de carbohidratos en la dieta. Posiblemente debido a esta combinación de nutrientes en este estudio se registró una mayor actividad de α -amilasa en los tratamientos alimentados con la dieta de menor contenido de carbohidratos (Figura 5).

El bajo crecimiento reportado de *Centropomus undecimalis* en 3 ups respecto a 35 ups, puede ser atribuido a su baja capacidad digestiva, principalmente por proteasas. Por otra parte la deficiencia de iones Na^+ y Cl^- , pudo ser otro factor limitante en el transporte de nutrientes en ciegos pilóricos e intestino, principalmente de aminoácidos (Rosenberg *et al.*, 1964; Smith, 1969), en peces como *Dicentrarchus labrax* se ha reportado *in vitro* una deficiencia en el transporte de aminoácidos, especialmente de glicina en bajas concentraciones de Na^+ y Cl^- .

Rocha *et al.* (2004) y Rubio *et al.* (2005) señalan que los peces prefieren el uso de proteína en salinidades cercanas a cero, catalizando lípidos, carbohidratos y proteínas al aumentar la salinidad del medio, sin embargo en este estudio se registró una mayor actividad de lipasas y α -amilasa en 3 ups respecto a 35 ups, así como una menor concentración en la composición bioquímica de lípidos e índice de grasa mesentérica en los peces al final del experimento en baja salinidad (Tabla 9 y 10). Las lipasas requiere de la presencia de colipasa (proteína pancreática), sales biliares y Ca^{2+} para ser

activada (Kimura *et al.*, 1982), Hu *et al.* (2010) reportan *in vitro* una mayor actividad de lipasas en presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} y una disminución de la misma ante la presencia de compuestos del mismo elemento. Por otra parte el Ca^{2+} es esencial como componente estructural y catalizador en α -amilasa (Boel *et al.*, 1990; Tanaka & Hoshino, 2002). En agua marina el Ca^{2+} se encuentra asociado a una gran cantidad de aniones, por otra parte el agua utilizada en el cultivo llevado a cabo en 3 ups contiene altas concentraciones de este ion (Tabla 3), probablemente el comportamiento de estas enzimas se deba a la alta disponibilidad del ion Ca^{2+} en 3 ups.

11. Conclusiones

Con base a los crecimientos registrados en el modelo lineal mixto (Tabla 6), se establece un requerimiento de proteína dietética óptimo del 52% en 3 ups de salinidad en juveniles de robalo blanco *Centropomus undecimalis* bajo las condiciones experimentales del presente estudio. Por otra parte en 35 ups de salinidad, el mayor crecimiento se registró en el tratamiento alimentado con el nivel más alto de proteína dietética (57%). Estos resultados sugieren que el robalo blanco, posiblemente presenta un mayor requerimiento proteico en esta salinidad.

De acuerdo con los resultados obtenidos en crecimiento del presente estudio, se establece 35 ups de salinidad como la mejor condición de cultivo en juveniles de robalo blanco *Centropomus undecimalis*. Asimismo se observó una relación directa entre la salinidad del medio y la actividad digestiva de proteasas totales sobre el crecimiento, registrándose los mayores valores de esta variable en 35 respecto a 3 ups de salinidad. Acorde a estos resultados se concluye que la salinidad es un factor que limita el crecimiento de esta

especie, debido a que afecta la digestibilidad y posiblemente la absorción de nutrientes en el tracto digestivo, principalmente de proteína.

Por otra parte, de acuerdo a la elevada actividad enzimática registrada en ciegos pilóricos respecto a intestino, así como el aumento que se registró en proteasas alcalinas totales y lipasas en este órgano al incrementar la cantidad de proteína y lípidos en la dieta, se señalan los ciegos pilóricos como la principal zona de digestión y absorción, procesos que pueden ser modulados por la cantidad de nutrientes en el alimento en robalo blanco.

De acuerdo con los resultados obtenidos en composición bioquímica de lípidos e índice de grasa mesentérica, se sugiere una mayor utilización de este nutriente en la obtención de energía en 3 ups, debido a una baja acumulación lipídica y una elevada actividad de lipasas en esta salinidad, respecto a 35 ups, condición que presentó un mayor depósito de lípidos. Sin embargo la elevada actividad de esta enzima también podría ser el resultado de un posible mecanismo compensatorio debido a una baja digestibilidad de este nutriente en 3 ups.

La presión osmótica, el hematocrito, el índice hepatosomático y el factor de condición fueron más bajos en 3 ups, respecto a 35 ups, principalmente en el los peces alimentados con 37% proteína, no obstante no se observó una relación directa entre el contenido de proteína en la dieta y el comportamiento de estas variables en el resto de los tratamientos, por lo tanto no pueden ser utilizados en este estudio como indicadores de la condición fisiológica en robalo blanco.

Tabla 14. Actividad enzimática de proteasas alcalinas totales, tripsina, quimi tripsina, leucina aminopeptidasa, lipasas y α -amilasa en ciegos pilóricos de juveniles de robalo blanco *C. undecimalis* cultivados en 3 y 35 ‰, alimentados con cinco diferentes niveles de proteína durante 104 días.

Salinidad ‰	Proteína %	Alcalinas totales	Tripsina	Quimi tripsina	Leucina aminopeptidasa	Lipasas 10 ⁻³	α -amilasa
3	37	1109.3 ± 100.4	0.102 ± 0.04	0.606 ± 0.15	3.50 ± 0.34	2.71 ± 0.16	84035.8 ± 30180.8
	42	1030.3 ± 67.8	0.097 ± 0.02	0.695 ± 0.15	4.26 ± 0.20	2.32 ± 0.20	99040.3 ± 18437.7
	47	1345.3 ± 145.5	0.086 ± 0.02	0.680 ± 0.30	2.73 ± 0.81	1.92 ± 0.07	78314.9 ± 14373.2
	52	1429.4 ± 112.6	0.084 ± 0.02	0.591 ± 0.26	3.36 ± 0.42	1.37 ± 0.13	82131.9 ± 31937.7
	57	1721.3 ± 92.4	0.064 ± 0.03	1.122 ± 0.56	3.14 ± 0.45	1.58 ± 0.01	111912.0 ± 31765.1
37	37	1299.5 ± 91.0	0.087 ± 0.03	0.2517 ± 0.10	4.33 ± 0.45	1.66 ± 0.11	56445.9 ± 12465.9
	42	1220.9 ± 112.8	0.096 ± 0.02	0.7606 ± 0.28	4.73 ± 0.16	1.49 ± 0.01	49084.6 ± 19473.2
	47	1510.5 ± 112.2	0.079 ± 0.02	0.4658 ± 0.19	2.74 ± 0.12	1.30 ± 0.02	46865.8 ± 16307.9
	52	2131.7 ± 147.1	0.075 ± 0.02	0.7273 ± 0.17	2.33 ± 0.27	0.85 ± 0.00	48428.9 ± 12519.0
	57	2447.0 ± 186.1	0.059 ± 0.02	0.7027 ± 0.29	1.94 ± 0.53	0.80 ± 0.01	73257.7 ± 28494.3

Valores (media ± desviación estándar, n=9 datos)

Tabla 15. Actividad enzimática de proteasas alcalinas totales, tripsina, quimiotripsina, leucina aminopeptidasa, lipasas y α -amilasa en el intestino de juveniles de robalo blanco *C. undecimalis* cultivados en 3 y 35 ‰, alimentados con cinco diferentes niveles de proteína durante 104 días.

Salinidad ‰	Proteína %	Alcalinas totales	Tripsina 10^{-1}	Quimiotripsina	Leucina aminopeptidasa	Lipasas 10^{-4}	α -amilasa
3	37	697.28 ± 47.8	0.96 ± 0.10	0.14 ± 0.03	3.86 ± 0.45	3.12 ± 0.24	65629.12 ± 6906.6
	42	592.75 ± 31.9	0.85 ± 0.09	0.29 ± 0.09	3.56 ± 0.66	2.20 ± 0.20	53293.12 ± 5121.3
	47	530.61 ± 27.1	1.15 ± 0.11	0.45 ± 0.08	4.14 ± 0.66	2.76 ± 0.17	41217.49 ± 9093.1
	52	304.16 ± 21.0	0.21 ± 0.06	0.34 ± 0.09	1.35 ± 0.13	1.95 ± 0.26	28176.88 ± 5583.2
	57	358.21 ± 26.9	0.49 ± 0.09	0.47 ± 0.12	2.55 ± 0.41	2.40 ± 0.19	18557.253 ± 3554.8
37	37	298.81 ± 20.6	0.53 ± 0.08	0.06 ± 0.02	2.15 ± 0.42	1.60 ± 0.18	26416.64 ± 4618.4
	42	361.04 ± 41.3	0.55 ± 0.12	0.14 ± 0.03	2.17 ± 0.48	1.56 ± 0.13	21116.57 ± 4752.7
	47	379.79 ± 25.5	0.47 ± 0.01	0.17 ± 0.03	3.01 ± 0.24	1.91 ± 0.15	19400.85 ± 3213.9
	52	415.85 ± 28.9	0.40 ± 0.06	0.19 ± 0.06	2.41 ± 0.26	1.86 ± 0.19	20507.86 ± 3832.2
	57	540.51 ± 59.2	0.70 ± 0.13	0.36 ± 0.11	2.92 ± 0.58	1.82 ± 0.96	7995.594 ± 2190.7

Valores (media ± desviación estándar, n=9 datos)

13. Bibliografía

- Abbas, G. & P. J. A. Siddiqui. 2013. The effects of varying dietary protein level on growth, feed conversion, body composition and apparent digestibility coefficient of juvenile mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* (Forsskal 1775). *Aquaculture Research*, 44, 807–818.
- Abbas, G., P. J. A. Siddiqui & K. Jamil. 2011. The optimal protein requirements of juvenile mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* fed isoenergetic diets. *Pakistan Journal of Zoology*, 44(2), 469–480.
- Abdo de la Parra, M., L. E. Rodríguez-Ibarra, C. Hernández, K. Hernández, B. González-Rodríguez, I. Martínez-Rodríguez & A. García-Ortega. 2010. Efecto de diferentes niveles de proteína y lípidos totales en la dieta sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. *Revista de Biología Marina Y Oceanografía*, 45(3), 433–439.
- Abdul-Kaber, Md, S. Koshio, M. Ishikawa, S. Yokoyama, M. Bulbu, Y. Honda, R. E. Mamauag & A. Laining. 2010. Growth, nutrient utilization, oxidative condition, and element composition of juvenile red sea bream *Pagrus major* fed with fermented soybean meal and scallop by-product blend as fishmeal replacement. *Fisheries Science*, 77(1), 119–128.
- Alam, MD. S., W. O. Watanabe & P. M. Carrol. 2008. Dietary Protein Requirements of Juvenile Black Sea Bass, *Centropristis striata*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 39(5), 656–663.
- Alliot, E., A. Pastoureaud & H. Thebault. 1983. Influence de la température croissance et la composition. *Aquaculture*, 31, 181–194.
- Almeida, L. C., L. M. Lundstedt & G. Moraes. 2006. Digestive enzyme responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed on different levels of protein and lipid. *Aquaculture Nutrition*, 12, 443–450.
- Alvarez-González, C. A., R. Civera-Cerecedo, J. L. Ortiz-Galindo, S. Dumas, M. Moreno-Legorreta & T. Grayeb-Del Alamo. 2001. Effect of dietary protein level on growth and body composition of juvenile spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*, fed practical diets. *Aquaculture*, 194, 151–159.

- Anson, M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of General Physiology*, 22(1), 79–89.
- Arjona, F. J., L.Vargas-Chacoff, I. Ruiz-Jarabo, O. Gncalves, I. Pascoa, M. P. Martín del Río & J. M. Mancera. 2009. Tertiary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) to osmotic challenge: Implications for osmoregulation, energy metabolism and growth. *Aquaculture*, 287(3-4), 419–426.
- Arzel, J., R. Mctailleur, C. Kerleguer, H. L. Delliou & J. Guillaume. 1995. The protein requirement of brown trout (*Salmo trutta*) fry. *Aquaculture*, 130, 67–78.
- Assem, H., & W. Hanke. 1982. The significance of the amino acids during osmotic adjustment in teleost fish-i. Changes in the euryhaline *Sarotherodon mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 74A(3), 531–536.
- Ballestrazzi, R., D. Lanari, E. D'Agaro & A. Mion. 1994. The effect of dietary protein level and source on growth, body composition, total ammonia and reactive phosphate excretion of growing sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 127(2-3), 197–206.
- Berger, A. & J. E. Halver. 1987. Effect of dietary protein, lipid and carbohydrate content on the growth, feed efficiency and carcass composition of striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), fingerlings. *Aquaculture and Fisheries Management*, 18, 345–356.
- Blewett, D. A., R. A. Hensley & P. W. Stevens. 2006. Feeding habits of common snook, *Centropomus undecimalis*, in Charlotte Harbor, Florida. *Gulf and Caribbean Research*, 18, 1–13.
- Boel, E., L.Brady, A. M. Brzozowski, Z. Derewenda, G. G. Dodson, V. J. Jensen, S. B. Petersen, H. Swift, L. Thim & H. F.Woldike. 1990. Calcium binding in α -amylases: an X-ray diffraction study at 2.1-Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry*, 29, 6244–6249.
- Bœuf, G. & P. Payan. 2001. How should salinity influence fish growth? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 130, 411–423.

- Bowyer, J. N., J. G. Qin & D. A. J. Stone. 2013. Protein, lipid and energy requirements of cultured marine fish in cold, temperate and warm water. *Reviews in Aquaculture*, 5(1), 10–32.
- Buentello, J. A. & D. M. Gatlin. 2002. Preliminary Observations on the Effects of Water Hardness on Free Taurine and Other Amino Acids in Plasma and Muscle of Channel Catfish. *North American Journal of Aquaculture*, 102, 64–95.
- Bureau, D. P. 2000. Feather meals and meat and bone meals from different origins as protein sources in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets. *Aquaculture*, 124, 27–34.
- Cabrera, R. P. & L. E. Amador del Angel. 1998. Crecimiento del Robalo Blanco *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1729) en Jaulas Fijas en la Laguna Del Pom, Campeche, Mexico. *Proceedings of the 50th Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, pp. 524–535.
- Catacutan, M. R. & R. M. Coloso. 1995. Effect of dietary protein to energy ratios on growth, survival, and body composition of juvenile Asian seabass, *Lates calcarifer*. *Aquaculture*, 131, 125–133.
- Cui, X.-J., Q.-C. Zhou, H.-O. Liang, J. Yang & L.-M. Zhao. 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.
- Cui, Y. & R. J. Wootton. 1988. Effects of ration, temperature and body size on the body composition, energy content and condition of the minnow, *Phoxinus phoxinus* (L.). *Journal of Fish Biology*, 32, 749–764.
- Debnath, D., A. K. Pal, N. P. Sahu, S. Yengkokpam, K. Baruah, D. Choudhury & G. Venkateshwarlu. 2007. Digestive enzymes and metabolic profile of *Labeo rohita* fingerlings fed diets with different crude protein levels. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 146(1), 107–114.
- Dias, J., M. J. Alvarez, J. Arzel, G. Corraze, A. Diez, J. M. Bautista & S. J. Kaushik. 2005. Dietary protein source affects lipid metabolism in the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 142(1), 19–31.

- Dietz, C., K. T. Stiller, M. Griese, C. Schulz & A. Susenbeth. 2013. Influence of salinity on energy metabolism in juvenile turbot, *Psetta maxima* (L.). *Aquaculture Nutrition*, 19, 135–150.
- Eckelbarger, K. J., R. Scalan & J. A. C. Nicol. 1980. The outer retine and tapetum lucidum of the snook *Centropomus undecimalis* (Teleostei). *Canadian Journal of Zoology*, 58(6), 1042–1051.
- Einarsson, S., P. S. Davies & C. Talbot. 1996. The effect of feeding on the secretion of pepsin, trypsin and chymotrypsin in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Fish Physiology and Biochemistry*, 15(5), 439–446.
- Erlanger, B. F., N. Kokowsky & W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95, 271–278.
- Eroldogan O. T., M. Kumlu & M. Aktas. 2004. Optimum feeding rates for European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. reared in seawater and freshwater. *Aquaculture*, 231, 501–515.
- Eusebio, P. S. & R. M. Coloso. 2002. Proteolytic enzyme activity of juvenile Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch), is increased with protein intake. *Aquaculture Research*, 33, 569–574.
- FAO. 2012. The state of world fisheries and aquaculture 2012. FAO. Roma.
- FAO. 2013. Estadísticas de Pesca y Acuicultura. Diciembre 2013. FAO. Roma.
- FAO. 2013. Fisheries and Aquaculture Department has published the Global Aquaculture Production Statistics for the year 2011. Marzo 2013. FAO. Roma.
- Filk, G., P. H. M. Klaren, T. J. M. Schoenmakers, M. J. C. Bijvelds, P. M. Verboost & S. E. W. Bonga. 1996. Cellular calcium unique transport universal mechanisms. *Physiological Zoology*, 69(2), 403–417.
- Fountoulaki, E., M. N. Alexis, I. Nengas & B. Venou. 2005. Effect of diet composition on nutrient digestibility and digestive enzyme levels of

- gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research*, 36, 1243–1251.
- Fournier, V., C. Huelvan & E. Desbruyeres. 2004. Incorporation of a mixture of plant feedstuffs as substitute for fish meal in diets of juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 236(1-4), 451–465.
- Fowler, L. G. 1991. Poultry by-product meal as a dietary protein source in fall chinook salmon diets. *Aquaculture*, 99(3-4), 309–321.
- Francis, G., H. P. S. Makkar & K. Becker. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 199, 197–227.
- García-Carreño, F. L., C Alburquerque-Cavalcanti., M. A. N. Toro & E. Zaniboni-Filho. 2002. Digestive proteinases of *Brycon orbignyanus* (Characidae, Teleostei): characteristics and effects of protein quality. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 132(2), 343–352.
- García-Ortega, A., D. Muy-Rangel, A. Puello-Cruz, Y. Villa-López, M. Escalante-Rojas & K. Preciado-Iñiguez. 2010. Uso de ingredientes de origen vegetal como fuentes de proteína y lípidos en alimentos balanceados para peces marinos carnívoros. *Avances En Nutrición Acuícola X. Memorias Del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, pp. 321–340.
- Gilmore, R. G., L. H. Billock & F. H. Berry. 1978. Hypothermal Mortality in Marine Fishes of South-Central Florida January, 1977. *Northeast Gulf Science*, 2(2), 77–97.
- Gjellesvik, D. R., D. Lombardo & B. T. Walther. 1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): purification and properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1124(2), 123–134.
- Glencross, B. D. 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture*, 1, 71–124.
- Glencross, B., N. Rutherford & B. Jones. 2011. Evaluating options for fishmeal replacement in diets for juvenile barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture Nutrition*, 17, 722–732.

- Gracia-López, V., T. García-Galano, G. Gaxiola-Córtés & J. PachePartridge co-Campos. 2003. Effect of dietary protein level and commercial feeds on growth and feeding of juvenile common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792). *Ciencias Marinas*, 29(4B), 585–594.
- Helland, S. J. & B. Grisdale-Helland. 2006. Replacement of fish meal with wheat gluten in diets for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): Effect on whole-body amino acid concentrations. *Aquaculture*, 261(4), 1363–1370.
- Hidalgo, M. C., E. Urea & A. Sanz. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, 170(3-4), 267–283.
- Hu, M., Y. Li, E. A. Decker & D. J. McClements. 2010. Role of calcium and calcium-binding agents on the lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model. *Food Hydrocolloids*, 24(8), 719–725.
- Ibarra-Castro L., L. S. Alvarez-Lajonchere, C. Rosas, I. G. Palomino-Alvarran, G. J. Holt & A. Sanchez-Zamora. 2011. GnRHa-induced spawning with natural fertilization and pilot-scale juvenile mass production of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) in captivity. *Aquaculture*, 319, 479-483
- Jamil, K., G. Abbas, R. Akhtar, H. Lin & Z. Li. 2007. Effects of replacing fishmeal with animal by-products meal supplementation in diets on the growth and nutrient utilization of mangrove red snapper. *Journal of Ocean University of China*, 6(3), 292–298.
- Jarvis, P. L. & J. S. Ballantye. 2003. Metabolic responses to salinity acclimation in juvenile shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum*. *Aquaculture*, 219, 891–909.
- Kimura, H., T. Futami, S. Tarui & T. Shinomiya. 1982. Activation of human pancreatic lipase activity by calcium and bile salts. *Journal of Biochemistry*, 92(1), 243–251.
- Krogdahl, A., A. Sundby & J. J. Olli. 2004. Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) digest and metabolize nutrients differently. Effects of water salinity and dietary starch level. *Aquaculture*, 229, 335–360.

- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *The Journal of General Physiology*, 30(4), 291–310.
- Lainé, J., M. Beattie & D. LeBel. 1993. Simultaneous kinetic determinations of lipase, chymotrypsin, trypsin, elastase and amylase on the same microtiter plate. *Pancreas*, 8, 383–386.
- Laiz-Carrión, R., S. Sangiao-Alvarellos, J. M. Guzmán, M. P. Martín del Río, J. L. Soengas & J. M. Mancera. 2005. Growth performance of gilthead sea bream *Sparus aurata* in different osmotic conditions: Implications for osmoregulation and energy metabolism. *Aquaculture*, 250, 849–861.
- Lasserre, P. & R. Gilles. 1971. Modification of the Amino Acid Pool in the Parietal Muscle of Two euryhaline Teleosts During Osmotic Adjustment. *Experientia*, 27, 1434–1435.
- Lemus-Areyzaga, I. R. 2015. Efecto de diferentes fuentes de proteína sobre la digestibilidad in vitro y aparente en juveniles de robalo blanco (*Centropomus undecimalis*). Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F., México.
- Lehninger. 2005. *Principios de bioquímica*. (M. M. Nelson, D. L. & Cox, Ed.) OMEGA (Cuarta edi.). Barcelona.
- Leung, L. Y. & N. Y. S. Woo. 2012. Influence of dietary carbohydrate level on endocrine status and hepatic carbohydrate metabolism in the marine fish *Sparus sarba*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(2), 543–54.
- Lorán-Núñez, R. M., F. R. Martínez-isunza, A. J. Valdez-guzmán, M. Garduño-dionate & E. Rolando. 2012. Reproducción y madurez sexual de robalo prieto (*Centropomus poeyi*) y robalo blanco (*C. undecimalis*) en el Sistema Lagunar de Alvarado, Veracruz (2005-2007). *Ciencia Pesquera*, 20(1), 49–64.
- Lundstedt, L. M., J. F. B. Melodo & G. Moraes. 2004. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comparative Biochemistry and Physiology - B*, 137, 331–339.
- Luo, Z., Y. J. Liu, K. S. Mai, L. X. Tian, D. H. Liu, X. Y. Tan & H. Z. Lin. 2005. Effect of dietary lipid level on growth performance, feed utilization

- and body composition of grouper *Epinephelus coioides* juveniles fed isonitrogenous diets in floating netcages. *Aquaculture International*, 13, 257–269.
- Maroux, S., D. Louvard & J. Baratti. 1973. The aminopeptidase from hog intestinal brush border. *Biochimica et Biophysica Acta*, 321, 282–295.
- Maxime, V., M. Peyraud-Waitzenegger, G. Claireaux & C. Peyraud. 1990. Effects of rapid transfer from sea water to fresh water on respiratory variables, blood acid-base status and O₂ affinity of haemoglobin in atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Comparative Physiology B*, 160, 31–39.
- Mayzaud, P & R. J. Conover. 1988. O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. *Marine Ecology Progress Series*, 45, 289–302.
- McCormick, S. D., R. I. Saunders & A. D. Macintyre. 1989. The effect of salinity and ration level on growth rate and conversion efficiency of Atlantic salmon (*Salmo salar*) Smolts. *Aquaculture*, 82, 173–180.
- McMichael, R. H., G. R. Peters & G. R. Parsons. 1989. Early life history of the snook *Centropomus*, in Tampa Bay, Florida. *Northeast Gulf Science*, 10(2), 113–125.
- Mihelakakis, A., C. Tsolkas & T. Yoshimatsu. 2002. Optimization of feeding rate for hatchery-produced juvenile gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 33(2), 169–175.
- Mohseni, M., M. H. S. Hassani, F. H. Pourali, M. Pourkazemi & S. C. Bai. 2011. The optimum dietary carbohydrate/lipid ratio can spare protein in growing beluga, *Huso huso*. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(2), 775–780.
- Moutou, K. A., P. Panagiotaki & Z. Mamuris. 2004. Effects of salinity on digestive protease activity in the euryhaline sparid *Sparus aurata* L.: a preliminary study. *Aquaculture Research*, 2, 912–914.
- Muller, R. G. & R. G. Taylor. 2012. The 2012 Stock Assessment Update of Common Snook, *Centropomus undecimalis*. *Florida Marine Research Institute*. St. Petersburg, Florida, USA.

- Nagase, G. 1964. Contribution to the physiology of digestion in *Tilapia mossambica* Peters: Digestives enzymes and the effects of diets on their activity. *Zeitschrift für vergleichende Physiologic*, 49, 270-284.
- Nagel, F., A. V. Danwitz, K. Tusche, S.Kroeckel, C. G. J. V. Bussel, M. Schlachter, H. Adem, R. P. Tressel & C. Schulz. 2012. Nutritional evaluation of rapeseed protein isolate as fish meal substitute for juvenile turbot (*Psetta maxima* L.) — Impact on growth performance, body composition, nutrient digestibility and blood physiology. *Aquaculture*, 356-357, 357–364.
- Nelson, J. S. 2006. *Fishes of the world*.(4th. Edition). New York: Wiley-Interscience.
- Nengas, I., M. N. Alexis & S. J. Davies. 1999. High inclusion levels of poultry meals and related byproducts in diets for gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Aquaculture*, 179(1-4), 13–23.
- Oliva-Teles, A. 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases*, 35(2), 83–108.
- Papoutsoglou, E. S. & A. R. Lyndon. 2006. Digestive enzymes of *Anarhichas minor* and the effect of diet composition on their performance. *Journal of Fish Biology*, 69(2), 446–460.
- Papoutsoglou, E. S. & A. R. Lyndon. 2006. Digestive enzymes of *Anarhichas minor* and the effect of diet composition on their performance. *Journal of Fish Biology*, 69, 446–460.
- Partridge, G. J. & G. I. Jenkins. 2002. The effect of salinity on growth and survival of juvenile black bream (*Acanthopagrus butcheri*). *Aquaculture*, 210, 219–230.
- Perera-García, M. A., M. Mendoza-Carranza, W. M. Contreras-Sánchez, M. uerta-Ortíz & E. Pérez-Sánchez. 2011). Reproductive biology of common snook *Centropomus undecimalis* (Perciformes: *Centropomidae*) in two tropical habitats. *Revista de Biología Tropical*, 59(2), 669–681.
- Pérez, L., H. Gonzales, M. Jover & J. Fernández-Carmona. 1997. Growth of European sea bass fingerlings (*Dicentrarchus labrax*) fed extruded diets

- containing varying levels of protein , lipid and carbohydrate. *Aquaculture*, 156, 183–193.
- Pérez-Jiménez, A., G. Cardenete, A. E. Morales, A. García-Alcázar, E. Abellán & M. C. Hidalgo. 2009. Digestive enzymatic profile of *Dentex dentex* and response to different dietary formulations. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 154(1), 157–64.
- Perez-pinzon, M. A. & P. L. Lutz. 1991. Activity Related Cost of Osmoregulation in the Juvenile Snook (*Centropomus undecimalis*). *Bulletin of Marine Science*, 48(1), 58–66.
- Psochiou, E., Z. Mamuris & P. Panagiotaki. 2007. The response of digestive proteases to abrupt salinity decrease in the euryhaline sparid *Sparus aurata* L . *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 147, 156–163.
- Rawles, S. D., M. Riche, T. G. Gaylord, J. Webb, D. W. Freeman & M. Davis. 2006. Evaluation of poultry by-product meal in commercial diets for hybrid striped bass (*Morone chrysops* ♀×*M. saxatilis* ♂) in recirculated tank production. *Aquaculture*, 259(1-4), 377–389.
- Reimer, G. 1982. The influence of diet on the digestive enzymes of the Amazon fish Matrinchã, *Brycon cf. melanopterus*. *Journal Fish Biology*, 21, 637-642.
- Rema, P., L. E. C. Conceição, F. Evers, M. Castro-Cunha, M. T. Dinis & J. Dias. 2008. Optimal dietary protein levels in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture Nutrition*, 14(3), 263–269.
- Rhody, N. R., N. A. Nassif & K. L. Main. 2010. Effects of salinity on growth and survival of common. *Aquaculture Research*, 41, 357–360.
- Rivas, L. R. 1986. Systematic Review of the Perciform Fishes of the Genus *Centropomus*. *Copeia*, 3, 579–611.
- Roberts, R. 2002. *Nutritiona Pathology In. :Fish Nutrition*. (R. W. Hlaver, J.E. & Hardy, Ed.) (3rd edn.). San Diego, USA: Academic Press.

- Robyt, J. F. & W. J. Whelan. 1968. *The α -amylase*. In: Radley JA (ed) *Starch and its derivatives*. London: Academic Press.
- Rocha, A. J., V. Gomes, P. V. Ngan, S. Passos & R. R. Furia. 2005. Metabolic demand and growth of juveniles of *Centropomus parallelus* as function of salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 316, 157–165.
- Rock, J. E. 2009. Summer Feeding Ecology of Juvenile Common Snook in Southwest Florida Tidal Creeks. Tesis de Maestría. Universidad de Florida, Florida, USA.
- Rodiles, A., E. Santiagosa, M. Herrera, I. Hachero-Cruzado, M. L. Cordero, S. Martínez-Liorens, S. P. Lall & F. J. Alarcón. 2012. Effect of dietary protein level and source on digestive proteolytic enzyme activity in juvenile Senegalese sole, *Solea senegalensis* Kaup 1850. *Aquaculture International*, 20(6), 1053–1070.
- Rosenberg, I. R., A. L. Coleman & L. E. Rosenberg. 1964. The role of sodium ion in the transport of amino acids by the intestine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 102(1965), 161–171.
- Rubio, V. C., F. J. Sánchez-Vázquez & J. A. Madrid. 2005. Effects of salinity on food intake and macronutrient selection in European sea bass. *Physiology & Behavior*, 85, 333–339.
- Sabapathy, U. & L. H. Te. 1995. Some properties of the intestinal proteases of the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* (Park). *Fish Physiology and Biochemistry*, 14(3), 215–221.
- Santinha, P. J. M., F. Medale, G. Corraze & E. F. S. Gomes. 1999. Effects of the dietary protein: lipid ratio on growth and nutrient utilization in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Nutrition*, 5, 147–156.
- Sanz, A., M. García Gallego & M. De la Higuera. 2000. Protein nutrition in fish: protein/energy ratio and alternative protein sources to fish meal. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 56(3), 275–82.
- Sargent, J. R., D. R. Tocher & J. G. Bell. 2002. The lipids In.: *Fish Nutrition*. (R. W. Hlaver, J.E. & Hardy, Ed.) (3rd edn.). San Diego, USA: Academic Press.

- Schulz, C., M. Bohm, M. Wirth & B. Rennert. 2007. Effect of dietary protein on growth, feed conversion, body composition and survival of pike perch fingerlings (*Sander lucioperca*). *Aquaculture Nutrition*, 13, 373–380.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Agricultura. 2012. Carta Nacional Pesquera. *Diario Oficial*, 236.
- Serrano, J. A., G. R. Nematipour & D. M. Gatlin III. 1992. Dietary protein requirement of the red drum (*Sciaenops ocellatus*) and relative use of dietary carbohydrate and lipid. *Aquaculture*, 101, 283–291.
- Shapawi, R., W.-K. Ng & S. Mustafa. 2007. Replacement of fish meal with poultry by-product meal in diets formulated for the humpback grouper, *Cromileptes altivelis*. *Aquaculture*, 273(1), 118–126.
- Silva-Carrillo, Y., C. Hernández, R. W. Hardy, B. González-Rodríguez & S. Castillo-Vargasmachuca. 2012. The effect of substituting fish meal with soybean meal on growth, feed efficiency, body composition and blood chemistry in juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Aquaculture*, 364-365, 180–185.
- Slawski, H., H. Adem, R. P. Tresse, K. Wysujack, U. Koops, Y. Kotzamanis, S. Wuertz & C. Schulz. 2011. Total fish meal replacement with rapeseed protein concentrate in diets fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture International*, 20(3), 443–453.
- Smith, R. L. 1969. Intestinal amino-acid transport in the marine teleost, *Haemulon plumieri*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 30(6), 1115–1123.
- Soligo, T. A., A. S. Garcia & V. R. Cerqueira. 2011. Weaning of the common snook (*Centropomus undecimalis*) early juveniles reared in laboratory using commercial and experimental diets. *Boletim Do Instituto de Pesca, São Paulo, Brasil*, 37(4), 367–374.
- Souza, J. H., F. D. Machado, G. A. Sachsida, R. F. Furtado & M. Y. Tsuzuki. 2011. Desempenho zootécnico e econômico de juvenis de robalo - peva alimentados com dietas contendo diferentes concentrações proteicas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2(1), 190–195.

- Souza-Filho, J. J. & V. R. Cerqueira. 2003. Influência da densidade de estocagem no cultivo de juvenis de robalo-flecha. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(11), 1317–1322.
- Steffens, W. 1994. Replacing fish meal with poultry by-product meal in diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 124(1-4), 27–34.
- Storebakken, T., K. D. Shearer & G. Baeverfjord. 2000. Digestibility of macronutrients, energy and amino acids, absorption of elements and absence of intestinal enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with wheat gluten. *Aquaculture*, 184, 115–132.
- Subhadra, B., R. Lochmann, S. Rawles & R. Chen. 2006. Effect of fish-meal replacement with poultry by-product meal on the growth, tissue composition and hematological parameters of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) fed diets containing different lipids. *Aquaculture*, 260(1-4), 221–231.
- Swanson, C. 1998. Interactive effects of salinity on metabolic rate, activity, growth and osmoregulation in the euryhaline milkfish (*Chanos chanos*). *The Journal of Experimental Biology*, 201, 3355–3366.
- Tacon, A. G. J. & M. Metian. 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.
- Takagi, S., H. Hosokawa, S. Shimeno & M. Ukawa. 2000. Utilization of Poultry By-Product Meal in a Diet for Red Sea Bream *Pagrus major*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 66(3), 428–438.
- Tanaka, A. & E. Hoshino. 2002. Calcium-binding parameter of *Bacillus amyloliquefaciens* alpha-amylase determined by inactivation kinetics. *The Biochemical Journal*, 364, 635–639.
- Taylor, G. R., J. A. Whittington, H. J. Grier & R. E. Crabtree. 1996. Age, growth, maturation, and protandric sex reversal in common snook, *Centropomus undecimalis*, from the east and west coasts of South Florida. *Fishery Bulletin*, 98, 612–624.
- Taylor, R. G., H. J. Grier & J. A. Whittington. 1998. Spawning rhythms of common snook in Florida. *Journal of Fish Biology*, 53, 502–520.

- Tibbetts, S. M., S. P. Lall & D. M. Anderson. 2000. Dietary protein requirement of juvenile American eel (*Anguilla rostrata*) fed practical diets. *Aquaculture*, 186, 145–155.
- Tsuzuki, M. Y., J. K. Sugai, J. C. Maciel, C. J. Francisco & V. R. Cerqueira. 2007. Survival, growth and digestive enzyme activity of juveniles of the fat snook (*Centropomus parallelus*) reared at different salinities. *Aquaculture*, 271(1-4), 319–325.
- Tuan, L. A. & K. C. Williams. 2007. Optimum dietary protein and lipid specifications for juvenile malabar grouper (*Epinephelus malabaricus*). *Aquaculture*, 267, 129–138.
- Tucker, J. J. W. 1987. Snook and Tarpon Snook Culture and Preliminary Evaluation for Comercial Farming. *The Progressive Fish-Culturist*, 49, 49–57.
- Turker, A., M. Yigit, S. Ergun, B. Karaali & A. Erteken. 2005. Potential of poultry by-product meal as a substitute for fishmeal in diets for black sea turbot *Scophthalmus maeoticus*: growth and nutrient utilization in winter. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, 57(1), 49–61.
- Tusche, K., F. Nagel, S. Arning, S. Wuertz, A. Susenbeth & C. Schulz. 2013. Effect of different dietary levels of potato protein concentrate supplemented with feed attractants on growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Feed Science and Technology*, 183(3-4), 202–209.
- Viaplana-Marín, I., J. Fernández-Borrás & J. Blasco. 2005. Effects of the protein/carbohydrate ratio of extruded diets on protein synthesis, protein growth and body composition in juvenile brown trout (*Salmo trutta*). *Aquaculture International*, 14(4), 337–353.
- Walton, M. J. 1986. Metabolic effects of feeding a high protein/low carbohydrate diet as compared to a low protein/high carbohydrate diet to rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 15(I), 7–15.
- Wang, Y., K. Li, H. Han, Z.-X. Zheng & D. P. Bureau. 2008. Potential of using a blend of rendered animal protein ingredients to replace fish meal

- in practical diets for malabar grouper (*Epinephelus malabricus*). *Aquaculture*, 281(1-4), 113–117.
- Webster, C. D., L. G. Tiu, J. H. Tidwell, P. V. Wyk & R. D. Howerton. 1995. Effects of dietary protein and lipid levels on growth and body composition of sunshine bass (*Morone chrysops* X *M. saxatilis*) reared in cages. *Aquaculture*, 131, 291–301.
- Webster, C. D. & C. Lim. 2001. Proteins and Amino Acids in: Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture. (C.D. Webster and C.E. Lim, Ed). USA: Cabi Publishing.
- Whittamore, J. M. 2012. Osmoregulation and epithelial water transport: lessons from the intestine of marine teleost fish. *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 182(1), 1–39.
- Williams, K. C., C. G. Barlow, L. Rogers, I. Hockings, C. Agcopra & I. Ruscoe. 2003. Asian seabass *Lates calcarifer* perform well when fed pelleted diets high in protein and lipid. *Aquaculture*, 225, 191–206.
- Wilson, R. P. (1992). Amino Acids and Proteins In: Fish Nutrition. (R. W. Hlaver, J.E. & Hardy, Ed.) (3rd edn.). San Diego, USA: Academic Press.
- Wilson, R. P. 1994. Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture*, 124(94), 67–80.
- Woo, N. Y. S. & S. P. Kelly. 1995. Effects of salinity and nutritional status on growth and metabolism of *Sparus sarba* in a closed seawater system. *Aquaculture*, 135(95), 229–238.
- Wuenschel, M. J., A. R. Jugovich & J. Hare. 2005. Metabolic response of juvenile gray snapper (*Lutjanus griseus*) to temperature and salinity: Physiological cost of different environments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 321(2), 145–154.
- Yigit, M., M. Erdem, S. Koshio, S. Ergun, A. Turker & B. Karaali. 2006. Substituting fish meal with poultry by-product meal in diets for black Sea turbot *Psetta maeotica*. *Aquaculture Nutrition*, 12(February), 340–347.

- Zhou, Q.-C., J. Zhao, P. Li, H.-L.Wang & L.-G. Wang. 2011. Evaluation of poultry by-product meal in commercial diets for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 322-323, 122–127
- Zhu, H., G. Gong, J. Wang, X. Wu, M. Xue, C. Niu & Y. Yu. 2011. Replacement of fish meal with blend of rendered animal protein in diets for Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt), results in performance equal to fish meal fed fish. *Aquaculture Nutrition*, 17(2), 389–395.