

Avances en la fisiología digestiva del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) en Tabasco, México

Carlos Alfonso Alvarez-González*¹, Gabriela Gaxiola-Cortés², Luis Daniel Jiménez-Martínez¹, Adolfo Sanchez-Zamora², Leticia Arena-Ortiz², Talhía Martínez-Bruguete¹, Dariel Tovar-Ramírez³, Bartolo Concha-Frías⁴, Gabriel Márquez-Couturier¹, Natalia Perales-García¹, Gloria Gertrudys Asencio-Alcudia¹, Fidel Jesús-Ramírez¹

¹Laboratorio de Acuicultura Tropical, DACBIOL-UJAT. Carr. Vhsa-Cárdenas s/n Km. 0.5, Villahermosa, Tabasco, Mexico. *alvarez_alfonso@hotmail.com

²Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación – UNAM, Yucatán, México

³Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste; La Paz, B.C.S., México

⁴Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile

Palabras clave: *Enzimas digestivas, Digestibilidad in vitro, Expresión génica*

Resumen

El robalo blanco (*Centropomus undecimalis*, Bloch) es un pez marino de alto valor comercial en el Sureste de México, por lo cual ha sido sobreexplotado mermando sus poblaciones. De esta manera, se han iniciado los estudios para desarrollar su cultivo, donde el entendimiento de la fisiología digestiva permitirá implementar alimentos artificiales que logren mejorar el crecimiento y supervivencia durante su cultivo. El objetivo de esta investigación es evaluar la capacidad digestiva de *C. undecimalis* utilizando técnicas bioquímicas y moleculares. Se tomaron muestras de larvas y juveniles de *C. undecimalis* para realizar diversos estudios sobre los cambios de las enzimas digestivas (proteasas, lipasas, amilasas y fosfatasas) y su expresión molecular (tripsina, lipasa y ubiquitina), la caracterización de proteasas por medio de técnicas bioquímicas y electroforéticas, así como la digestibilidad in vitro de ingredientes y alimentos artificiales usando el método de pH STAT. El pH óptimo de proteasas ácidas se encuentra en 2 con alta estabilidad entre 2 y 8, mientras que la temperatura óptima es de 75°C con altas estabilidades de 25 a 55°C, la cual fue inhibida en 86% con pepstatín A. Para las proteasas alcalinas el óptimo de pH y temperatura fueron de 7 a 11 y 65°C

Alvarez, A. et al. 2010. Avances en la fisiología digestiva del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) en Tabasco, México. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 98-231.

respectivamente, mostrando una elevada resistencia a los cambios de pH y temperatura (4-10 y 35-65°C respectivamente). Estas proteasas se inhibieron con PMSF (60%), ovoalbúmina (59%), SBT1 (41%), TLCK (68%), y TPCK (17%), indicando la presencia de serina proteasas, mientras que las metalo proteasas se inhibieron en 40% con EDTA y 85% con 1-10 fenantrolina. El grado de hidrólisis de ingredientes proteínicos mostró que la harina de jaiba, sardina, puerco y sangre de res tienen altos valores para las fases ácidas y alcalinas, además que la liberación de aminoácidos fue mayor con la harina de sardina para la fase ácida y del hidrolizado de pescado para la fase alcalina. Durante la ontogenia inicial, la tripsina, quimotripsina, L-aminopeptidasa, carboxypeptidasa A, lipasa, amilasa y fosfatasas están presentes desde la absorción del vitelo (1 días post-eclosión, dpe), mostrándose dos picos de actividad entre los 12 y 25 dpe. La Pepsina fue detectada del 34 dpe en adelante. Los zimogramas muestran dos bandas, la primera (26.1 kDa) a los 25 dpe, y la segunda (51.6 kDa) a los 36 dpe. El zimograma de proteasa ácida muestra dos bandas (0.32 y 0.51 rf's) a los 34 dpe. Finalmente, a partir de tejidos de juveniles se lograron amplificar los genes de tripsina, lipasa y ubiquitina, los cuales muestran altas similitudes (>85%) con los mismos genes de otros peces al utilizar el BLAST. De esta manera, el conocimiento de la fisiología digestiva de *C. undecimalis* es similar a la de otros peces marinos de hábitos alimenticios carnívoros.

Introducción

Piscicultura marina

La acuicultura es una actividad que está creciendo de manera rápida en el mundo, como consecuencia de la gran demanda que existe en el mercado mundial, por lo que esta actividad ha cobrado mayor interés en los últimos años. En el caso del cultivo de peces marinos representada por el salmón del Atlántico (*Salmo salar*, Linnaeus) como la especie de mayor producción tuvo un incremento de 1999 al 2007 de casi un 100% pasando de 805,616 toneladas a 1'433,708 toneladas respectivamente. (FAO, 2010).

Por otra parte, en la región Sureste de México, el cultivo de peces marinos es una actividad incipiente, la cual se ha dado por la engorda comercial de la cobia (*Rachycentron canadum*, Linnaeus) a nivel privado. Sin embargo, que desde hace varios años se han iniciado los estudios para realizar el cultivo de diversas especies de peces donde la familia de Centropómidos es uno de los grupos de mayor demanda, por lo cual ha sido sobreexplotado mermando sus poblaciones naturales. De este conjunto de especies, *C. undecimalis* es una de las más importantes desde el punto de vista acuícola por diversos factores.

Biología y distribución del robalo blanco

El robalo blanco *C. undecimalis*, es un miembro de los peces tropicales de la familia *Centropomidae* (Tucker Jr. & Campbell, 1998; Tucker Jr., 2003) que se ubica dentro del grupo de especies marinas con mayor potencial de cultivo (Álvarez-Lanjonchère & Taylor, 2003; Tucker Jr., 2003), en latitudes tropicales y subtropicales, del Norte de América Central y América del Sur, distribuyéndose desde Carolina del Norte hasta Río de Janeiro Brasil, (Álvarez-Lajonchère & Taylor, 2003) incluyendo Bahamas, el Golfo de México y algunas Islas de las Antillas y se ha reportado que llega a pesar hasta 25 kilogramos, con una longitud de hasta 1 metro (Seaman & Collins, 1983).

Esta especie alcanza la madurez sexual entre los 4 y los 6 años de edad (Álvarez-Lanjonchère & Taylor, 2003). Su importancia comercial se debe a la consistencia firme, blancura, sabor y aroma delicado de su carne blanda, que lo hacen una fuente importante de alimento para las ciudades de Sur y Centroamérica (Tringali & Bert, 1996), siendo por esto una de las especies nativas más importantes a lo largo de la línea costera del Golfo de México, principalmente, Tabasco y Campeche (Sánchez-Zamora *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista de su fisiología es un pez eurihalino, protándrico hermafrodita (Lowerre-Barbieri *et al.*, 2003) de hábitos carnívoros, localizado en estuarios y ríos durante el invierno, las cuales tienen fuentes permanentes de agua dulce que se unen al mar (Tringali & Bert 1996), los adultos migran durante el verano al mar donde llevan a cabo los desoves a temperaturas entre 25-31°C (Tucker Jr. & Campbell, 1998; Tucker Jr. 2003), ya que el esperma se activa sólo en aguas salinas, realizando el desove asíncrono pelágico desde mayo a septiembre en las bocas de ríos, entradas y canales.

Importancia de los Centropómidos para la acuicultura

Las especies de la familia Centropomidae son capturados en grandes cantidades a lo largo de la línea costera del Golfo de México y Estados Unidos, siendo utilizados para pesca deportiva (Roberts Jr., 1987; Taylor *et al.*, 2001) y alimenticia (Álvarez-Lanjonchère, 2001) en Florida y Sur de Texas, exportándose desde Sudamérica a los Estados Unidos. Por su parte, en el Estado de Tabasco es el segundo mayor productor pesquero de este pez, siendo superado solo por el estado de Campeche, donde se lleva a cabo un sistema de acuicultura para esta especie, mediante la captura de juveniles del medio natural, y son llevados a etapas de crecimiento y engorda bajo condiciones controladas. A partir de 1999 Tabasco presentó un incremento considerable en la captura del robalo, logrando alcanzar una captura anual de casi las 3,000 toneladas de este pez para el año 2003 en Tabasco, y en México ese año se presentó una pesca total de 9,750 toneladas. Estos altos niveles de captura, son el resultado de un incremento en el número de pescadores de la región, la

importancia alimenticia, su alto valor en el mercado y su fácil acceso. No obstante, el volumen de la producción pesquera de México fue de 8,439 toneladas, mientras que en Tabasco el volumen de la producción en peso desembarcado y vivo fue de 2,890 toneladas (SAGARPA, 2004).

De esta manera, se requieren de investigaciones si se pretende implementar el cultivo completo de esta especie; de esta manera, se han realizado algunos estudios, entre los que destacan los realizados por Lau & Shafland (1982), sobre el desarrollo larval mostrando un incremento de longitud de 2,1mm en 36 horas y un incremento gradual de crecimiento desde 0,15-0,50 mm/día en robalos entre 2,2-3,5mm, con desarrollo similar a otros centropómidos. La revista *Northeast Gulf Science* (1986), indica que en los primeros dos días de eclosión se forma una boca funcional con capacidad de adquirir el alimento; mientras Roberts Jr. (1987), reporta un 100% de mortalidad larvaria con huevos obtenidos mediante inducción hormonal dando como limitantes al fotoperíodo y a la temperatura. Tucker (1987), propone un esquema básico de alimentación para larvas y juveniles con alimentos balanceados y alimento fresco, donde los alimentos de atún y trucha presentaron los mejores índices de crecimiento en estanques rústicos. También reporta desoves en las costas del Este Central de Florida, durante finales de la primavera y el verano (octubre a febrero) (Tucker & Campbell, 1988).

Wallace *et al.* (1993), reportaron que el estrés por captura y traslado afecta los folículos, alcanzando hasta el 100% de anormalidad en los folículos, sin embargo Taylor *et al.* (2001), reportan un efecto nulo, del estrés por captura sobre la mortalidad. Álvarez-Lajonchère (2001), resalta la importancia de la inclusión de esta especie a la acuicultura, más tarde Lowerre- Barbieri *et al.* (2003), publican que estos organismos son capaces de desovar después de la captura, no encontrando niveles de atresia en el ovario, como suele producirse en otras especies donde se finaliza prematuramente el desove. Tucker Jr. (2003), indica que la temperatura óptima de desove es entre 22-23°C y el crecimiento larval óptimo

es a temperaturas entre 25-29°C, presentándose mortalidad de juveniles a 10 y 35°C, presentando un crecimiento óptimo a temperaturas de 28°C.

Álvarez-Lajonchère & Taylor (2003), reportan costos en producción de alimentos balanceados para la producción de juveniles entre 14 a 16% mientras la producción de alimento vivo es entre 26 a 37% del total de la producción. Zarsa-Meza *et al.* (2006 a y b), realizaron el cultivo del robalo blanco en conjunto con el robalo chucumite (*Centropomus parallelus*, Poey) obteniendo buenos resultados de crecimiento, al ser alimentados con tilapia.

Una de las mayores limitantes para el cultivo de una especie es la nutrición, ya que si la calidad, cantidad y el suministro de alimento no son los adecuados se elevan los costos de alimentación, infraestructura, labor y energía (Koven *et al.*, 2001b), lo cual puede llegar a representar hasta el 60% del costo total de producción en acuicultura (Tacón, 1993), por lo que se hace necesario desarrollar alimentos balanceados que sostengan adecuadamente el crecimiento de los juveniles (Hardy, 1989; Steffens, 1989; Ma *et al.*, 2005). Ante la problemática del cultivo de esta especie, se ha comenzado con los estudios básicos relacionados con el proceso de obtención de nutrientes del sistema digestivo durante la crianza del robalo blanco. Los alimentos en acuicultura están basados primordialmente en el contenido proteínico, utilizándose concentraciones en 60-70% de proteína (Sunde, 2006), especialmente para especies carnívoras que tienen una alta actividad enzimática para digerir este tipo de dietas (Catacutan & Coloso, 1995; Donovan *et al.*, 2004).

Problemática de la producción de alimentos acuícolas

El pescado es uno de los principales constituyentes en la alimentación humana por ser una fuente importante de proteínas y la forma de obtención de este recurso es la pesca, sin embargo la FAO (2006), indica que alrededor del 50% de los recursos pesqueros marinos

mundiales están totalmente explotados, el 25% están sobreexplotados y alrededor del otro 25% parece que podrían soportar una tasa mayor de explotación. Esto indica la necesidad de encontrar nuevas alternativas de producción acuática, donde el cultivo de peces marinos parece ser una buena solución al ser una fuente importante de proteínas.

Por otro lado, la harina de pescado es la fuente más importante en la elaboración de alimentos balanceados, por lo que desde hace algunos años, se están buscando otras fuentes proteínicas alternativas para su elaboración, con la finalidad de reducir los costos de producción (Córdova-Murueta & García-Carreño, 2002). Algunas de estas fuentes, como por ejemplo la harina de soya, presentan componentes antinutricionales al poseer inhibidores de tripsina (Ezquerro *et al.*, 1997; Alarcón *et al.*, 2001b), reduciendo la digestibilidad en el pez. Es necesario entonces conocer la fuente apropiada, que debe ser utilizada en la elaboración de la dieta del pez. Para determinar estas fuentes proteínicas, es necesario realizar estudios sobre fisiología digestiva, apoyados en análisis sobre la actividad enzimática digestiva del pez, que ayuden a mejorar la nutrición animal.

La formulación y fabricación de los alimentos se basan en la determinación de los análisis proximales de los ingredientes que cuantifican el contenido de los nutrientes con los que se fabrican los alimentos, pero que no ofrecen información sobre las cantidades de nutrientes requeridas por el organismo. Una aproximación que permite valorar la capacidad digestiva de los organismos es la utilización de métodos “*in vivo*”, donde se determinan parámetros o índices relacionados con el grado de aprovechamiento de las dietas, en relación con el nutriente que las compone.

Todos estos ensayos resultan costosos, tediosos y largos debido a la necesidad de instalaciones adecuadas, mantenimiento de los animales y el análisis de éstos y sus excretas. Otro método es el empleo de marcadores no digeribles (como el óxido de cromo), para determinar la digestibilidad *in vivo*, el cual conlleva algunos problemas dando solamente una medida indirecta de la digestibilidad, resultando complicado debido al lento

crecimiento de las especies, la dificultad de recolectar las heces en el medio acuático y la influencia de los niveles de inclusión de éstos sobre el aprovechamiento de algunos combustibles (March *et al.*, 1985; Shiau & Liang, 1995).

Recientemente se han realizado pruebas de alimentación mediante el empleo de técnicas más efectivas para medir el valor nutritivo de los alimentos, como es el caso de pH STAT (Ávalos-Sánchez, 2006). El pH STAT es una herramienta que simula mediante la digestibilidad *in Vitro* las condiciones del tracto digestivo de los organismos tomando en consideración el pH, la temperatura y el tiempo de residencia del alimento (Grabner, 1985), ayudando a determinar la fuente alimenticia con mayor grado de degradación por la acción de las proteasas digestivas del organismo en estudio, permitiendo seleccionar ingredientes digeribles y biodisponibles que hagan mas eficientes las dietas (Moyano *et al.*, 1998; Álvarez-González, 2003).

Estos estudios son rápidos y permiten una observación aproximada de la ruptura de enlaces peptídicos usando cantidades pequeñas de material crudo (Ezquerria *et al.*, 1997), prediciendo la habilidad de una especie para asimilar diferentes nutrientes proteínicos otorgados en la dieta (García-Carreño *et al.*, 2002; Fu *et al.*, 2005; Furné *et al.*, 2005), lo cual esta estrechamente relacionado con la actividad de las enzimas disponibles (Moyano *et al.*, 1998; Fu *et al.*, 2005). Según Bleir *et al.* (2002), una variación en las cantidades de enzimas digestivas, puede causar cambios en el crecimiento del pez, como anomalías o un aumento en la tasa de crecimiento.

La asimilación de nutrientes explica entonces la digestibilidad del nutriente (Kolkovski, 2001), y la capacidad digestiva del pez (Kumar *et al.*, 2005). Si la proteína del alimento no es la apropiada para los requerimientos fisiológicos del organismo esta no puede ser completamente asimilada (Córdova-Murueta & García-Carreño, 2002), siendo entonces la

eficiencia del alimento determinada por la función de sus aminoácidos esenciales (Nankervis & Southgate, 2006).

En este sentido, si se pretende incluir al robalo blanco en la acuicultura, se requiere realizar estudios minuciosos sobre su fisiología digestiva, para comprender desde los aspectos básicos de su fisiología, hasta la aplicación tecnológica, para determinar los ingredientes proteínicos adecuados para la formulación de alimentos balanceados que sostenga el crecimiento de juveniles una vez terminado el proceso de adaptación a un alimento artificial (Ma *et al.*, 2005).

En México existe una gran cantidad de especies acuáticas de importancia comercial para la acuicultura, sin embargo, el desarrollo de esta actividad se ha visto limitada por diversos factores, entre los cuales destaca la carencia de estudios respecto a las especies nativas de importancia comercial. Tabasco es un estado con potencial para la acuicultura, siendo el robalo la especie de mayor importancia económica en el mercado mexicano, que es abastecido exclusivamente por la pesca artesanal. Por ello, es necesario realizar estudios de aspectos nutricionales que nos garanticen el éxito de su cultivo. En base a esto, son necesarios los estudios enzimáticos para determinar las mejores formulaciones dietarias que aumenten la supervivencia y la tasa de producción, haciendo sustentable el cultivo.

Los investigadores del Laboratorio de Acuicultura Tropical de la División Académica de Ciencias Biológicas, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, han desarrollado las bases para el cultivo de especies endémicas de la región como son: el pejelagarto (*Atractosteus tropicus*, Gill), Tenguayaca (*Petenia splendida*, Günther), castarrica (*Cichlasoma urophthalmus*, Günther) y paletas (*Vieja bifasciata*, Steindachner y *V. synspila*, Hubbs), contando con la infraestructura necesaria para realizar los estudios de nutrición y producción de juveniles de robalo en colaboración con los investigadores de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la UNAM en Sisal, Mérida. En la presente investigación, el objetivo general es caracterizar y evaluar la capacidad

digestiva de larvas y juveniles de *C. undecimalis* usando técnicas bioquímicas y moleculares a fin de diseñar alimentos balanceados para estas etapas.

Antecedentes

Enzimas digestivas

En el proceso de digestión, la proteína del alimento es hidrolizada por las enzimas digestivas (García-Carreño *et al.*, 1997), las cuales catalizan la reacción de hidrólisis incrementando la velocidad de la reacción. La mayor parte de los catalizadores biológicos son proteínas, las cuales están clasificadas por la Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica en seis grandes grupos (Lehninger, 1984; Mathews & Van Holde, 1998):

1. Óxido reductasas: que catalizan reacciones de oxidación-reducción.
2. Transferasas: que catalizan transferencias de grupos funcionales de una molécula a otra.
3. Hidrolasas: que catalizan rupturas hidrolíticas.
4. Liasas: que catalizan eliminaciones de un grupo o adiciones a un grupo a un doble enlace, u otras rupturas que implican un reordenamiento electrónico.
5. Isomerasas: que catalizan reordenamientos intramoleculares.
6. Ligasas: que catalizan reacciones en las que se unen dos moléculas.

Son de particular interés para esta investigación las enzimas digestivas, muchas de ellas pertenecen al grupo 3 y se han dividido en los siguientes grupos en función del tipo de nutriente que hidrolizan.

Las proteasas

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos que forman la estructura primaria de las proteínas y se encuentran presentes en muchos organismos

(Dixon & Webb, 1979). Están implicadas en procesos como la digestión de proteínas, la activación de proenzimas y prehormonas entre otros (Stroud, 1975). La clasificación de las proteasas, al ser hidrolasas específicas de enlaces peptídicos, se agrupan bajo el código EC 3.4. Dentro de ellas, existen dos subgrupos: las exopeptidasas, que hidrolizan enlaces peptídicos entre aminoácidos terminales (extremo amino o carboxilo de la proteína), y se agrupan bajo la categoría EC 3.4.11-19. Las endopeptidasas, hidrolizan enlaces peptídicos internos que pertenecen a la categoría 3.4.21-24. Asimismo, se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción, donde se reconocen 4 grupos principales:

1. Serina-proteasas (EC 3.4.21): poseen un grupo serina en el centro activo, así como histidina y ácido aspártico.
2. Cisteína-proteasas (EC 3.4.22): se caracterizan por la presencia del grupo cisteína (-SH) en su centro catalítico.
3. Proteasas ácidas o Aspárticas (EC 3.4.23): poseen la presencia de ácido aspártico en el centro activo, y máxima actividad a pH ácido.
4. Metal-proteasas (EC 3.4.24): tienen un residuo de ácido glutámico en el centro activo, y requieren de un catión divalente (Zn, Ca o Mg) para catalizar la hidrólisis del enlace peptídico.

Para profundizar en la clasificación se han propuesto 6 grupos en función de su secuencia aminoácídica (Tabla 1), las cuales comparten hasta un 50% de esta secuencia (Dumermuth *et al.*, 1991).

Tabla 1. Clasificación de proteasas. Tomada de Alarcón (1997) y modificado de Neurath (1989).

Clase	Enzima	Origen
Serina I	tripsina	Páncreas
	quimotripsina	Páncreas
Serina II	subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Cisteína	papaína	<i>Papaya latex</i>
	quimopapaína	<i>Papaya latex</i>
	ficina	<i>Ficus latex</i>
	bromelaína	<i>Ananas comosus</i>
	catepsina B	varios tejidos
Ácidas	pepsina	jugo gástrico
	quimosina	jugo gástrico (ind. jóvenes)
	catepsina D	Hígado, bazo
Metal I	carboxipeptidasa A	Páncreas bovino
Metal II	termolisina	<i>Bacillus themoproteolyticus</i>

Dentro del grupo de las endoproteasas se encuentran la *pepsina* (EC 3.4.23.1), *gastricina* (EC 3.4.23.3) y la *quimosina* o *renina* (EC 3.4.23.4) que son proteasas ácidas presentes en el jugo gástrico de muchos organismos. De éstas, la proteasa ácida más importante es la pepsina, la cual es una enzima aspártica que hidroliza a su máxima capacidad cuando se encuentra a pH ácido (2) y requiere que el residuo 2 de la cadena peptídica sea fenilalanil, tirosil o triptofanil. Este tipo de enzimas han sido purificadas con bastante éxito a partir de extractos derivados de vacas, pollos y peces. En el intestino de muchas especies se ha detectado otro tipo de enzimas que funcionan a pH alcalino como la *tripsina* (EC 3.4.21.4.) y la *quimotripsina* (EC 3.4.21.1) que son producidas en el páncreas y secretadas en forma inactiva al lumen del intestino. Estas enzimas pertenecen a la familia serina proteasa, una familia caracterizada por un tríada única de aminoácido sumamente catalítica conservada (histidina, ácido aspártico y serina) (Sunde, 2006), y son del grupo de las endopéptidasas,

siendo las más ampliamente estudiadas, ya que participan fuertemente en la digestión de proteínas en todos los animales.

Por supuesto no son las únicas y existen muchos tipos que también están involucradas dentro de este proceso, como la Leucin-alanin peptidasa ubicada en el citosol de los enterocitos y las enzimas intestinales de las membranas de borde de cepillo de los enterocitos, como son: la leucina aminopeptidasa, γ -glutamyl transpeptidasa, la fosfatasa alcalina y la maltasa, aunque en menor porcentaje. La tripsina es una endopeptidasa que tiene la capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos cuando el residuo 1 esta conformado por arginina o lisina. Mientras que la α -quimotripsina es capaz de hidrolizar enlaces peptídicos cuando el residuo 1 contiene tirosina, fenilalanina o triptófano (Whitaker, 1994). También actúa sobre amidas y ésteres, requiriendo iones Ca^{2+} para mantener su estabilidad estructural (Applebaum *et al.*, 2001). La tripsina es secretada de manera inactiva en forma de tripsinogeno y se activa mediante el retiro de una secuencia corta de aminoácido en la parte final carboxílica, por el rompimiento entre una lisina o el residuo arginina y un residuo isoleusina. Este paso es facilitado por la acción de la enteroquinasa o por la ya activada tripsina luminal. Una vez activada la tripsina, esta provoca una cascada de activación de otras proenzimas (Sunde, 2006).

Las *catepsinas* son enzimas relacionadas con los procesos de digestión intracelular. En el caso de las exoproteasas, se pueden mencionar las *aminopeptidasas* (EC 3.4.11) las cuales catalizan la hidrólisis de los restos aminoacídicos, concretamente desde el extremo amino de un péptido. Se clasifican en función de los requerimientos de iones metálicos (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} o Co^{2+}) y la especificidad por determinados dipéptidos (Behal *et al.*, 1965). Entre sus diversas funciones destacan: la maduración del sistema digestivo, degradación terminal de proteínas, regulación hormonal y control del ciclo celular. En el caso concreto de la *leucina aminopeptidasa*, se ha relacionado su nivel de actividad en la membrana de los enterocitos con el estado nutricional de los organismos en estadios iniciales. Las

carboxipeptidasas son enzimas que liberan residuos aminoacídicos del extremo carboxiterminal de los péptidos y proteínas. Se conocen dos familias de carboxipeptidasas: las serina carboxipeptidasas (EC 3.4.16), que contienen un residuo de serina en su centro activo y las metalo carboxipeptidasas (EC 3.4.17), que requieren de iones Zn para ser activas.

Fisiología digestiva en peces

Los peces se pueden dividir en dos grandes grupos según el proceso digestivo por medio del cual adquieren sus nutrientes, en el primer grupo estarían los peces agastros, que no cuenta con un estómago realizando solamente la digestión intestinal, pasando el alimento directamente del esófago al intestino donde se da una alta adsorción pinocítica de macromoléculas proteínicas parcialmente digeridas por las células epiteliales del tubo intestinal. Estos peces por lo general son peces omnívoros con tendencia inclinada hacia herbívoros, compuestos principalmente por los ciprínidos. En el segundo grupo esta compuesto por peces que poseen estómago, el cual le permite al pez mejorar la eficiencia de adsorción de nutrientes debido a una predigestión ácida y a la acción de la pepsina, además del incremento en la superficie de adsorción del canal alimenticio.

En peces que poseen estómago, se sabe que la degradación de la proteína alimenticia pasa por dos fases; la primera de ellas es la fase ácida, la cual se desarrolla en el estómago, donde tiene lugar la acción de las proteasas gástricas tipo pepsinas, siendo la fase alcalina la última de las dos fases, donde las enzimas proteolíticas están conformadas en su mayoría por tripsina, quimotripsina y algunas metaloproteasas. Sin embargo, aunque la mayoría de los peces acuáticos estudiados presentan tipos similares de enzimas, la actividad proteolítica en cada uno de ellos varía, presentando actividades óptimas a diferentes condiciones de pH y temperatura, por lo que se necesita conocer los grupos de enzimas que participan en la degradación proteínica, lo cual se logra con el uso de inhibidores

específicos para cada grupo o enzima en particular, es también importante conocer la actividad enzimática y los rangos físicoquímicos a los cuales las enzimas presentan mayor actividad.

El control de procesos digestivos en vertebrados es complejo e implica una gama de estímulos mecánicos, sensoriales y hormonales (Sunde, 2006). Una vez que el alimento es ingerido por el pez, inicia el proceso de digestión; donde se da la participación de una serie de enzimas y hormonas que ayudan al pez a hidrolizar los nutrientes para que puedan ser asimilados a nivel parietal. El proceso de digestión se inicia con la hidrólisis inespecífica en el estómago del pez al realizarse las secreciones de las glándulas gástricas, que se encuentran en la mucosa de las paredes del estómago, las cuales son activadas por señales visuales y olfativas, distensión de las paredes de estómago causadas por la llegada del alimento (Sunde, 2006), y la presencia de proteínas en él, estimulando a la vez la acción de las enzimas tipo pepsina y la secreción del ácido gástrico hidroc্লórico (HCl) efectuando a una importante desnaturalización y digestión preliminar de grandes cadenas de proteínas (Lauff & Hofer, 1984), lípidos e hidratos de carbono, que son llevados a estructuras mas simples y que pueden ser absorbidos en el estómago o seguir su curso al intestino.

Si se incrementan los niveles de proteína en el alimento del pez, esto induce al incremento de proteasas ácidas (Lundstedt *et al.*, 2002), así como también en el intestino puede modificar su actividad al regular la síntesis, secreción e inactivación de las enzimas digestivas (Haard *et al.*, 1996), presentando entonces el tracto digestivo, una sensibilidad proporcional al tipo y contenido proteico, donde el intestino finaliza la hidrólisis completa de la proteína, por la acción de las enzimas pancreáticas (tripsina y quimotripsina), que producen una hidrólisis selectiva, ejerciendo su acción sobre puntos específicos de las cadenas polipeptídicas que facilitan la degradación a moléculas mas pequeñas que pueden ser absorbidas mas fácilmente al torrente sanguíneo iniciándose el transporte de nutrientes, por mecanismos activos o pasivos en los enterocitos a nivel intestinal (Dimes *et al.*, 1994b).

La determinación de la digestibilidad enzimática de los peces nos permite determinar el valor nutritivo de una fuente proteínica (Köprücü & Ozdemir, 2005), especialmente las que contienen algunos aminoácidos esenciales (Bleir *et al.*, 2002); la calidad de una fuente de proteína por lo tanto dependerá de su composición aminoácidica y de la capacidad del pez para aprovechar los nutrientes presentes en ella, donde los aminoácidos esenciales pueden ser una limitante de la fuente proteínica, si no se encuentran en las cantidades requeridas por el pez (Nankervis & Southgate, 2006). También es así, que un ingrediente alimenticio puede ser desde su composición química una excelente fuente de nutrientes, pero será de poco valor real a no ser que pueda ser digerido y absorbido por la especie en estudio (Köprücü & Ozdemir, 2005).

Se ha utilizado la actividad enzimática, principalmente proteasas, como un indicador del momento en que el individuo esta fisiológicamente apto para digerir alimento exógeno, en peces con estómago se utiliza la pepsina como indicador de un estómago funcional y en peces que carecen de estómago la tripsina y quimotripsina respectivamente (Moyano *et al.*, 1996).

Fisiología digestiva de robalo blanco

En robalo blanco aun no se han realizado estudios de este tipo, existen reportes de algunos estudios que muestran que las larvas de esta especie muestran una boca funcional capaz de adquirir el alimento a los dos días después de la eclosión, lo cual indica que existen enzimas funcionales tipo pepsina al ser un pez que posee estómago. Sin embargo las altas mortalidades obtenidas en esta etapa han nulificado los procesos de producción de juveniles lo cual es probable que se deba a una alimentación inadecuada y no a su capacidad digestiva (Ríos-Durán, 2000). Mientras la aplicación de estimulantes alimenticios en juveniles de robalo, mostró una agresión constante al momento de la alimentación, cuando se utilizaron sustancias que estimulaban porcentajes altos de respuestas de aceptación al

alimento (Bórquez & Cerqueira, 1998), en pellets que contenían L-Leucina, Glicina, L-Prolina, L-Isoleucina, L-Arginina, Uridina e Iosina, el pez se estresaba, tendiendo a presentar ciertas preferencias y mostrando mayor aceptación al alimento a mayor densidad. El robalo es un pez netamente carnívoro lo cual hace difícil su cultivo, debido a los altos costos de producción de alimento vivo, por lo que es fundamental la sustitución de estos por alimentos balanceados. Por ende, se hacen necesarios desarrollar los conocimientos que nos permitan determinar si el pez es capaz de captar los diferentes nutrientes proporcionados en la dieta, lo cual está directamente en función de sus enzimas digestivas (Lundstedt *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2005; Furné *et al.*, 2005), puesto que el uso de nutrientes depende de las actividades de las enzimas digestivas presentes en sus órganos digestivos (Natalia *et al.*, 2004), estas enzimas digestivas ayudan a predecir el grado de degradación de las proteínas otorgadas en el alimento (Dimes *et al.*, 1994b). Todos estos estudios nos ayudan a desarrollar dietas efectivas para el cultivo de especies acuáticas mediante el entendimiento de sus capacidades digestivas (Pedersen *et al.*, 1987; Alarcón *et al.*, 1998).

Estudios de caracterización enzimática

El estudio de las enzimas puede complementarse a través de la caracterización de diversos parámetros operacionales y la acción de sustancias específicas, para comprender su modo de acción. Además estos conocimientos pueden ser muy útiles para la posible utilización de enzimas con características especiales en procesos industriales. Los estudios de actividad enzimática se caracterizan por la estandarización de sus valores, por parte de la Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica, los cuales se expresan en unidades internacionales (U), que representan la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de producto por minuto a 25 °C. La actividad específica se expresa en unidades por miligramo proteína, gramo de tejido fresco o por mililitro de preparado enzimático, que constituye una medida de pureza de la preparación enzimática. Por lo

anterior, la actividad específica se calcula bajo condiciones estándar, a una temperatura determinada (generalmente 25, 30 ó 37 °C) y en condiciones de sustrato saturantes.

Los estudios de caracterización de las distintas enzimas digestivas son esenciales si se quiere entender los tipos y modos de acción, así como el nivel de actividad que representan. Para la caracterización, se pueden realizar diversos ensayos:

Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de la enzima

La mayoría de las enzimas poseen un pH característico en el que su actividad es máxima y a este pH sus centros activos presentan una adecuada conformación iónica para llevar a cabo la catálisis con eficiencia. De este modo, cada enzima presenta un determinado perfil de actividad con respecto al pH. Si las enzimas están por fuera del intervalo de pH fisiológico u óptimo, su estabilidad puede afectar su conformación secundaria, terciaria y/o cuaternaria sufriendo desnaturalizaciones irreversibles en soluciones muy ácidas o alcalinas (Ásgeirsson *et al.*, 1995). Algunos investigadores han estudiado el pH óptimo en el cual las enzimas ácidas y/o alcalinas presentan su máxima actividad.

Las proteasas ácidas en general presentan valores óptimos a pH 2 según valores reportados para las siguientes especies: *Silurus glanis* (Kessler), *Sparus aurata* (Linnaeus), *Dentex dentex* (Linnaeus), *Brycon orbignyanus* (Valenciennes), *Symphysodon aequifasciata* (Pelegrin), *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner), *Scleropages formosus* (Müller & Schlegel), *Solea senegalensis* (Kaup) y *Scophthalmus maximus* (Linnaeus) (Jónás *et al.* 1983; Alarcón *et al.*, 1998; Chong *et al.*, 2002a; García-Carreño *et al.*, 2002; Álvarez-González, 2003; Natalia *et al.*, 2004; Sáenz *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006), aunque se han encontrado valores óptimos de pH de 1 a 1,5 en *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) y *S. aurata* (Hidalgo *et al.*, 1999) y valores de pH 3 en *Clarias gariepinus* (Walbaum), *Carassius auratus* (Linnaeus), *Tinca tinca* (Linnaeus), *Acipenser naccarii* (Bonaparte)

(Uys & Hech, 1987; Hidalgo *et al.*, 1999; Furné *et al.*, 2005), mientras *Diplodus puntazo* (Walbaum) mostró un pH óptimo prolongado de 1 a 3, (Tramati *et al.*, 2005), siendo el valor más alto reportado para *O. mykiss* (Furné *et al.*, 2005), con un óptimo de pH de 4,5. Para estas mismas especies se han reportado valores de pH alcalinos que oscilan entre 8 y 10 normalmente, sin embargo algunas especies se salen de este rango como es el caso de *Diplodus puntazo* que mostró un valor óptimo prolongado de pH 6 a 11 (Tramati *et al.*, 2005).

Algunas especies de peces tienden a presentar dos picos de actividad máxima a diferentes pH's ácidos y/o alcalinos, entre ellas se encuentran *Thunnus thynnus* (Linnaeus) con actividad óptima a pH 2 y 3,5 en proteasas ácidas y pH 10 y 12 en proteasas alcalinas (Essed *et al.*, 2002), mientras *S. aequifasciata* también presentó dos óptimos de pH, de 7,5 a 9 y de 11,5 a 12,5 (Chong *et al.*, 2002a), similar a los datos reportados para *P. maculatofasciatus* con pH óptimos de 6 a 8 y 10 respectivamente (Alvarez-González, 2003).

En los estudios de estabilidad de las proteasas al pH, Essed *et al.* (2002), reportaron que las proteasas alcalinas de *T. thynnus* son más estables a los cambios de pH, en comparación a las proteasas gástricas.

Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la enzima

El punto óptimo aparente de temperatura es un parámetro operacional más que una característica fisiológica de la enzima, dado por el aumento de actividad con la temperatura ($Q_{10} \approx 2$), y por la posterior pérdida de la actividad de la enzima por desnaturalización térmica fuera de su intervalo de operación, ya que al absorber demasiada energía, los enlaces no covalentes que mantienen su estructura terciaria se rompen y la enzima se desnaturaliza. El verdadero óptimo, es aquel valor de temperatura en el cual la enzima no solamente muestra una alta actividad, sino también una estabilidad alta.

Existen varios estudios enfocados sobre la temperatura óptima en que las proteasas digestivas ácidas y/o alcalinas presentan su máxima actividad. En el caso de las proteasas ácidas algunas especies como *C. gariiepinus*, *D. dentex* y *S. senegalensis*, presentan actividades proteolíticas máximas a temperaturas de 40°C (Uys & Hech, 1987; Alarcón *et al.*, 1998; Sáenz *et al.*, 2005), mientras *S. aurata* y *P. maculatofasciatus* mostraron mayor actividad a 45°C (Alarcón *et al.*, 1998; Alvarez-González, 2003), donde *Silurus glanis*, *T. thynnus* y *B. orbignyanus* presentaron los valores más altos a temperaturas de 50°C (Jónás *et al.*, 1983; Essed *et al.*, 2002; García-Carreño *et al.*, 2002).

Para proteasas alcalinas, *C. gariiepinus* y *S. senegalensis* reportaron máximas actividades a rangos de temperaturas de 35 a 40°C (Uys & Hech, 1987; Sáenz *et al.*, 2005), mientras *S. glanis*, *S. aurata*, *D. dentex* y *P. maculatofasciatus*, presentaron máxima actividad a 55°C (Jónás *et al.*, 1983; Alarcón *et al.*, 1998; Alvarez-González, 2003). En cuanto a la estabilidad a la temperatura García-Carreño *et al.* (2002), indica que las proteasas alcalinas son más estables que las proteasas ácidas en *B. orbignyanus*.

Afinidad por sustratos específicos

Se han obtenido un gran número de sustratos específicos, tanto naturales como sintéticos, que permiten establecer el tipo de catálisis que se produce en un extracto multienzimático. Las proteasas, tienen la capacidad de hidrolizar pequeñas moléculas sintéticas, de manera que se puede determinar la especificidad por sustrato y las propiedades cinéticas (Lehninger, 1984). Estos sustratos sintéticos están formados por un aminoácido, que varía según la enzima, unido a un grupo cromogénico simulando un enlace peptídico. Cuando la enzima hidroliza esta unión, aparece un compuesto que puede cuantificarse mediante métodos espectrofotométricos ó fluorométricos.

Caracterización mediante inhibidores específicos

Los inhibidores son compuestos que disminuyen la tasa de hidrólisis de un sustrato dado. El uso de inhibidores específicos es una herramienta importante para la caracterización enzimática ya que éstos se unen a la enzima inactivándola, y disminuyendo la tasa de hidrólisis sobre un sustrato (Salvensen & Nagase, 1989). En el caso específico de las proteasas, existen al menos dos grupos de inhibidores que varían en función de su mecanismo químico de catálisis: los que forman complejos covalentes entre el sitio activo de la enzima y el lugar de enlace con el sustrato (grupo serina y cisteína); y los que no lo hacen (ácidas y metal proteasas).

Esta diferencia permite que las enzimas del primer grupo posean aminoácidos fuertemente nucleofílicos en su centro activo, por lo que, sus inhibidores deberán poseer también esta misma propiedad que incluyan dobles enlaces. Las otras proteasas realizan una catálisis más del tipo ácido / base sobre una molécula de agua, de forma que la catálisis carece del carácter nucleofílico.

Los quelantes (EDTA y 1-10 fenantrolina) no se consideran en esta clasificación como inhibidores, sino más bien inactivadores ya que solo eliminan ciertos iones (Ca, Zn y Mg) que son esenciales para la activación de metal proteasas. Sin embargo, se utilizan con propósitos prácticos en la determinación del mecanismo de acción de las proteasas. En la Tabla 2 se resumen los distintos tipos de inhibidores, así como especificidad y mecanismo de acción.

Tabla 2. Clasificación de inhibidores empleados en la caracterización de proteasas en función de su mecanismo de acción y peso molecular. Modificado por García-Carreño (1992).

Nombre	Especificidad	Modo de acción*	Masa molecular (Dalton)
Bajo peso molecular			
PMSF	serina proteasas	1	174,2
TLCK	tripsina	1	332,5
TPCK	quimotripsina	1	351,5
Pepstatina A	proteasas ácidas	2	685,9
EDTA	metal proteasas	2	372,2
1,10 fenantrolina	metal proteasas	2	198,2
Alto peso molecular			
SBTI	serina proteasa	2	20100

PMSF = fenil-metil-sulfonil fluoruro; TLCK = tosyl-lisin-clorometil cetona; TPCK = tosil-fenilalaninclorometil cetona; EDTA = ácido etilendiamintetraacético; SBTI = inhibidor trípico de la soya. * 1 indica inhibición irreversible; 2 inhibición reversible.

Utilización de técnicas electroforéticas

Además de los estudios previamente explicados, la caracterización enzimática se puede complementar con técnicas electroforéticas específicas que se fundamenta en la aplicación de campos eléctricos a un gel, lo cual permite el movimiento de moléculas cargadas en solución. Las moléculas en el campo eléctrico se mueven a una velocidad determinada por

Alvarez, A. et al. 2010. Avances en la fisiología digestiva del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) en Tabasco, México. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 98-231.

su carga, forma y tamaño. La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida, incluida SDS-PAGE (electroforesis en presencia de duodecil sulfato sódico), es una herramienta bioquímica empleada en estudios de caracterización de proteínas (Laemmli, 1970) y detección de actividades enzimáticas (García-Carreño *et al.*, 1993), entre muchas otras funciones. La electroforesis de macromoléculas, se realiza normalmente usando pequeñas cantidades de muestra en una solución estabilizada en una matriz porosa bajo la influencia de un voltaje determinado. Al final del corrimiento, las diferentes especies moleculares se observan como bandas en diferentes posiciones de la matriz (Andrews, 1995).

En el caso específico de la actividad proteolítica de un extracto se puede: 1) copolimerizar el sustrato (gelatina, caseína o fibrinógeno) en el gel antes de la electroforesis (Heussen & Dowdle, 1980), 2) incubar el gel de electroforesis con una película de rayos X, así la gelatina se digiere en aquellas zonas donde existen enzimas con actividad proteasa (Cheung *et al.*, 1991; Paech *et al.*, 1993), y 3) incubar el gel en una solución de sustrato (Peyronel & Cantera, 1995). Adicionalmente, se puede determinar mediante electroforesis el mecanismo de acción de las enzimas utilizando inhibidores específicos (García-Carreño *et al.*, 1993).

Las técnicas electroforéticas han sido utilizadas en conjunto con el uso de inhibidores específicos para proteasas digestivas, logrando identificar la presencia de pepsina en *S. aurata*, *D. dentex*, *B. orbignyana*, *S. aequifasciata*, *P. maculatofasciatus* y *S. maximus* mediante la utilización de Pepstatin A (Alarcón *et al.*, 1998; Chong *et al.*, 2002a; García-Carreño *et al.*, 2002; Alvarez-González, 2003; Wang *et al.*, 2006). Usando algunos quelantes y/o inhibidores específicos como PMSF, Ovoalbúmina, 1-10 fenantrolina, SBTI, TLCK, TPCK y EDTA se ha identificado la presencia de tripsina y quimotripsina en especies como *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), *S. aurata*, *D. dentex*, *B. orbignyana*, *S. aequifasciata*, *T. thynnus*, *P. maculatofasciatus*, *Caranx hippos* (Linnaeus), *Pseudupeneus maculatus* (Bloch), *Sparisoma sp* (Poey), *Hoplias malabaricus* (Bloch) y *Labeo rohita* (Hamilton) (Dimes *et*

al., 1994a; Alarcon *et al.*, 1998; Chong *et al.*, 2002a; Essed *et al.*, 2002; García-Carreño *et al.*, 2002; Alencar *et al.*, 2003; Alvarez-Gonzalez, 2003; Chakrabarti *et al.*, 2006a).

Estudios de digestibilidad *in vitro*

Cuando se logra comprender la capacidad digestiva de los organismos, es posible aplicar estos conocimientos en aspectos relacionados a la nutrición animal. Estos estudios ayudan a determinar la cantidad de proteína que debe contener la dieta, siendo una herramienta muy útil durante el cultivo de organismos, donde a través de estos estudios de digestibilidad se seleccionan los ingredientes y se mejoran las fórmulas para su alimentación. El principal objetivo de la acuicultura comercial es maximizar la tasa de crecimiento y supervivencia de los organismos, al mínimo costo y en el menor tiempo posible (Knights, 1985). Para ello es necesario satisfacer las necesidades fisiológicas y metabólicas mediante la optimización de dietas nutricionalmente adecuadas (Steffens, 1989). La alimentación suele representar hasta el 60% del costo total de producción (Tacon, 1993), aun cuando esto represente sólo el 1,6 % del peso total seco de alimento requerido (Kolkovski, 2001). En este sentido, el desarrollo de dietas comerciales capaces de satisfacer los requerimientos de una especie cultivada es considerado como uno de los principales objetivos de las investigaciones actuales (Hardy, 1989).

Ante la gran cantidad de fuentes proteínicas disponibles en la elaboración de dietas para peces, se ha descubierto que las harinas vegetales contienen factores antinutritivos, por lo que se han desarrollado métodos para medir la digestibilidad de la proteína contenida en el alimento. Los métodos “*in vivo*”, determinan estos valores, sin embargo el uso de un gran número de individuos, los costos de los ensayos, el trabajo laborioso y de tiempos prolongados, presenta serias dificultades en la realización de estos estudios.

Debido a lo anterior, se han desarrollado métodos “*in Vitro*” que simulan la digestión de los organismos, permiten realizar un estudio detallado de la evolución de la proteína durante el proceso de digestión por cuantificación de los aminoácidos y péptidos liberados (Oña *et al.*, 2003) y predicen la digestibilidad de los diferentes ingredientes que son susceptibles de utilizarse en la formulación de dietas. De esta manera, algunos investigadores recomiendan que los estudios se encaminen hacia el desarrollo de este tipo de técnicas (Tacon, 1995). Los primeros estudios datan de más de 100 años estudiando la digestión con pepsina para predecir el valor nutritivo de los diferentes componentes alimentarios, incluidos las proteínas (Wedermeyer, 1989). En los años 50 y 60’s, se realizaban las digestiones con enzimas gástricas, proteasas microbianas o de mamíferos (Sheffner *et al.*, 1956; Ford & Salter, 1966).

A partir de ese momento, las técnicas se fueron sofisticando, hasta que se desarrollaron ensayos más rápidos y eficientes. Se elaboraron métodos solamente que investigaban la fase de digestión alcalina con preparados sintéticos de tres y cuatro enzimas (Hsu *et al.*, 1977; Satterlee *et al.*, 1979), donde se valoraba la digestibilidad por medio de la caída de pH en la solución proteica. A partir de los resultados obtenidos, se ha tratado de simular, en la medida de lo posible, el proceso de digestión completa, mediante sistemas con membranas permeables a modo de diálisis, que permiten separar y cuantificar en continuo los productos de hidrólisis (Savoie & Gauthier, 1986).

Los métodos “*in vivo*”, utilizados para determinar las formulaciones de dietas con los nutrientes necesarios para los peces con la utilización del óxido crómico como marcador molecular, se mejoraron con el desarrollo del sistema pH-STAT que permite una determinación rápida de la digestibilidad de la proteína de las diferentes materias primas, las cuales varían en función de la cantidad y tipo de enzimas utilizadas, condiciones de hidrólisis, métodos de fraccionamiento digestivo y estudio de los productos resultantes. Este sistema fue desarrollado por Pedersen & Eggum (1983), el cual se basa en la

medición del consumo de álcali necesario para mantener constante el pH que tiende a descender al romperse los enlaces peptídicos durante la hidrólisis o digestión.

La hidrólisis enzimática de proteínas es un proceso que transcurre a través de un conjunto de etapas en serie, donde pasan de estructuras complejas a estructuras más simples conforme se lleva a cabo la actividad proteolítica, ya que al aumentar el grado de hidrólisis (GH), disminuye el tamaño molecular de los péptidos originados en la reacción (Camacho *et al.*, 2007). Cada una de estas especies intermedias, se diferencia básicamente de las otras en su solubilidad y se corresponde aproximadamente con los tamaños moleculares medios (MW) y con la relación nitrógeno amino/nitrógeno total (AN/TN) que se recogen en la Tabla 3 (Knights, 1985).

Tabla 3. Características de las especies producidas en la hidrólisis de proteínas (Gaudix *et al.*, 2000).

Molécula	MW	AN/TN
Proteínas	> 20000	<0,01
Proteosomas	5000-10000	<0,01
Peptonas	1000-6000	0,1-0,5
Péptidos	200-500	0,5-0,8
Aminoácidos	75-200	0,8-0,9

El parámetro determinado es el grado de hidrólisis (GH en %) que relaciona los enlaces peptídicos hidrolizados por las proteasas digestivas, con el número total de enlaces peptídicos presentes en una proteína (Adler-Nissen, 1976). Al número de estos enlaces hidrolizados en un proceso de hidrólisis se le denomina equivalentes de hidrólisis (h) y se expresa como mequv/g proteína. El valor de enlaces totales en una proteína se determina a través de su composición aminoácídica, como la suma de mmoles de aminoácidos por gramo de proteína.

La mayoría de los estudios sobre digestibilidad *in Vitro* utilizando el pH STAT, se han aplicado a organismos terrestres por lo que la información en el ámbito de los organismos marinos es muy escasa como los estudios realizados en algunas especies de ciprínidos (Eid & Matty, 1989) y salmónidos (Grabner, 1985; Grabner & Hofer, 1985; Dimes & Haard, 1994). En los últimos años la necesidad de economizar los gastos en dietas alimenticias para peces, ha hecho que algunos investigadores se interesen por estos estudios, entre los que se encuentran los reportados por Rungruangsak-Torrissen *et al.* (2002), quienes estudiaron el efecto de la calidad de la dieta mediante digestibilidad *in Vitro*, utilizando diferentes dietas experimentales en *O. mykiss* y *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus), indicando que los peces son capaces de detectar diferentes calidades de alimentos, mientras Barros *et al.* (2002), indicaron que la hidrólisis enzimática se ve incrementada con la adición de la enzima comercial fítasa en la dieta de *O. mykiss*, y que el ácido fítico a niveles de 0,5% afecta la activación de tripsinógenos y la estabilidad de la tripsina.

Chong *et al.* (2002b), reporta que la harina de soya presentó baja digestibilidad a pesar de su alto contenido proteínico en estudio realizados en *S. aequifasciata*, así como también la harina de frijol presenta mayor inhibición de tripsina y quimotripsina en *Symphysodon spp*, seguida de la harina de trigo y soja (Chong *et al.*, 2002b), asimismo Alarcón *et al.* (2002), trabajaron con *S. aurata L.*, evaluando diferentes fuentes proteínicas utilizadas en acuicultura, donde los GH más altos los presentaron las harinas de hidrolizado de pescado, la harina de sangre y la caseína.

Oña *et al.* (2003), reportaron para *D. dentex*, y su híbrido mayores GH para *P. pagrus* seguidos de *Dentex X Pagrus*. La harina de pescado tuvo mayor GH que las harinas de soya la cual tuvo GH similares a la harina de guisante, y el gluten de trigo tuvo valores ligeramente menores a las dos harinas antes citadas, Sin embargo en la fase alcalina *Dentex X Pagrus* presentó los mayores GH que sus parentales y estos GH en harina de soja y guisante fueron similares a los de la harina de pescado (Oña *et al.*, 2005a), reportando también que el efecto

de los inhibidores presentes en las harinas vegetales, sobre las proteasas digestivas fue mayor para dentón y pargo que para el híbrido (Oña *et al.*, 2005b), donde el gluten de trigo efecto por igual a los tres espáridos y la harina de soya afecto principalmente a las enzimas alcalinas.

Pérez *et al.* (2003), reporta que el gluten de trigo presenta una inhibición gradual a las proteasas digestivas de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg) y *Odontesthes bonaerensis* (Valenciennes) afectando principalmente al primero sin alcanzar el 100% de inhibición, la soya puede inhibir hasta el 100% según la cantidad otorgada en la dieta. Álvarez-González (2003), reporta para *P. maculatofasciatus*, 78 % de GH y digestibilidad en harina de sangre de res y harina de langostilla, seguidos de la harina de calamar y el hidrolizado comercial de pescado con 60 y 54 % de GH y digestibilidad respectivamente. La harina de sardina presentó el nivel más bajo de GH y digestibilidad. Fenerci & Sener (2005), reportan que el alimento extruido presenta mejor digestibilidad que el alimento granulado para *O. mykiss*. Ávalos-Sánchez (2006), reporta que las dietas con ligantes modifican su digestibilidad y que los alimentos elaborados con alginato de sodio y carragenina de manera individual ayudan a la digestibilidad del pescado blanco del lago de Patzcuaro *Chirostoma estor estor* (Jordan). Y más recientemente, el estudio de caracterización enzimática realizada a la mojarra tenguayca (*Petenia splendida*, Günther) donde se demuestra altos valores de GH para ingredientes como la harina de pescado, e ingredientes de origen terrestre (harina de res y de pollo), por lo que esta especie es catalogada como un pez carnívoro estricto (Perales-García, 2010).

Cuantificación de los aminoácidos totales liberados durante la hidrólisis enzimática

La cantidad de aminoácidos totales presentes en el vaso de reacción de una hidrólisis realizada en un pH STAT, se determina mediante el procedimiento descrito por Church *et al.* (1983), usando 0-ftalaldialdehído (OPA). Este método se basa en la reacción entre dicho compuesto y el β -mercaptoetanol con las aminas primarias (grupos α -amino), dando lugar a un complejo que absorbe fuertemente a 340 nm. La absorbancia es similar para todos los grupos α -amino y no se ve afectada por el ambiente local cuando las proteínas son desnaturalizadas con SDS, de modo que la línea base es constante para una muestra particular, y los grupos α -amino liberados en la proteólisis pueden ser cuantificados con bastante exactitud. Aquí se ensayan todos los productos de la hidrólisis siendo este método más exacto que otros procedimientos en los cuales se depende de las propiedades de los residuos aromáticos, por otra parte este método es más rápido y adecuado que los métodos donde se utiliza ninhidrina, ácido 2,4,6- trinitrobencenosulfónico o fluoresceína. Apsmo *et al.* (2005) evaluaron la degradación proteínica de hidrolizados a partir de vísceras de *Gadus morhua* (Linnaeus), indicando que la concentración de los grupos α -aminos en los hidrolizados muestran la cantidad de bandas peptídicas rotas en la reacción.

Uso de dietas balanceadas en acuicultura

Los peces juveniles en cultivo, tienen tasas de supervivencia y crecimiento relativamente aceptable, sin embargo cuando se comienza con el cultivo de una especie determinada, se tiende a cometer errores en la entrega de alimentos elaborados para otras especies similares, pero de requerimientos nutricionales diferentes, lo cual muchas veces nos lleva a entregarle al organismo, un alimento que no satisface los requerimientos nutricionales, provocando una reducción en la tasa de crecimiento.

Para comprender y resolver esta problemática se deben realizar estudios sobre los requerimientos nutricionales, para cada una de las etapas de vida del pez en cultivo. La producción del alimento vivo puede enfrentar dificultades como una provisión y calidad nutricional variables (Sorgeloos, 1980; Watanabe *et al.*, 1983). Consecuentemente, existe gran interés por desarrollar alimentos balanceados como una alternativa económica a la par de la producción de alimentos vivos. De esta forma, los alimentos balanceados ofrecen la oportunidad de introducir nutrientes que no están disponibles en el alimento vivo (Rosenlund *et al.*, 1997). Las dietas inertes brindan una fácil disponibilidad, más bajos costos de producción y una mayor flexibilidad en las fórmulas. (Alarcón, 1997; Tucker, 1998).

La digestión de alimentos en subunidades apropiadas para la absorción en el tracto digestivo del animal depende en gran medida de las enzimas disponibles (Furné *et al.*, 2005), necesarias para el rompimiento extracelular del alimento, lo cual determina la capacidad digestiva de un organismo (Pedersen *et al.*, 1987). De este modo la actividad enzimática digestiva se considera entonces el mejor indicador para el reemplazo de alimento vivo por dietas artificiales (Lauff & Hauffer, 1984), por ello se ha dado mayor énfasis a la realización de estudios de la actividad enzimática, que nos permite determinar los requerimientos nutritivos para maximizar la supervivencia y crecimiento de las especies, así como prevenir ciertas patologías que podrían estar involucradas en el suministro del alimento vivo.

Kolkovski (2001), hace un análisis detallado de la aplicación de los resultados de estos estudios en la formulación de piensos para el cultivo de *Sparus aurata* y Bleir *et al.* (2002), relacionan la tasa de crecimiento del híbrido del *O. kisutch* con las actividades de las enzimas digestivas. Estas actividades han servido de base para desarrollar micrométodos en la detección, caracterización y purificación de enzimas digestivas de los peces. En este último aspecto, se ha comenzado con los estudios básicos relacionados con la fisiología

digestiva del robalo blanco con fines de producción intensiva, posibilidad que se ve cada vez más real en años venideros.

El presente estudio ha sido dividido en tres secciones: 1) Caracterización enzimática digestiva y digestibilidad *in vitro* de ingredientes y dietas diseñadas en juveniles del robalo blanco, 2) Estudio de los cambios en la actividad enzimática digestiva durante la ontogenia inicial del robalo blanco y 3) Estudio de la expresión de enzimas digestivas durante la ontogenia inicial del robalo blanco.

ETAPA 1) Caracterización enzimática digestiva y digestibilidad *in vitro* de ingredientes y dietas diseñadas en juveniles del robalo blanco

Materiales y métodos

Esta etapa ha sido dividida en dos partes: a) La caracterización del complejo enzimático presentes en el tracto digestivo del pez y b) La evaluación *in Vitro* de los ingredientes proteínicos y los alimentos balanceados diseñados.

a) Caracterización del complejo enzimático digestivo en juveniles del robalo blanco.

Obtención de juveniles

Para los ensayos de caracterización enzimática y digestibilidad *in Vitro*, los juveniles de robalo blanco fueron obtenidos del medio natural en la localidad de Arroyo Verde, ubicado en los límites de los Municipios de Paraíso y Comalcalco, Tabasco México. Los peces fueron capturados con mallas mosquiteras cónicas de 15 metros de longitud x 3 metros de altura y trasladados en contenedores con aireación constante, al Laboratorio de Acuicultura en la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de

Tabasco, México; los juveniles se alimentaron con crías de tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus), en estanques circulares de plástico, durante 20 días.

Preparación de las muestras

Para los ensayos de caracterización enzimática fueron utilizados un total de 85 juveniles con una longitud promedio de 11 cm, fueron dejados sin alimentación por un periodo de 48 horas antes de ser sacrificados. Fueron pesados antes y después de la evisceración, se le extrajo el estómago y el intestino por separado, los cuales fueron triturados con un homogenizador de tejidos (ULTRA TURRAX® IKA T18 Basic). Los extractos se prepararon en agua destilada ajustando el pH a 3 para los extractos del estómago con ácido clorhídrico (0,1 M) y pH de 8 para los extractos del intestino con hidróxido de sodio (0,1 M) en una relación 5:1 (5 mL de agua destilada por g de tejido) a 4 °C. La mezcla obtenida fue colocada en tubos Eppendorf (2 mL por cada tubo) y centrifugada a 14,000 rpm a 4 °C. El sobrenadante fue extraído y se les ajustó el pH requerido para cada extracto, luego fueron almacenados en tubos Eppendorf a -20 °C hasta su posterior análisis enzimático y de digestibilidad *in vitro*.

Actividad de proteasas.

Las actividades enzimáticas se determinaron por medio de las siguientes técnicas:

1) Proteasa ácida. Se utilizó la técnica de Anson (1938), con las siguientes modificaciones: a 1 mL de hemoglobina (1 %) en tampón 0,1 M glicina - HCl a pH 2 y se le añadieron 5 µL de extracto enzimático. El extracto se incubó durante 5 minutos a 37 °C y la reacción se detuvo por adición de 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA al 20%). Después se dejó reposar la mezcla de reacción (15 a 30 minutos) a 4 °C, se centrifugo a 12000 rpm durante 5 minutos. En el sobrenadante, se midió la cantidad de tirosina liberada (ABS_{280nm}) mediante un espectrofotómetro uv/visible. Una unidad de actividad se definió

como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µg de tirosina por minuto. Para determinar el coeficiente de extinción molar de la tirosina, se realizó un recta patrón con diferentes concentraciones de tirosina (0 a 300 µg/mL). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2) **Proteasa alcalina.** Se realizó por el método de Kunitz (1947), modificado por Walter (1984), usando como sustrato caseína al 1 % en tampón 100 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂ a pH 9. Se agregó 0,5 mL de caseína, mas 0,5 mL de tampón Tris-HCl 100 mM + CaCl₂ 10 mM, pH 9 y 10 µL de extracto enzimático, Se incubó por 10 minutos y la reacción se detuvo con 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos y se determinó la cantidad de tirosina liberada según el protocolo descrito en el apartado anterior.

Cálculo de las actividades específicas

Para determinar las actividades enzimáticas de cada extracto se utilizaron las siguientes ecuaciones.

El cálculo de la actividad en unidades por mL de muestra, se realizaron mediante la ecuación 1.

$$\text{Unidades / mL} = \frac{\Delta \text{ABS}_{280\text{nm}} \times \text{Volumen final}_{\text{reacción}} (\text{mL})}{\text{CEM}_{\text{tirosina}} \times \text{tiempo} (\text{min.}) \times \text{volumen extracto} (\text{mL})}$$

Las actividad en unidades por gramo de tejido fresco se calcularon utilizando la ecuación 2.

$$\text{Unidades / g de tejido fresco} = \frac{\text{Unidades / mL}}{\text{g de tejido fresco / mL}}$$

El cálculo de la actividad enzimática en unidades por juveniles de robalo blanco se realizó, utilizando la ecuación 3

$$\text{Unidades/ juveniles} = \frac{\text{Unidades/mL}}{\text{No. de juveniles/mL}}$$

Donde; Δ_{abs} es el incremento de absorbancia a una determinada longitud de onda; Volumen final, es el volumen final de la reacción; CEM, el coeficiente de extinción molar del producto obtenido calculado de la recta de regresión ($\text{mL} \times \text{mg}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

Caracterización de proteasas digestivas

La caracterización de las proteasas digestivas se analizó por medio de técnicas espectrofotométricas y electroforéticas que a continuación se describen.

Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de las proteasas

Se determinó el efecto del pH sobre la actividad de proteasas ácidas y alcalinas en los extractos enzimáticos de juveniles de *C. undecimalis*. Para la determinación de la actividad de las proteasas ácidas, los extractos, se incubaron con hemoglobina (1 %) diluida con el Tampón Universal Stauffer (1989), con un rango de pH desde 2 hasta 12, siguiendo el procedimiento de la determinación de la actividad enzimática descrito anteriormente para este tipo de proteasas. En el caso de las proteasas alcalinas, se utilizó como sustrato caseína (1 %) tamponada con el mismo tampón y usando los mismos valores de pH. Todos estos ensayos se realizaron por triplicado.

El efecto del pH sobre la estabilidad de la actividad proteasa ácida y alcalina se determinó preincubando los extractos a diferentes pH (desde 2 hasta 12) con tiempos de 0, 30, 60 y 90 minutos para las proteasas ácidas y de 0, 60, 120 y 180 minutos para las proteasas alcalinas,

después se midió su actividad a pH normal (2 para las proteasas ácidas y 9 para proteasas alcalinas) siguiendo las técnicas anteriormente descritas. Los resultados se mostraron en relación a la actividad residual a intervalos regulares con respecto a un control sin preincubar.

Para todos los ensayos de estabilidad se tomaron los valores de los tiempos cero de reacción, como el 100% de la actividad residual con la finalidad de observar el comportamiento de la enzima a partir ese momento.

Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de las proteasas

Para determinar la temperatura óptima de las proteasas digestivas, se incubaron los extractos de los juveniles en los sustratos de hemoglobina (1 %) y caseína (1 %), con las técnicas antes descritas para actividades de proteasas acidas (técnica de Anson, 1938), y alcalinas (método de Kunitz, 1947 modificado por Walter, 1984), respectivamente a un rango de temperatura desde 25 hasta 85 °C.

Para determinar la influencia de la temperatura sobre la estabilidad de las proteasas ácidas y alcalinas se incubaron los extractos de los juveniles en los sustratos hemoglobina (1 %) para las proteasas ácidas y caseína (1 %) para proteasas alcalinas respectivamente, utilizando las técnicas antes descritas para este tipo de proteasas a temperaturas desde 25 hasta 65 °C con tiempos de preincubación de 0, 30, 60 y 90 minutos para cada temperatura. Todos estos ensayos se realizaron por triplicado.

Caracterización de proteasas alcalinas usando SDS-PAGE

Para el estudio de las proteasas alcalinas, se realizó electroforesis en presencia de lauril duodecil sulfato sódico (SDS), en condiciones desnaturizantes, empleando un sistema discontinuo (gel almacenador preparativo y gel separador resolutivo), de acuerdo con la

metodología descrita por Laemmli (1970), y adaptada por García-Carreño *et al.* (1993), para visualizar actividad proteasa alcalina. Las electroforesis se realizaron en la cubeta Mini PROTEAN® III (Bio- Rad) con 2 placas de geles verticales de 8 x 10 x 0,075 cm. con capacidad para 20 muestras por electroforesis. Cada placa estuvo compuesta por dos tipos de gel; un gel almacenador con un 4 % de poliacrilamida (PAA) y un gel separador con un porcentaje de poliacrilamida del 12 %. En la Tabla 4 se detalla el procedimiento empleado para la elaboración de los geles de poliacrilamida. Una vez montados los cristales, se llenó primero el gel separador, dejando una hora para que polimerizara. A continuación, se preparó el gel almacenador y se colocó un peine con diez dientes para fabricar los pocillos.

Tabla 4. Protocolo de preparación de los geles de electroforesis

Reactivo	Gel almacenador	Gel separador (12%)
Sol. madre de poliacrilamida ¹	1,3 mL	4,0 mL
Tampón del gel almacenador ²	2,5 mL	-
Tampón del gel separador ³	-	2,5 mL
Agua destilada	6,1 mL	3,4 mL
SDS 10 %	100 µL	100 µL
TEMED ⁴	10 µL	5 µL
Persulfato amónico (10%) ⁵	50 µL	50 µL
Volumen final	10 mL	10 mL

¹Solución Buffer 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 para el gel de 12 %

²Solución Buffer 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 para el gel de 4 %

³Solución Buffer de Corrimiento pH 8,3

⁴TEMED (N, N, N', N' - tetrametiletilendiamina)

⁵Solución extemporánea. Preparar en fresco y utilizar rápidamente

*Para conseguir que el frente de polimerización del gel separador sea recto se utiliza isopropanol

Una vez preparados los geles y colocados en la cámara electroforética, se vertió la solución tampón de electroforesis 0,025 M Tris, 0,192 M glicina, pH 8,3; 0,1% SDS (p/v) y se procedió a tomar 20 µL de extracto a los cuales les fueron agregados 20 µL de tampón de muestra (0,5 Tris- HCl, pH 6,8, SDS 10 % (p/v), glicerol (v/v), (p/v) azul de bromofenol

(0,5 %), inyectando 30 μ L de la mezcla en cada pocillo. Una vez dispensadas las muestras en los pocillos, se colocó la cubeta en una cámara a 4°C y se conectó a una fuente de alimentación desarrollándose la electroforesis a voltaje constante de 100 volts e intensidad de 120 mA (60 mA por gel) durante unos 90 minutos. Para detectar actividad proteasa alcalina, seguido a la electroforesis, se sumergieron los geles en una solución de caseína Hammerstein al 2% tamponada en 100 mM TRIS-HCl + CaCl₂ 10 mM, pH 9, durante 60 minutos a 5°C. A continuación se pasaron a otra solución similar a 37 °C durante 48 horas, en ambos casos se agitaron. Seguidamente, se lavaron con agua destilada y se fijaron en una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 12%. Para la tinción se utilizó la metodología de Weber & Osborn (1969), con algunas modificaciones. Los geles permanecieron durante toda la noche y a temperatura ambiente en la solución de tinción compuesta de 0,1% azul brillante de Coomassie (BBC R- 250) en metanol: ácido acético y agua destilada (50:40:10). Para revelar los geles se utilizó una solución de metanol: ácido acético: agua (50:40:10). Durante este proceso se pudieron ver las bandas claras sobre un fondo azul intenso (caseína embebida en el gel) que corresponde a proteínas con actividad proteolítica. Para el fotografiado se colocaron los geles sobre dos hojas de acetatos y posteriormente fueron digitalizados con la ayuda de un escáner HP 3400 C.

Caracterización de proteasas ácidas usando PAGE

Las electroforesis para proteasas ácidas se prepararon bajo condiciones nativas de acuerdo a lo propuesto por Davis (1964), en geles de poliacrilamida al 11 %. El protocolo de preparación fue el siguiente: se mezclaron 3,7 mL de agua destilada, 2,6 mL de buffer Tris-HCl 0.07 M, pH 7,5, 3,7 mL de Acrilamida/bis (30 % stock), 8 μ L de TEMED (N, N, N', N'- tetrametiletilendiamina), con agitación constante, después se agregaron 75 μ L de persulfato de amonio (10 %) para lograr la polimerización, alineando con alcohol isopropílico. El gel almacenador será del 4 %, por lo que se le agregó 6,1 mL de agua destilada, 1,3 mL Acrilamida/bis (30 % stock), 2,6 mL Tris - HCl 0,125 M, pH 6,8, 6 μ L

de TEMED y 30 μ L de persulfato de amonio (10 %). El corrimiento se realizará por medio de una preestabilización de los geles a 100 V por 90 minutos.

Para la detección de actividad proteolítica ácida en los geles se sumergieron en una solución de HCl 0,1 M hasta reducir su pH a 2 (el marcador del tampón de muestra se puso amarillo). A continuación se colocaron a 4°C, en una solución de hemoglobina al 0,25 % en tampón 0,1 M glicina-HCl, pH 2, transcurridos 30 minutos se pasaron a otra solución similar a 37 °C por un tiempo de 90 minutos. Finalmente se lavaron con agua destilada y se fijaron en una solución de ácido tricloro acético (TCA 12 %). Para la tinción se utilizó la metodología de Weber & Osborn (1969), con algunas modificaciones. Los geles se tiñeron durante 6 horas a temperatura ambiente en la solución de tinción compuesta de 0,1% azul brillante de Coomassie (BBC R- 250) en metanol: ácido acético y agua destilada (60:30:10). Para revelar los geles se utilizó una solución de metanol: ácido acético: agua (60:30:10). Para el fotografiado se colocaron los geles sobre dos hojas de acetatos y posteriormente fueron digitalizados con la ayuda de un escáner HP 3400 C.

Caracterización con inhibidores

La caracterización del mecanismo de acción enzimática de las distintas enzimas que componen los extractos de juveniles, se realizaron de acuerdo con el método descrito por Dunn (1989). Para la caracterización de la actividad proteasa alcalina, se incubaron los extractos con los inhibidores (PMSF, TLCK, TPCK, Fenantrolina, SBTI y ovoalbúmina) y el inactivador quelante (EDTA), se mezcló el extracto enzimático (20 μ L) con 20 μ L de inhibidor (concentración stock) al control se le agregó agua destilada a cambio del inhibidor. La mezcla fue incubada durante 60 min a 37 °C. A continuación se midió la actividad proteasa usando 0,5 mL de sustrato caseína (1 %, pH 9) a 37 °C. La actividad se expresó como el porcentaje de inhibición respecto a un control de actividad sin inhibidores (100 % de actividad). En todos los casos cada ensayo se realizó por triplicado.

Para la caracterización de la actividad proteasa ácida se incubaron los extractos con pepstatin A (1mM, SIGMA). En este caso, 5 µL de la solución concentrada de inhibidor se preincubaron con 20 ml del extracto enzimático durante 60 minutos a 37 °C. A continuación, se le añadió 1 mL de sustrato (hemoglobina al 0,5% en 0,1 M Glicina/HCl, pH 2) y leyó en el espectro a 280 nm.

Estudios de Inhibición por técnicas electroforéticas para proteasas alcalinas

El estudio de proteasas se complementó mediante electroforesis SDS-PAGE y el uso de inhibidores. Para realizar este estudio se incubaron los extractos de los juveniles en los siguientes inhibidores: PMSF, SBT1, TPCK, TLCK, Fenantrolina, Ovoalbúmina y EDTA. Se tomaron 20 µL de extracto y se le agregaron 5 µL de inhibidor (al control no se le agrego inhibidor), para luego incubar por 1 h, después se le adicono a cada mezcla 20 µL de tampón de muestra (0,5 Tris- HCl, pH 6,8, SDS 10 % (p/v), glicerol (v/v), (p/v) azul de bromofenol 0,5 %), se inyectaron en los geles 30 µL de la mezcla en cada pocillo y se realizó la electroforesis bajo las mismas condiciones (SDS-PAGE) descritas anteriormente. Una vez realizada la electroforesis, se incubaron los geles en una solución de caseína Hammerstein al 2% tamponada en 100 mM TRIS-HCl + CaCl₂ 10 mM, pH 9, durante 60 minutos a 5°C. A continuación se pasaron a otra solución similar a 37 °C durante 48 horas, en ambos casos sin agitar. Seguidamente, se lavaron con agua destilada y se fijaron en una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 12 % por 15 minutos. La tinción fue realizada según la técnica descrita anteriormente para (SDS-PAGE). Una vez revelada la actividad, se determinó el número de bandas con actividad proteolítica residuales, comparándolas con un control sin inhibidor.

Estudios de inhibición por técnicas electroforéticas para proteasas ácidas

En el caso de la inhibición de proteasas ácidas, se tomaron 20 µL del extracto de los juveniles de *C. undecimalis* y se incubaron en 5 µL de Pepstatin A por 1 h, luego se le adicionaron 20 µL de tampón de muestra formada por 0,1 M Tris- HCl, pH 5,5, glicerol (v/v), (p/v) azul de bromofenol 0,5 %, después se realizó la electroforesis y se reveló como se menciona en el apartado 4.1.3.6.

b) Estudio de digestibilidad “in vitro” de ingredientes proteínicos y dietas en juveniles del robalo blanco

Los estudios de digestibilidad *in Vitro*, se realizaron con los extractos multienzimáticos previamente preparados como se mencionó anteriormente.

Selección de ingredientes

La selección de los ingredientes se realizó en base a las harinas de mayor uso en la elaboración de alimentos balanceados utilizados por los fabricantes de dietas para acuicultura. En este estudio se probaron ingredientes proteínicos de origen animal y vegetal como son:

- 1.- Caseína comercial: elaborada por Research Organics y distribuida por Probiotek usada como referencia de máxima hidrólisis en la fase alcalina, presenta un valor de proteína cruda de 90% (usada como control).
- 2.- Hemoglobina (Bovine erythrocytes): elaborado por USBiological (United States Biological) usada como referencia de máxima hidrólisis en la fase ácida, presentando un valor de proteína cruda de 90% (usada como control).
- 3.- Hidrolizado proteínico de pescado comercial: el cual es originario de Francia y fue elaborado por hidrólisis química de proteína de pescado, contiene aproximadamente un 70

% de proteína cruda.

4.- Harina de cerdo: Distribuida por National Renderers Association ubicada en Lomas de Chapultepec 11000 en la ciudad de México. Esta harina contiene 54% de proteína cruda.

5.- Harina de pollo: Distribuida por National Renderers Association con un total de 65% de proteína cruda. Sus laboratorios están localizados en Lomas de Chapultepec 11000 en la Ciudad de México.

6.- Harina de gluten de trigo: adquirida de Gluten y Almidones Industriales S.A. de C.V. México D.F. con un contenido del 75% de proteína.

7.- Harina de Sangre de res Texcoco: obtenida del Rastro de Texcoco, en el Municipio de Texcoco, Estado de México, la sangre es colectada y luego secada, contiene un 64% de Proteína.

Las demás harinas utilizadas en el experimento, fueron proporcionadas por la empresa “Alimentos de Alta Calidad El Pedregal S.A. de C.V.” los cuales son distribuidores de la empresa de alimentos Nelson & Sons Inc., fabricantes de los alimentos Silver Cup.

8.- Harina de pescado (Sardina): este ingrediente cuenta con un total de 64,1% de proteína.

9.- Harina de pescado (Sardina y anchoveta): cuenta con un 56% de proteína cruda.

10.- Harina de sangre de pollo: contiene un 82% de proteína.

11.- Harina de jaiba entera: este ingrediente cuenta con un total de 30% de proteína cruda.

12.- Harina de carne y vísceras de pollo: contiene 60% de proteína.

13.- Harina de angre de res (Prieto): con un total de 72% de proteína cruda en su contenido.

14.- Harina de sangre de res: elaborado con un total de 64% de proteína cruda.

15.- Pasta de soya: esta harina contiene un 49,2 % de proteína.

Determinación del grado de hidrólisis (GH%)

El grado de hidrólisis (GH%) de las proteasas digestivas se determinó utilizando un pH-STAT (Metrohom, Titrino 718, Suiza). Para ello se preparó una solución acuosa de materia

prima con 8 mg de proteína soluble/mL en un vaso de 20 mL empleando una modificación del método propuesto por Saunders *et al.* (1972).

A continuación se le ajustó el pH a 3,5 con HCl 0,1 N para proteasas ácidas, a esta mezcla se le agregaron 80 μ L (25 U/mL) de la preparación enzimática a pH 3 manteniendo la mezcla de reacción en agitación continua (500 rpm) a 37 °C durante 15 minutos. De la misma forma se realizó para la reacción alcalina, para lo cual se ajustó el pH a 7,8 con NaOH 0,1N y se le agregaron 100 μ L de el extracto enzimático (17 U/mL) a pH 8 manteniendo en agitación continua (500 rpm) a 37 °C durante 45 minutos. El grado de hidrólisis se calculó a partir del volumen de NaOH 0,1 N necesario para mantener el pH a 8, una vez concluida la digestión alcalina y el volumen de HCl 0,1 N necesario para mantener el pH a 3,5, al terminar la digestión ácida. Así mismo, se valoró el nivel de autohidrólisis de los diferentes ingredientes en ausencia de las proteasas digestivas. En todos los casos se determinó el valor de la hidrólisis (GH) en ausencia del extracto enzimático, que fue sustituido por un volumen equivalente de agua destilada. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El método para la determinación del grado de hidrólisis se basa en el número de enlaces peptídicos rotos a lo largo del proceso de la hidrólisis enzimática. El resultado de la acción de una proteasa sobre este enlace es la formación de un grupo amino y otro carboxilo libres que podrán ser más o menos ionizados en función del pH de la reacción. En el caso concreto del intervalo de pH 5-6 hay un equilibrio entre los protones captados y cedidos que determinaron la invariabilidad del pH de la mezcla. Sin embargo, por debajo de pH 3,1-3,6 los grupos aminos están totalmente protonados, con lo que la ruptura de un enlace peptídico se produce un incremento en el pH de la mezcla de hidrólisis. Por el contrario, a valores de pH entre 7,5 y 8 los grupos carboxilos libres están totalmente disociados y como consecuencia se produce una acidificación del medio de reacción. En esta última premisa se basa en el principio químico de la técnica de pH-

STAT. Cuando la hidrólisis tiene lugar a pH neutro, la disociación de los grupos carboxilos liberados disminuye el pH de la mezcla de reacción, de este modo la cantidad de base (NaOH) consumida para mantener el pH constante es directamente proporcional al número de enlaces peptídicos hidrolizados, es decir, al grado de hidrólisis (GH).

El grado de hidrólisis, se expresó como el porcentaje del número de enlaces peptídicos hidrolizados (h) con respecto al total de la proteína (h_{tot}), se calculó mediante la siguiente ecuación:

Cálculo del grado de hidrólisis de una reacción enzimática.

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

Siendo h el número de enlaces peptídicos hidrolizados.

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

$$h = Vb \times Nb \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{MP}$$

Siendo: Vb: consumo de base en mL, Nb: la normalidad de la base, α : la constante de disociación de los grupos α -NH₂, MP: la masa de proteína en la mezcla de reacción, h_{tot} : el número de enlaces peptídicos totales del sustrato proteínico, h: número de enlaces peptídicos hidrolizados.

Los valores de actividad ácida se estimaron teniendo en cuenta la relación existente entre la actividad proteasas totales. La fase alcalina se realizó por medio de una modificación del método propuesto por Dimes & Haard (1994). Durante la determinación del grado de hidrólisis de las materias primas con los extractos enzimáticos de los peces, se colectaron muestras (40 μ L) del ingrediente hidrolizado de la siguiente manera.

1.- Digestión ácida: Al adicionar al extracto estomacal se tomaron muestras a los 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 y 900 segundos durante la hidrólisis ácida.

2.- Digestión alcalina: Al adicionar el extracto intestinal se tomaron muestras a los 0, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000, 2500 y 2700 segundos.

Análisis mediante técnicas electroforéticas

De los 40 μ L, 20 μ L se mezclaron a partes iguales con tampón de muestra (1 mL de 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 1,6 mL de SDS; 0,4 mL de 2- β -mercaptoetanol; 0,8 mL glicerol; 0,5% (P/V) azul de bromofenol) y se calentaron durante 4 minutos a 100 °C. Posteriormente, se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Las electroforesis (SDS-PAGE) se desarrollaron de acuerdo con el método propuesto por Laemmli (1970), usando geles de poliacrilamida al 12 % (su preparación se muestra en la tabla 4) y a cada pocillo se le agregó 35 mL de la mezcla obtenida. Las electroforesis se desarrollaron a voltaje constante de 100 voltios por gel durante 90 minutos y a 5°C. A continuación, los geles se fijaron durante 15 minutos en una solución de TCA al 12% y seguidamente se tiñeron durante 60 minutos en otra solución compuesta de 0,1% de azul brillante de Coomassie (BBC R-250) en metanol-ácido acético-agua destilada (50:10:40). Para desteñirlos se utilizó una solución de metanol-ácido acético-agua destilada (50:10:40). Una vez desteñidos se hidrataron en agua destilada, para ser digitalizados.

Análisis de aminoácidos totales liberados OPA (*o*-ftaldialdehído)

Los otros 20 μ L de la solución acuosa se fijaron con 20 μ L de una solución de tricloroacético (TCA) al 12 % para realizar los análisis de aminoácidos libres totales de acuerdo a la técnica propuesta por Church *et al.* (1983). Esta técnica se basa en la unión de la parte amino terminal con el reactivo de *o*-ftaldialdehído (OPA). La solución extemporánea de OPA contenía 50 mL de tetraborato sódico 0,1 M; 5 mL de SDS al 20 %;

80 mg de OPA disueltos en 1 mL de metanol y 0,2 mL de β -mercaptoetanol, aforándose hasta 100 mL de volumen final.

Las muestras obtenidas del vaso de reacción 20 μ L fueron mezcladas con el mismo volumen de TCA al 20% (p/v), y la solución resultante se centrifugó (14000 rpm por 15 minutos). Se tomaron 10 μ L del sobrenadante y se añadieron directamente a 1 mL del reactivo OPA, mezclado brevemente e incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último se midió la absorbancia a 340 nm y se comparó con un estándar elaborado con L-leucina (0,5 mg/mL) con concentraciones crecientes de 0 a 20 μ g/mL para la determinación de la cantidad de aminoácidos libres totales en las muestras. Los resultados se expresan como μ g de equivalentes de L-leucina liberados por cada μ g de proteína. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Formulación y elaboración de las dietas con los ingredientes seleccionados

Los cálculos en la formulación de las dietas fueron realizados por medio del programa Mixitwin V 5,0, considerando los mejores valores de GH y OPA de cada ingrediente y formulando las dietas para ser isoproteínicas e isocalóricas.

Para la elaboración de las dietas, los macronutrientes (harina de sardina Pedregal y caseína) se pasaron por un molino picadora marca BRAUN^{MR} MODELO KSM2 y posteriormente a un tamiz eléctrico marca LEESON^{MR} modelo RX-812 por una criba de 500 micras para tener un mismo tamaño de partículas, los ingredientes se pesaron según la formulación de las dietas experimentales con una balanza analítica marca Sartorius^{MR} modelo BL 310 con $\pm 0,1$ mg de precisión, a continuación se mezclaron los ingredientes en seco durante 15 minutos utilizando una batidora de rotación marca BATHAMMEX^{MR} modelo 178716. De la misma forma, se pesaron los micronutrientes (premezcla de vitaminas, minerales y vitaminas C) y fueron agregados a la mezcla de los macronutrientes y mezclados durante 15

minutos. Posteriormente se pesaron los ingredientes líquidos (aceites de sardina y lecitina de soya) y se añadieron a la mezcla de los macronutrientes y micronutrientes, luego se mezclaron durante 15 minutos, finalmente se agregó como ligante grenetina al 3%, que previamente fue disuelto con 1 L de agua caliente utilizando una parrilla marca Thermolyne SYBRON^{MR} modelo SPA1025B y se mezclaron; poco a poco se le agregó el agua y se siguió mezclando hasta que la masa se compactó. La masa se colocó en un molino marca TOROREY^{MR} M-22R1 para dar forma a los pellets con una matriz de 4 mm de diámetro (ACERLOT, INOX). Luego se secaron en una estufa marca CORIAT a una temperatura constante de alrededor de los 60 a 70 °C en un periodo de secado de 10 a 12 horas. Las dietas fueron llevadas a temperatura ambiente y mantenidas en un refrigerador marca TOROREY^{MR} modelo R-36 con temperatura de 0-7 °C ± 1,5 °C. En la Tabla 5, se muestran las concentraciones de los ingredientes utilizados en la formulación de las dietas.

Tabla 5. Formulaciones de los alimentos diseñados en base fisiológica para el cultivo de juveniles de robalo blanco.

Ingrediente	Dieta H. Pesc.	Dieta H. Pollo	Dieta H. Cerdo
Harina de pescado (Sardina, Pedregal)	45,05	0,00	0,00
Harina de Pollo	0,00	44,05	0,00
Harina de Cerdo	0,00	0,00	58,00
Pasta de soya	13,00	12,80	11,55
Harina de sorgo	33,00	34,00	22,50
Hidrolizado de pescado	2,00	2,00	2,00
FERPAC			
Aceite de pescado (Pedregal)	2,00	2,10	1,50
Lecitina de soya ADONAJI	1,50	1,60	1,00
Grenetina	3,00	3,00	3,00
Vitamina C (Rovimix-Roche)	0,5	0,50	0,50
Premix vit (UJAT)	0,20	0,20	0,20
Premix min (UJAT)	0,15	0,15	0,15
Nutriente (g/100g de dieta BS)			
Proteína	40,15	40,00	40,00
Grasa	10,10	10,03	10,44
Fibra	0,81	1,55	2,66
Ceniza	8,76	7,08	16,86

Análisis estadístico

A todos los análisis se les hicieron pruebas de normalidad y homoscedasticidad; en los casos donde estos postulados se cumplieron, se aplicaron análisis de varianza de una vía y pruebas posteriores de Tukey. En los casos donde no se cumplieron los postulados, se aplicaron prueba de Kruskal - Wallis y pruebas de Tukey no paramétricas. Para los GH's, las pendientes fueron comparadas por medio de un análisis de prueba de Tukey para detectar las diferencias significativas ($P < 0,05$). Para todos los estadísticos se utilizó el

programa estadístico STATISTICA v 7.

Resultados

a) Caracterización del complejo enzimático digestivo en juveniles del robalo blanco.

Actividad de proteasas

Después de los ensayos requeridos para medir las actividades proteolíticas ácidas y alcalinas, los estudios revelaron que los juveniles de robalo blanco, tienen una mayor actividad enzimática en el estómago en relación a la actividad proteolítica presentada en la parte intestinal del tracto digestivo (Tabla 6).

Tabla 6. Actividad proteolítica de las enzimas digestivas de robalo blanco

Actividad Proteolítica	Unidades/mL	Unidades/g tejido fresco	Unidades/Juveniles
Ácida (Estómago)	25	125	18,4
Alcalina (Intestino)	17	85	5

Efecto del pH sobre la actividad de proteasas ácidas

El nivel óptimo de pH proteasas gástricas, se obtuvo a pH de 2, mostrando una caída uniforme hasta pH 4, descendiendo drásticamente a partir de pH de 5 donde el ambiente comienza a tornarse más alcalino (Fig. 1).

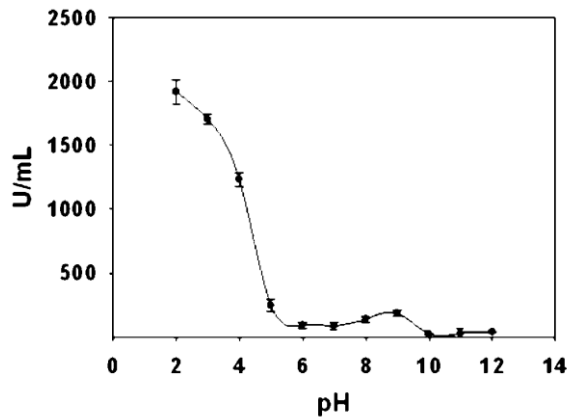


Figura 1. pH óptimo para la actividad de proteasas ácidas de robalo blanco.

Efecto del pH sobre la estabilidad de proteasas ácidas

Para los estudios de estabilidad de pH y temperatura, los tiempos de incubación cero fueron tomados como el 100% de actividad, con la finalidad de poder observar el comportamiento de la enzima en base a los tiempos de exposición a tiempos y pH's diferentes. En las pruebas de estabilidad al pH, la acción de las enzimas gástricas se mantuvo estable en pH 2 a 8. Sin embargo, a medida que aumenta el pH del medio, la actividad enzimática disminuye gradualmente conforme se aumentan los tiempos de incubación, mostrándose una desestabilización a pH mas alcalinos, en donde a partir de pH 10 la pepsina se desestabiliza, mostrando en los primeros 30 minutos de incubación a diferentes pH's, la actividad de la pepsina disminuye, pero eleva su actividad a partir de los 60 minutos de incubación (Fig. 2).

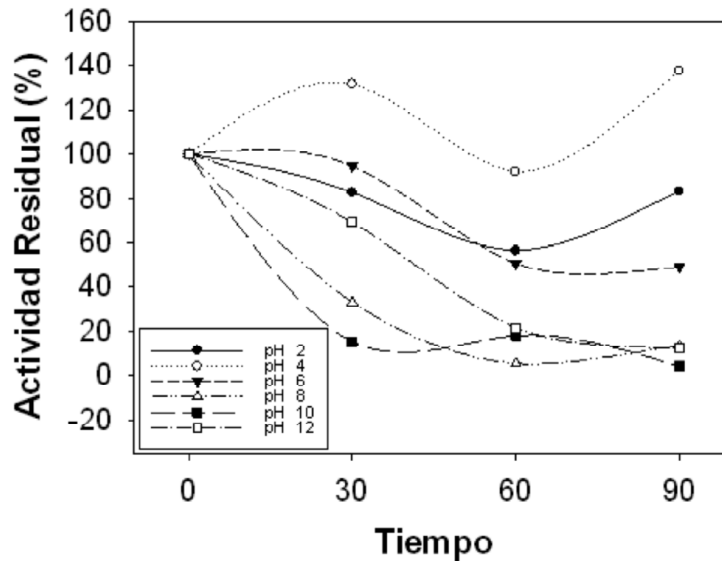


Figura 2. Estabilidad al pH de las proteasas ácidas de robalo blanco.

Efecto del pH sobre la actividad de proteasas alcalinas

Los ensayos con enzimas alcalinas, son para obtener el parámetro operacional de la actividad de estas enzimas diferentes pH's. Las enzimas proteolíticas intestinales mostraron dos picos de máxima actividad, siendo el más alto a pH 7, reduciendo su actividad a pH 8, 9 y 10 donde se muestra una meseta presentado un segundo de actividad a pH 11, decayendo la actividad de manera pronunciada a pH de 12, por lo que se puede observar que el rango de máxima actividad de las enzimas proteolíticas alcalinas de robalo blanco se presenta a pH 7 y pH de 11 (Fig. 3).

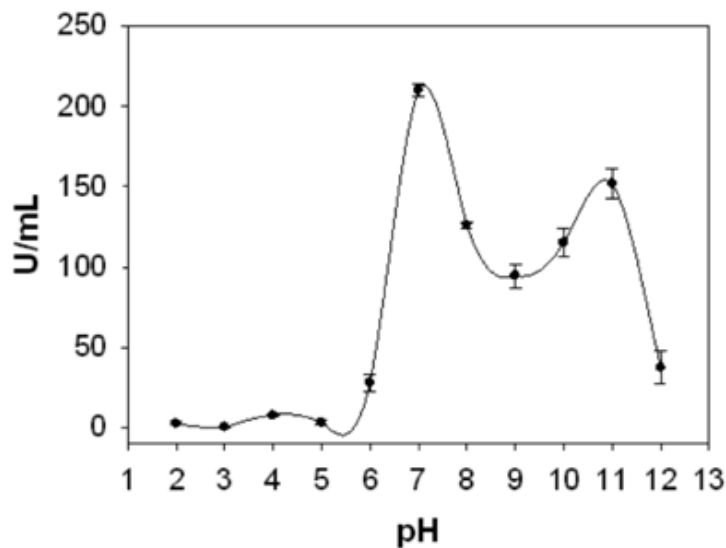


Figura 3. pH óptimo para la actividad de las proteasas alcalinas de robalo blanco.

Efecto del pH sobre la estabilidad de proteasas alcalinas

Para probar la estabilidad de las proteasas alcalinas, los extractos fueron sometidos a diferentes tiempos de preincubación a diferentes pH's y después se evaluó su actividad residual bajo las condiciones estándar. Las proteasas intestinales mostraron ser estables a los diferentes pH utilizados en los ensayos con caseína, presentando mayor estabilidad en rangos de pH 4-10, con inestabilidad a pH extremos, manteniendo un aumento en su actividad en los primeros 120 minutos, siendo afectada a los 180 minutos de incubación. Los valores de pH 2 y 12 se vieron afectados en los primeros 60 minutos de incubación elevando su actividad a partir de los 120 minutos de incubación (Fig. 4), La actividad proteolítica a pH 4 se ve afectada en los primeros 60 minutos, sin embargo se estabiliza a partir de los 120 minutos de incubación con caseína, a pH de 6 la actividad muestra una caída a partir de los 120 minutos, los ensayos con pH de 8 y 10 muestran una pequeña caída de actividad a los 180 minutos de incubación, logrando ser estables a los diferentes pH's, a partir de los 120 minutos de incubación.

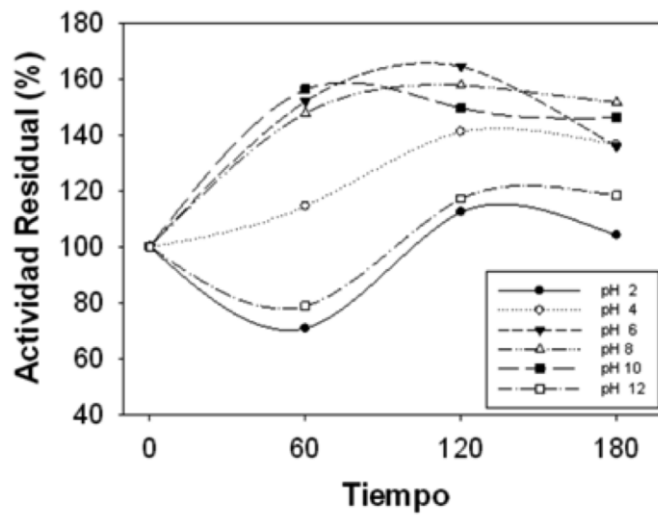


Figura 4. Estabilidad al pH de las proteasas alcalinas de robalo blanco.

Efecto de la temperatura sobre actividad de proteasas ácidas

En las enzimas proteolíticas de la sección estomacal de robalo, la mayor actividad se reveló a los 75 °C, con un crecimiento gradual de actividad a partir de 35 °C para después descender a los 85 °C (Fig. 5).

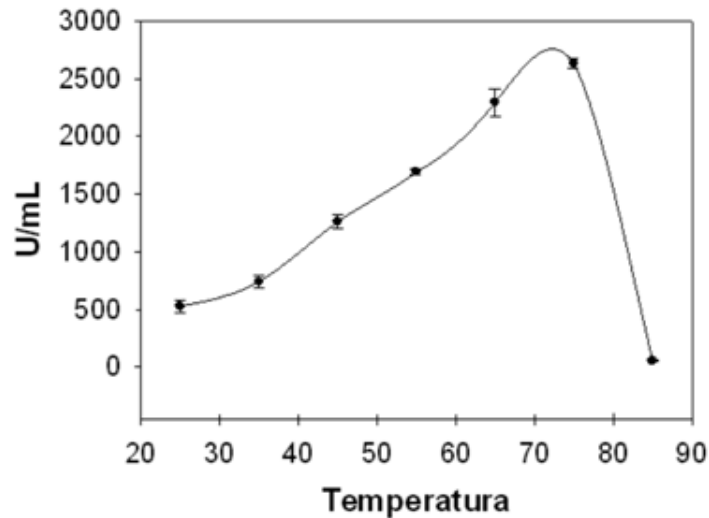


Figura 5. Temperatura óptima para la actividad de las proteasas ácidas de robalo blanco.

Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de proteasas ácidas

Las proteasas gástricas mostraron ser estables a los cambios de temperatura. En los ensayos sobre estabilidad proteolítica alcalina, los resultados obtenidos reflejan que existe una relación entre la temperatura y el tiempo de exposición de las enzimas a las diferentes temperaturas (Figura 6), donde se observa que a menor tiempo de exposición a temperaturas altas, las proteasas presentan alta actividad. Sin embargo los mejores resultados se obtuvieron a mayor tiempo de exposición y menor temperatura, siendo las temperaturas de 25, 35 y 45°C respectivamente, las que presentaron los valores más altos de actividad enzimática a 90 minutos de incubación por encima del 100% de actividad residual.

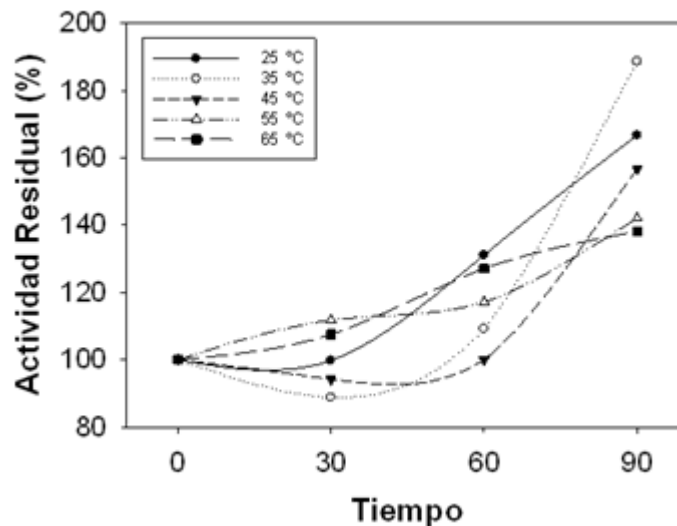


Figura 6. Temperatura óptima para la actividad de las proteasas ácidas del robalo blanco

Efecto de la temperatura sobre la actividad de proteasas alcalinas

La actividad óptima de proteasas alcalinas a la temperatura registró el máximo valor a los 65 °C; sin embargo, se puede observar que este tipo de proteasas presenta una alta actividad a partir de los 45 °C y una caída drástica a los 75 °C (Fig. 7).

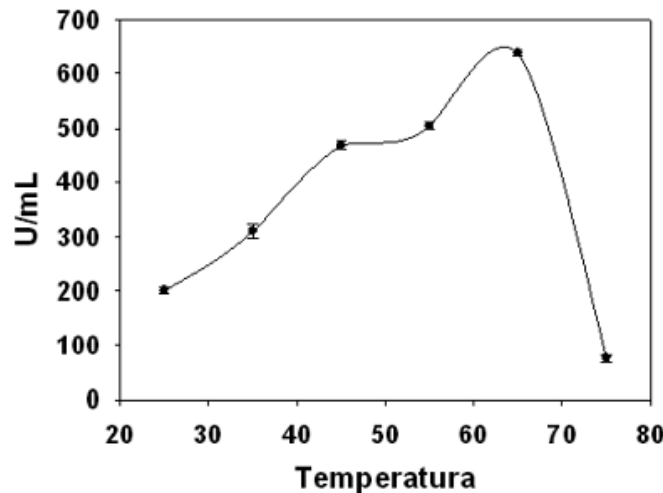


Figura 7. Temperatura óptima para la actividad de las proteasas alcalinas de robalo blanco

Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de proteasas alcalinas

En los ensayos con caseína para los estudios de la estabilidad de las proteasas alcalinas, la actividad se mostró estable en rangos de temperatura de 55-65°C elevando la actividad por enzima del 100% en los primeros 30 minutos de incubación, presentando una caída en la actividad a los 60 minutos, y un aumento a los 90 minutos, las proteasas alcalinas mostraron inestabilidad a 25 °C, donde se puede observar la caída gradual de la actividad proteolítica a medida que se aumenta el tiempo de exposición. Con temperaturas de 45 °C, se muestran respuestas similares donde hay una ligera caída de la actividad a los 60 minutos de incubación y luego un aumento en la actividad residual a los 90 minutos. A

35°C se presenta una actividad a los primeros 30 minutos, presentando los valores más altos de la actividad proteolítica a partir de los 60 minutos de incubación, (Fig. 8). Las mayores actividades se presentaron a temperaturas de 35-45°C después de los 90 minutos de incubación.

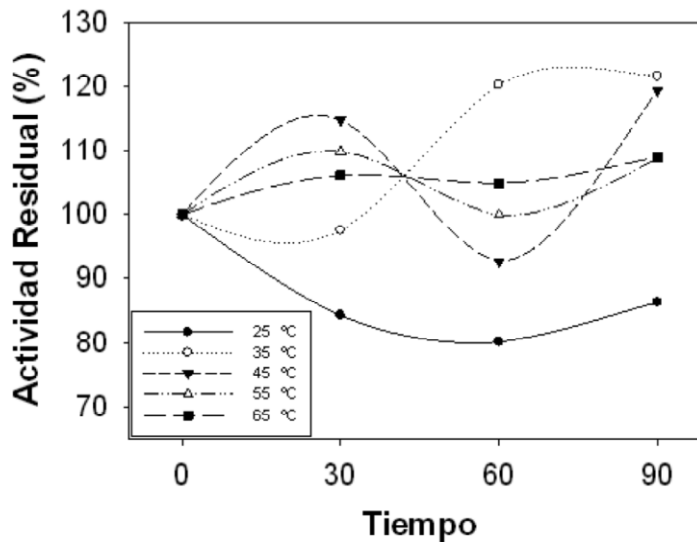
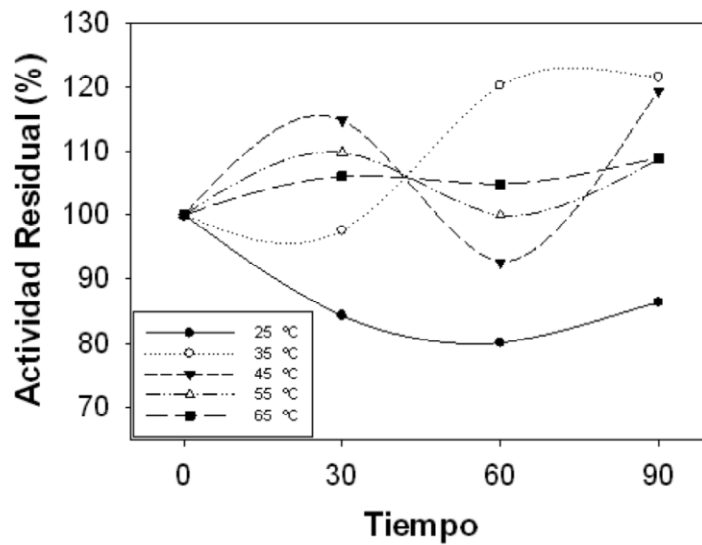


Figura 8. Termoestabilidad de proteasas alcalinas de robalo blanco.

Caracterización de proteasas alcalinas usando SDS-PAGE

Al aplicar la técnica de SDS-PAGE gel electroforesis, a los extractos multienzimáticos intestinales de robalo blanco para la caracterización de proteasas digestivas alcalinas, se pudieron observar dos bandas activas al revelar los geles electroforéticos (Fig. 9).

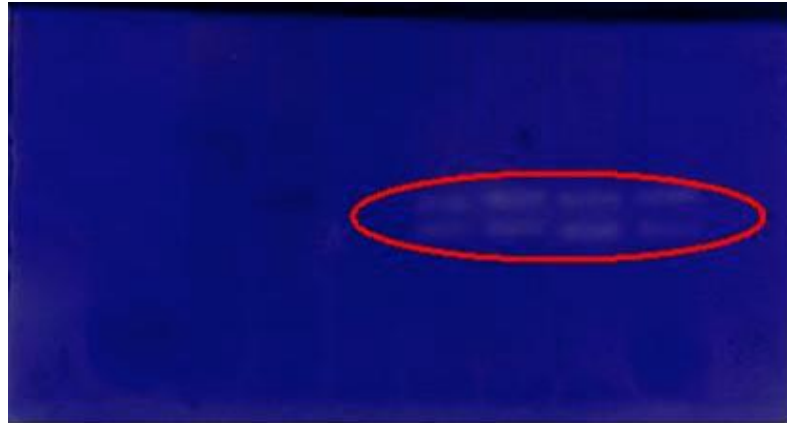


Figura 9. Bandas enzimáticas alcalinas activas en intestino de robalo blanco.

Caracterización de proteasas ácidas usando PAGE

Al ser analizado el extracto multienzimático estomacal con la técnica PAGE, solo se presentó una banda de proteasas gástricas activas (Figura 10).

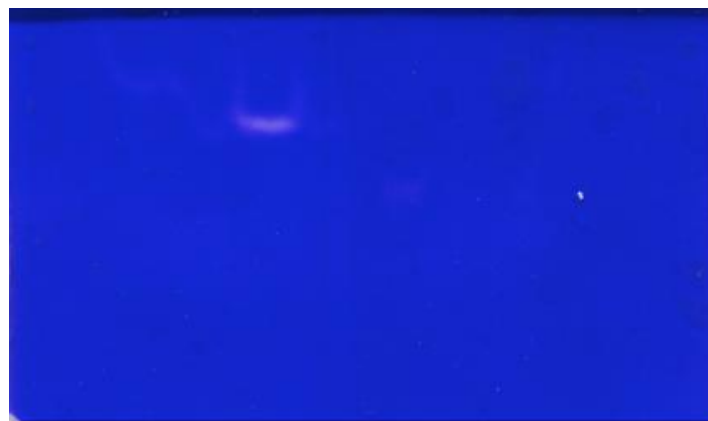


Figura 10. Banda enzimática ácida activa en estómago de robalo blanco.

Efecto de inhibidores sobre la actividad de proteasas alcalinas y ácidas

Los extractos enzimáticos fueron expuestos a una serie de inhibidores y/o quelantes específicos para ciertos grupos de enzima, donde las proteasas alcalinas mostraron una reducción en la actividad. El tosil-fenilalaninclorometil cetona (TPCK), redujo la actividad de las proteasas alcalinas en un 17%, mientras, el tosyl-lisin-clorometil cetona (TLCK) inhibió en un 68%, la 1-10 fenántrolina presento mayor porcentaje de inhibición con un 85%, el inhibidor de tripsina de soya (SBTI) redujo la actividad en un 41%, mientras el quelante EDTA (ácido etilendiamintetraacético) presento el 40,5% de la reducción de actividad, el PMSF (fenil-metil-sulfonil fluoruro) redujo la actividad proteolítica en un 60% y la Ovoalbúmina un inhibió la actividad de las proteasas intestinales en un 59% (Fig. 11).

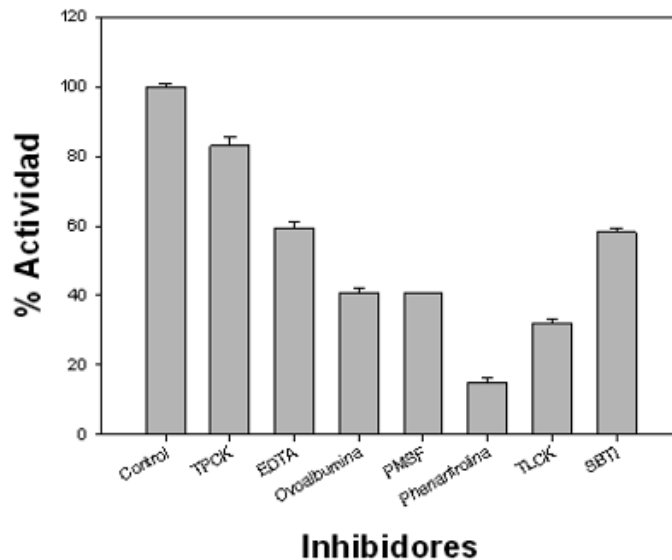


Figura 11. Efecto de Inhibidores sobre la actividad de proteasas alcalinas del robalo blanco.

Para los estudios de inhibición de las enzimas gástricas de *Centropomus undecimalis*, se utilizó la pepsina porcina como control, utilizando el Pepstatin A como inhibidor; la acción proteolítica de la pepsina porcina se vio inhibida en un 86% al ser expuesta al Pepstatin A (Fig. 12).

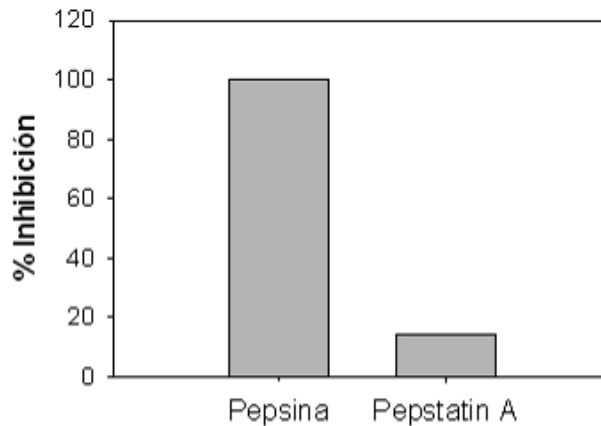


Figura 12. Efecto de inhibidores sobre la actividad de proteasas ácidas de robalo blanco.

Estudios de inhibición por técnicas electroforéticas para proteasas alcalinas

Los datos obtenidos por la técnica SDS-PAGE, mostraron tres bandas activas, lo cual indica la presencia de tres grupos de proteasas digestivas alcalinas, las mismas que fueron inhibidas parcialmente al ser expuestas a la presencia de inhibidores PMSF, TLCK, TPCK, Ovoalbúmina, SBTI, EDTA y 1-10 fenántrolina. Los inhibidores de TPCK, 1-10 fenántrolina, EDTA y PMSF inactivaron la expresión de las tres bandas proteolíticas del robalo blanco, mientras el TLCK y la ovoalbúmina solo inhibieron una banda y SBTI inhibió dos bandas activas de proteasas alcalinas (Fig. 13).



Figura 13. Efecto de los inhibidores sobre las proteasas alcalinas de robalo blanco. CT: Control, TPCK = tosil-fenilalaninclorometil cetona, Phe: 1-10 Fenantrolina, EDTA = ácido etilendiamintetraacético, TLCK = tosyl-lisin-clorometil cetona, OVO: Ovoalbúmina, SBTI = inhibidor trípico de la soya y PMSF = fenil-metil-sulfonil fluoruro.

Estudios de inhibición por técnicas electroforéticas para proteasas ácidas

En los análisis realizados el robalo blanco sólo presentó una banda activa (Fig. 14), la cual se vio inhibida completamente al ser expuesto el sustrato al inhibidor Pepstatin A, en este ensayo se utilizó la pepsina porcina como enzima control, la cual se vio inhibida por la acción del mismo inhibidor.

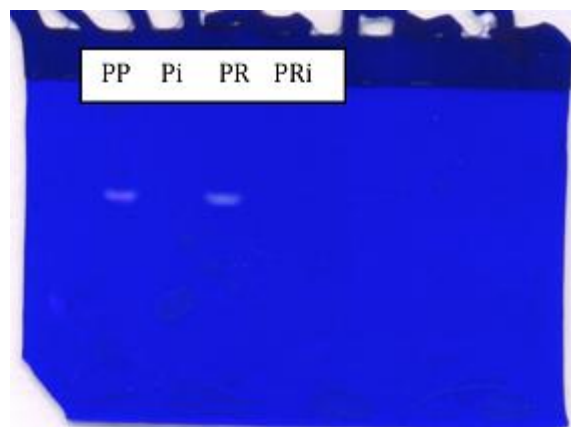


Figura 14. Efecto del Pepstatin A, sobre la pepsina de robalo blanco. PP: Pepsina porcina, Pi: Pepsina porcina + inhibidor, PR: Pepsina robalo, PRi: Pepsina robalo + inhibidor.

b) Estudio de digestibilidad “in vitro” de ingredientes proteínicos y dietas en juveniles del robalo blanco.

Los extractos enzimáticos obtenidos de las preparaciones estomacales de *C. undecimalis*, fueron expuestos a diferentes harinas vegetales y animales mediante la técnica del pH STAT. Para esta fase, se tomó como base la hemoglobina, donde sus valores fueron considerados como el 100% del grado de hidrólisis (GH) y así evaluar a través de estos valores el GH de las harinas utilizadas para estos ensayos. En la Tabla 7, se muestran las rutas de hidrólisis y los GH finales de las harinas utilizadas, en donde se observa que las harinas de cerdo, jaiba, pescado Pedregal (Sardina, Pedregal) y sangre de res, estuvieron por arriba del GH presentado por la hemoglobina, siendo la harina de vísceras de pollo la que presentó un escaso grado de hidrólisis para esta fase.

La mayoría de las harinas analizadas con extractos multienzimáticos intestinales, presentaron GH mayores a los de la caseína, cuyos valores fueron tomados como el 100% de GH, demostrándose así, que las proteasas del intestino, hidrolizan continuamente todas las harinas, siendo la harina de pescado (Sardina, Pedregal) la que mayor GH presentó en esta fase, seguido de las harinas de carne y vísceras de pollo, cerdo, pollo y pescado (sardina y anchoveta). La harina de jaiba mostró una respuesta nula a la degradación proteínica, presentando valores por debajo del resto de las harinas (Tabla 8).

Tabla 7. Valores de GH% de proteasas ácidas a diferentes tiempos de hidrólisis.

Insumo	Segundos								
	100	200	300	400	500	600	700	800	900
Hemoglobina	0,54	0,92	1,21	1,53	1,81	2,08	2,29	2,52	2,72
H. Pescado	0,18	0,29	0,32	0,39	0,51	0,57	0,61	0,66	0,67
Cerdo	1,24	1,69	2,04	2,26	2,52	2,73	2,92	3,03	3,22
Pollo	0,39	0,5	0,54	0,67	0,7	0,72	0,8	0,85	0,9
Gluten de Trigo	0	0,10	0,23	0,34	0,39	0,45	0,45	0,55	0,63
Sangre Res									
Texcoco	0,72	1,04	1,31	1,5	1,6	1,71	1,82	1,84	1,87
Sardina	1,09	1,44	1,66	1,88	1,97	2,06	2,22	2,33	2,42
Pescado Pedregal	1,36	2,12	2,52	2,92	3,05	3,28	3,33	3,49	3,6
Sangre de Pollo	0,67	1,02	1,25	1,39	1,55	1,56	1,6	1,65	1,75
Jaiba	8,11	11,93	14,19	15,52	16,33	16,7	17,3	18	18,96
Carne y Vis. Pollo	0,00	0,00	0,03	0,02	0,02	0,00	0,02	0,04	0,10
Sangre Res Prieto	0,67	0,9	1,04	1,32	1,17	1,23	1,23	1,3	1,4
Sangre Res	1,3	1,93	2,38	2,74	2,98	3,11	3,3	3,34	3,49
Pasta de Soya	0,09	0,32	0,41	0,44	0,56	0,6	0,63	0,71	0,72

Tabla. 8. Valores de GH% de proteasas alcalinas a diferentes tiempos de hidrólisis.

Insumo	Segundos										
	250	500	750	1000	1250	1500	1750	2000	2250	2500	2750
Caseína	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,15	0,23	0,29	0,38	0,53	0,58
H. Pescado	0,37	0,37	0,37	0,38	0,38	0,44	0,31	0,35	0,29	0,29	0,32
Cerdo	0,67	0,76	1,01	0,98	1,24	1,27	1,47	1,40	1,59	1,74	1,93
Pollo	0,98	1,21	1,27	1,28	1,36	1,37	1,47	1,53	1,71	1,66	1,78
Gluten de Trigo	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,37	0,39	0,42	0,47	0,58	0,58
Sangre Res											
Texcoco	0,50	0,50	0,50	0,69	0,83	0,83	0,80	0,89	1,00	1,01	1,04
Sardina	0,80	1,14	1,23	1,33	1,55	1,40	1,56	1,66	1,68	1,82	1,82
Pescado Pedregal	2,23	2,38	2,54	2,52	2,55	2,54	2,67	2,33	2,45	2,57	2,64
Sangre de Pollo	0,29	0,29	0,42	0,44	0,54	0,48	0,48	0,55	0,51	0,57	0,61
Jaiba	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13
Carne y Vis.											
Pollo	0,83	0,99	1,20	1,23	1,21	1,04	1,33	1,30	1,30	1,43	1,52
Sangre Res											
Prieto	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,42	0,50	0,55	0,57	0,58	0,50
Sangre Res	0,50	0,55	0,64	0,74	0,79	0,90	0,89	0,92	0,98	1,05	1,05
Pasta de Soya	0,33	0,62	0,65	0,77	0,80	0,80	0,74	0,80	0,84	0,86	0,87

En la tabla 9, se muestran los valores de GH para cada fase (ácida y alcalina) y el valor del GH total, así como el porcentaje de digestibilidad alcanzados por cada una de las harinas analizadas en este estudio, donde la suma del GH de la hemoglobina y la caseína, se tomó como control y fue utilizada como el 100% de la digestibilidad. En la siguiente tabla se muestra que la harina de jaiba fue la que presentó mayores GH, seguida por las harinas de pescado (Sardina, Pedregal), harina de cerdo, sangre de res y harina de pescado (sardina y anchoveta), todas ellas con valores que están por arriba del 100%, así las harinas que presentaron los valores mas bajos fueron las harinas de carne y vísceras de pollo, pasta de soya, gluten de trigo e hidrolizado de pescado, que estuvieron por debajo del 50% de la digestibilidad y el resto de las harinas estuvo por debajo del 100% pero encima del 50% de digestibilidad.

Alvarez, A. et al. 2010. Avances en la fisiología digestiva del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) en Tabasco, México. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds). Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 98-231.

Tabla 9. Porcentajes de digestibilidad de las harinas analizadas

Insumo	GH		GH Total	% Digestibilidad
	Ácido	Alcalino		
Hemoglobina/Caseína	2,71	0,58	3,30	100,00
Hidrolizado de pescado	0,67	0,32	0,99	30,04
Cerdo	3,22	1,93	5,15	155,92
Pollo	0,90	1,78	2,68	81,27
Gluten de trigo	0,62	0,58	1,21	36,66
Sangre de res Texcoco	1,86	1,06	2,93	88,78
Sardina	2,42	1,82	4,24	128,53
Pescado Pedregal	3,60	2,64	6,24	189,05
Sangre de pollo	1,75	0,61	2,36	71,55
Jaiba	18,95	0,13	19,09	578,18
Carne y vísceras de pollo	0,10	1,52	1,62	49,03
Sangre de res Prieto	1,40	0,50	1,90	57,42
Sangre de res	3,48	1,05	4,54	137,37
Pasta de soya	0,72	0,87	1,60	48,33

Análisis mediante la técnica de OPA para aminoácidos liberados

La harina de pescado pedregal fue la que presentó los mejores valores en la evaluación de los aminoácidos libres totales (AALT), liberados durante el proceso de degradación de proteínas utilizando los extractos multienzimáticos del estómago de *C. undecimalis*, aplicando el sistema cerrado mediante la técnica del pH STAT, estos valores fueron seguidos por los alcanzados en las harinas de sangre de pollo, carne y vísceras de pollo, harina de jaiba y sangre de res, donde se tomaron los valores de la liberación de aminoácidos libres de la hemoglobina como muestra control de los aminoácidos liberados al medio, donde la harina de gluten de trigo, hidrolizado de pescado y la harina de sangre de res Prieto presentaron los valores mas bajos en la liberación de aminoácidos libres (Tabla 10).

La acción proteasas digestivas del intestino de *C. undecimalis*, en el proceso de degradación proteínica para la liberación de aminoácidos, se vio favorecida en las harinas de hidrolizado de pescado la cual fue la que presentó valores significativamente altos, seguida por las harinas sangre de pollo, sangre de res y harina de sardina que presentaron mayor cantidad de AALT liberados al medio, tomándose como referente los valores obtenidos por la caseína, siendo las harinas de pollo, cerdo y gluten de trigo las que mostraron una menor cantidad de aminoácidos libres liberados para la fase alcalina (Tabla 11).

Tabla 10. Aminoácidos libres liberados por las enzimas gástricas ($\mu\text{g/mL}$)

Insumo	Segundos									
	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900
Hemoglobina	0	61	66	57	47	151	184	151	141	160
H. de Pescado	0	5	0	19	0	14	24	28	24	42
Cerdo	0	9	0	9	28	19	28	75	71	61
Pollo	0	9	24	5	47	85	57	75	47	57
Gluten de Trigo	0	0	0	9	0	47	28	19	57	47
Sangre Texcoco	0	0	9	19	9	19	28	9	28	75
Sardina	0	0	28	28	28	42	75	71	66	75
Pescado Pedregal	0	0	47	42	146	472	580	632	882	1146
Sangre Pollo	0	38	90	33	42	61	52	42	66	146
Jaiba	0	5	0	0	0	0	9	28	75	141
Carne y Vís de Pollo	0	90	90	94	94	85	90	160	160	146
Sangre Res Prieto	0	5	5	0	0	5	24	38	33	38
Sangre de Res	0	14	19	19	19	28	38	90	38	127
Pasta de Soya	0	52	52	38	38	52	52	57	52	66

Tabla 11. Concentración de aminoácidos liberados por las enzimas intestinales de *C. undecimalis* ($\mu\text{g/mL}$).

Insumo	Segundos											
	0	250	500	750	1000	1250	1500	1750	2000	2250	2500	2700
Caseína	0	0	0	61	24	71	203	146	358	354	453	495
H. de Pescado	0	71	160	203	274	264	236	387	547	585	707	858
Cerdo	0	0	71	52	0	57	90	28	5	28	42	132
Pollo	0	28	61	90	80	52	94	85	94	94	118	137
Gluten de Trigo	0	0	0	0	0	0	0	19	38	66	33	104
Sangre Texcoco	0	9	99	99	141	123	113	127	179	208	255	241
Sardina	0	141	330	203	264	264	340	250	396	415	462	434
Pescado Pedregal	0	85	90	42	66	146	57	137	231	118	193	292
Sangre Pollo	0	75	75	90	90	127	184	241	212	439	547	472
Jaiba	0	0	28	146	75	66	141	118	132	175	175	160
Carne y Vís de Pollo	0	5	0	24	14	9	132	113	132	132	198	245
Sangre Res Prieto	0	52	52	52	33	94	71	104	113	123	127	170
Sangre de Res	0	80	132	123	123	146	222	217	325	401	448	439
Pasta de Soya	0	9	14	0	33	9	47	127	71	90	104	179

Análisis electroforéticos

Las muestras tomadas en los ensayos con el pH STAT en los tiempos antes mencionados, fueron analizadas mediante la técnica de SDS-PAGE, donde las enzimas gástricas del estómago de robalo blanco, presentan una rápida degradación proteínica sobre el gluten de trigo, estabilizándose a partir de los 200 segundos de exposición a la actividad enzimática (Fig. 15).

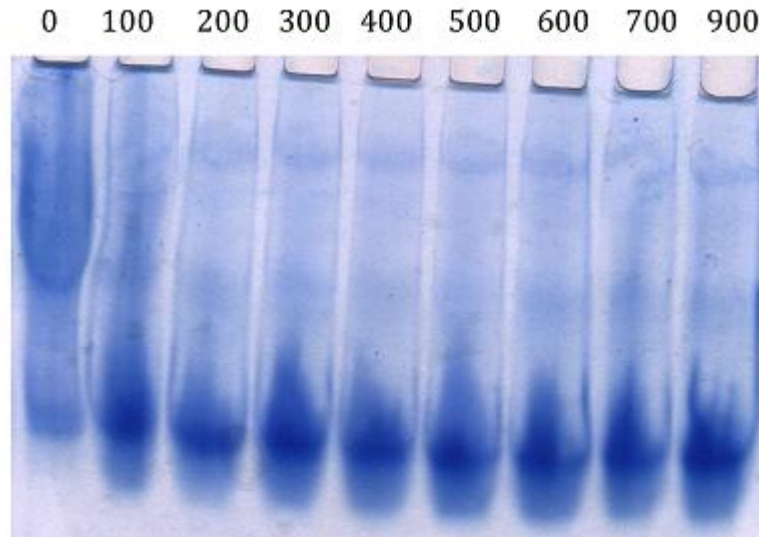


Figura 15. Degradación de la proteína de harina de gluten de trigo por acción de las enzimas gástricas de *C. undecimalis*.

Digestibilidad *in vitro* de las dietas diseñadas para juveniles de robalo blanco

Para evaluar la digestibilidad *in vitro* de las Dietas elaboradas, se utilizaron los materiales y métodos mencionados en los apartados anteriores.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos anteriores sobre GH y aminoácidos liberados, se procedió a la formulación de las dietas balanceadas para *C. undecimalis*, con las harinas que se consideraron como las mejores fuentes alimenticias. Las formulaciones de estos alimentos experimentales utilizados para este estudio, se realizaron a través de la selección de los ingredientes que presentaron mejores resultados en los análisis realizados mediante la técnica del pH STAT y la técnica de OPA (harina de cerdo, harina de pollo y harina de pescado, a partir de los cuales se formularon 3 (tres) alimentos experimentales,

utilizando como control un alimento comercial de pescado para cultivo de trucha de la empresa Silver Cup (45% de proteína y 16 % de lípidos).

Grado de hidrólisis de las dietas elaboradas

En la figura 16, se muestra que el alimento comercial de la empresa Silver Cup, presentó el mayor valor de GH, donde los alimentos formulados en base a nuestros resultados anteriores presentaron GH mas bajos, siendo el alimento de pescado el que alcanzó un valor más cercano al obtenido por el alimento elaborado por la empresa Silver Cup, seguido por el alimento de cerdo, siendo el alimento de pollo el que alcanzó el valor más bajo de GH durante la fase ácida.

Los resultados de la digestión alcalina muestran que el alimento de pollo tiene el mayor valor de GH, seguido por el alimento de pescado, el cual presenta mayor valor que el alimento comercial de la empresa Silver Cup que fue utilizado como control, y finalmente el alimento de cerdo, fue el que obtuvo el valor de GH más bajo (Fig. 17).

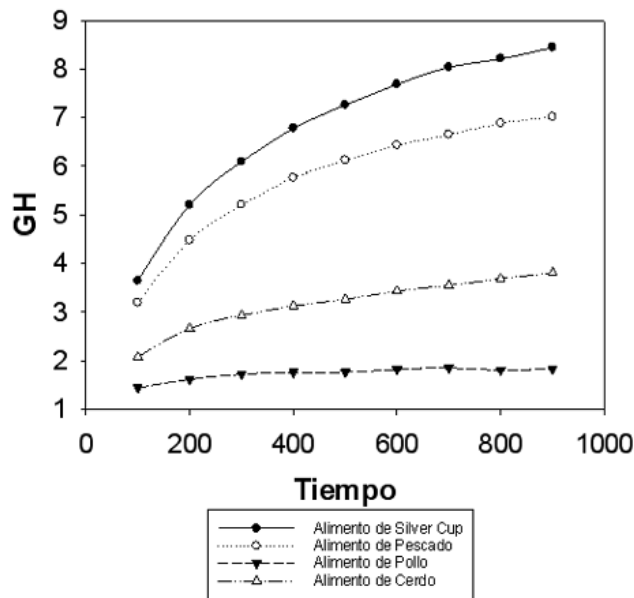


Figura 16. GH ácido de los alimentos balanceados.

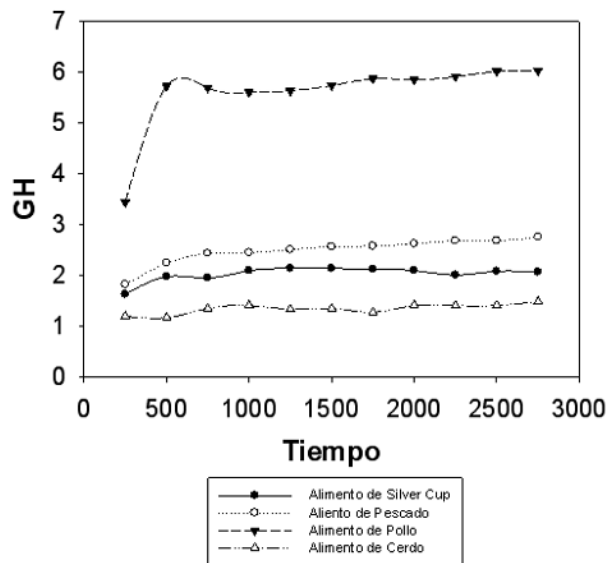


Figura 17. GH alcalino de los alimentos balanceados

La tabla 12, muestra el GH total de los alimentos elaborados, como también del alimento comercial, presentado al alimento comercial de la empresa de alimentos acuáticos Silver Cup, como el alimento de mayor valor de GH, siendo el alimento de pescado el que presento valores más cercanos al alimento comercial, seguido por el alimento de pollo, donde el valor más bajo de GH total lo presentó el alimento de cerdo.

Tabla 12. GH totales de los alimentos balanceados.

Ingrediente	GH Ácido	GH Alcalino	GH Total
Silver Cup	8.44	2.07	10.51
Alimento de Pollo	1.84	6.02	7.86
Alimento de Pescado	7.01	2.76	9.77
Alimento de Cerdo	3.81	1.49	5.30

Análisis mediante la técnica de OPA para aminoácidos liberados de las dietas balanceadas

Los datos obtenidos mediante la técnica del OPA para la fase ácida muestran que el alimento de pollo, fue el que presentó mayor digestibilidad (Fig. 18), siendo el alimento de pescado el que obtuvo los resultados más cercanos al alimento de pollo y el alimento control de la empresa Silver Cup, mostró una liberación escasa de aminoácidos.

El alimento de pescado, tiene mayor liberación de aminoácidos conforme al tiempo de residencia, en comparación con el resto de los alimentos experimentales durante la digestión alcalina (Fig. 19), tanto así que sus valores de liberación al principio de la exposición al extracto multienzimático alcalino son bajos conforme al resto y terminan por arriba de los valores de los tres alimentos antes mencionados. En esta Figura también se observa que el alimento comercial Silver Cup, es el que mas escasez de aminoácidos libres liberados presenta al medio.

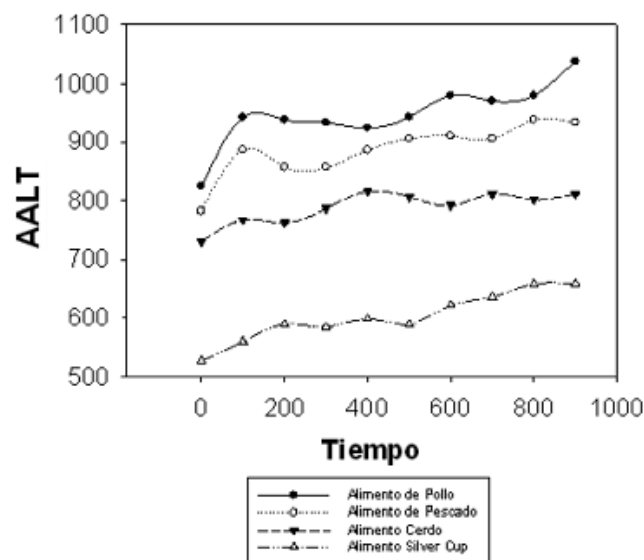


Figura 18. Curvas de liberación de aminoácidos ($\mu\text{g/mL}$) en la fase ácida.

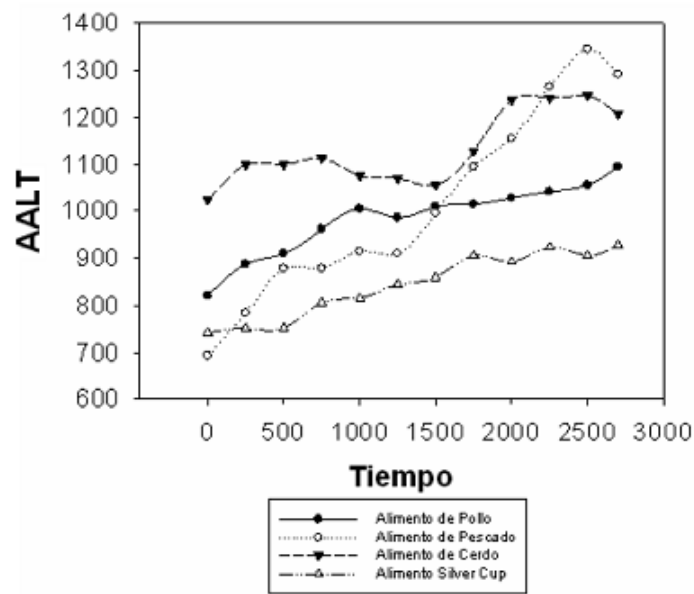


Figura 19. Curvas de liberación de aminoácidos ($\mu\text{g/mL}$) en la fase alcalina

Análisis electroforéticos

La degradación proteínica del alimento de pescado, se da de manera rápida al inicio de la exposición de este con las Proteasas alcalinas y luego conforme transcurre el tiempo se origina una degradación proteínica gradual (Fig. 20).

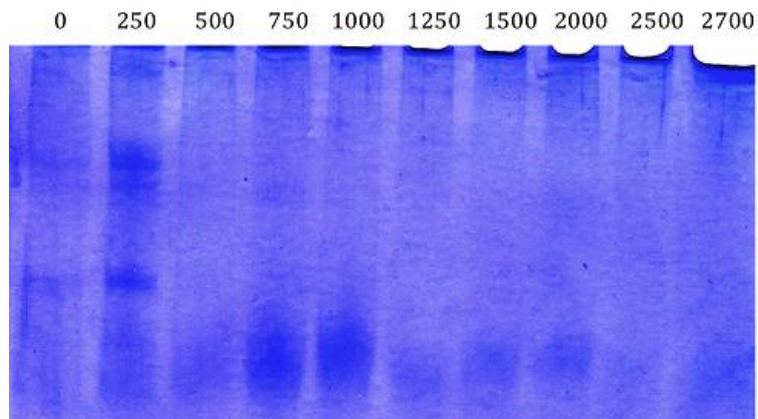


Figura 20. Degradación del alimento de pescado en la fase alcalina.

ETAPA 2) Estudio de los cambios en la actividad enzimática digestiva durante la ontogenia inicial del robalo blanco.

Materiales y métodos

Cultivo y muestreo de larvas

Las larvas de *C. undecimalis* fueron obtenidas de un solo desove inducido (Ovaplant) de reproductores mantenidos en tanques de 13 m³ de capacidad incluidos en un sistema abierto, en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la UNAM (UMDI-UNAM) en Sisal, Mérida. Las larvas fueron sembradas en un tanque de fibra de vidrio de 600 L en un sistema abierto; con temperatura de 29°C, oxígeno disuelto de 5.43 mg de OD L-1 y pH de 7.4 controlados usando el oxímetro (YSI 55, California, USA) y un potenciómetro (Denver Instrument UB-10, Denver, Colorado, Colorado, USA). Se alimentó tres veces al día (8:00, 12:00 y 18:00 h) *ad libitum* con rotíferos *Brachionus rotundiformis* desde la absorción del vitelo hasta el 25 días posteclosión (DDE), del día 20 al 30 DDE en adelante con nauplios de *Artemia* (INVE), a partir del día 27 en adelante con metanauplios de *Artemia* enriquecidos con una emulsión lipídica (SELCO, INVE).

Se colectó una cantidad variable de individuos (aproximadamente de 400 embriones a 100 larvas), utilizando una red de aproximadamente 125 µm de luz. Los muestreos fueron los días 0 (embriones), 3, 5, 7, 12, 25, 34 y 36 DDE. Los organismos fueron anestesiados a bajas temperaturas, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -20 °C hasta su uso posterior. Adicionalmente, para los mismos días se tomaron muestras de 10 larvas, las cuales fueron fijadas con formol al 4% amortiguada con boratos para evaluar el crecimiento en peso húmedo individual por medio de una balanza analítica (Sartorius AG, Gottingen, Germany; precisión de 1×10^{-4} g).

Análisis bioquímico

Los embriones y larvas completos fueron procesados hasta el 12 DDE, a partir de entonces y hasta el último día de muestreo (36 DDE) se extrajo el saco visceral. Cada muestra fue homogenizada en frío usando el tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (15 mg ml⁻¹); posteriormente se centrifugó (16,000 g durante 15 min a 4°C) y el sobrenadante fue recuperado y almacenado a -20°C hasta la realización de las técnicas bioquímicas. La concentración de proteína soluble en los extractos enzimáticos fue medida con la técnica de Bradford (1976), usando como estándar la albúmina sérica bovina.

La actividad tipo proteasa alcalina fue estimada por el método de Walter (1984), con caseína al 0.5% como sustrato en el tampón Tris/HCl 50 mM a pH 9. La proteasa ácida (activada pepsina) fue tasada con la técnica de Anson (1938), en que la hemoglobina al 0.5% en tampón Glicina/HCl 0.1mM, pH 2 fue el sustrato. Las mezclas fueron incubadas a 37°C, la reacción fue detenida mediante la adición de 0.5 ml de TCA al 20% y la absorbancia de los productos de reacción fue medida a 280 nm. La unidad de actividad enzimática fue definida como 1 µg de tirosina liberada por minuto, esto en base al coeficiente de extinción molar (0.005). La actividad tripsina se midió conforme lo descrito por Erlanger *et al.* (1961), a 25°C y con BAPNA (N- α -benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide) como sustrato en el tampón Tris-HCl 50 mM a pH 8.2 (con CaCl₂ 10 mM). La actividad quimotripsina fue identificada con el método de DelMar *et al.* (1979), a 25 °C con SAAPNA (N-succinyl-ala-ala-pro-phe p-nitroanilide) como sustrato en DMSO 10 mM y Tris/HCl 100 mM (con CaCl₂ 10 mM) a pH 7.8. La actividad carboxipeptidasa A se midió usando el método descrito por Folk y Schirmer (1963), usando como sustrato (Hippuryl-L-phenyl-alanine) en 0.025M Tris-HCl (con NaCl 0.5M) A pH 7.5. La actividad Leucina-Amino-peptidasa fue determinada en Leucina p-Nitroanilida en DMSO 0.1 mM, usando el tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7.2 a 25 °C (Maraux *et al.* 1973). En las técnicas descritas anteriormente las reacciones fueron detenidas con ácido acético al 30%; mientras

que la actividad enzimática fue definida como 1 μg de nitroanilida liberada por minuto, usando el coeficiente de extinción molar de 8.8 para tripsina, quimotripsina y leucina-aminopeptidasa.

Para la identificación de actividad enzimática α -amilasa se usó como sustrato el almidón al 2% en el tampón fosfato-citrato 0.1 M más NaCl 0.05M a pH 7.5, la absorbancia fue cuantificada a 600 nm (Robyt y Whelan 1968). La lipasa fue cuantificada en el sustrato β -naftil caprilato 200mM (en Tris-HCl 50 mM a pH 7.2 y taurocolato sódico 100 mM) según describió Versaw *et al.* (1989); la incubación fue de 30 min, entonces la reacción fue interrumpida con TCA 0.72 N, se le adicionó fast blue 100 mM y finalmente se clarificó con una solución de etanol: acetato de etilo (1:1 v/v); la unidad en este caso empleada fue especificada, conforme a las lecturas de absorbancia a 540 nm, como 1 μg de naftol liberado por minuto, con un coeficiente de extinción molar de 0.02.

La actividad fosfatasa ácida y alcalina fue estimada con 4- nitrofenilfosfato, como sustrato, en tampón cítrico/citrato a pH 5.5 si es para condiciones ácidas, o con tampón NaOH-glicina a pH 10.1 para fosfatasa alcalina; según Bergmeyer (1974). La unidad de actividad fue definida como 1 μg de nitrofenol liberado por minuto.

La actividad específica de los extractos fue expresada usando las siguientes ecuaciones: 1) Unidades por ml = $(\Delta\text{abs} \times \text{volumen final de reacción (ml)}) / (\text{MEC} \times \text{tiempo (min)} \times \text{volumen del extracto (ml)})$; 2) Unidades por mg de proteína = Unidades por ml / mg de proteína soluble; 3) Unidades por larva = Unidades por ml / número de larvas por ml. Δabs representa el incremento de absorbancia a una determinada amplitud de onda y MEC representa el coeficiente de extinción molar para el producto de la reacción ($\text{ml } \mu\text{g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Los resultados fueron representados de acuerdo a las ecuaciones 2 y 3. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

La clasificación de proteasas fue realizada mediante electroforesis SDS-PAGE, de geles discontinuos para proteasas alcalinas (Laemmli 1970; García-Carreño 1993) y PAGE en condiciones nativas para proteasas ácidas (Davis 1964). Los extractos enzimáticos se mezclaron con el tampón de muestra (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, glicerol, SDS, azul de bromofenol) a una proporción v/v de 1:1, se cargaron 20 µl de extracto y tampón de muestra en los pozos de los geles (8.3 cm x 6.1 cm x 0.75 cm). Los zimogramas discontinuos constaron de un gel de almacenamiento al 4% y un gel de separación al 10%; el corrimiento fue realizado a 80 V durante 15min y a 100 V durante 100 min con una resistencia de 120 mA, (usando el sistema Mini Protean III® Laboratorios BIORAD®, California), a 4°C con el tampón lauril (duodecil) sulfato sódico; los geles fueron sumergidos en una solución de caseína 2% (en Tris-HCl 50mM pH 9) a 4°C durante 60 min para permitir la absorción de caseína por el gel y después una incubación a 37°C durante por 18 horas para que las proteasas hidrolizaran el sustrato. La electroforesis en condiciones nativas se realizó en el gel de poliacrilamida al 10%, donde el corrimiento fue a 80 V por 15 min a 120 mA y después a 80 V durante 180 min a 24 mA; el sustrato usado fue hemoglobina 0.25% tamponada en glicina-HCl 100 mM pH 2, incubando primero a 4°C durante 30 min y después a 37°C por 90 min. La tinción fue realizada, para ambos procedimientos, con azul brillante de Coomassie R-250 (Laboratorios BIORAD®, California), 0.12 g para 100 ml de metanol: agua destilada: ácido acético (1:1:0.4 v/v) y se destiñó con una solución de metanol: ácido acético: agua destilada (1:0.29:1.5 v/v). El peso molecular fue determinado con el marcador comercial LWM de Pharmacia Biotech (Uppsala, Suiza) compuesto por seis proteínas de peso molecular conocido con un rango de 14.4-94 kDa.

Cálculos del Rf y pesos moleculares

Se utilizó un marcador de pesos moleculares de bajo peso (LRMWM) que fue aplicado para cada SDS-PAGE agregando 5 µl por poso. El LRMWM contiene las siguientes proteínas

como marcadores: Fosforilasa b (97 kDa), albúmina bovina sérica (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa) y inhibidor trípico de soya (20 kDa). La electromobilidad relativa (Rf) fue calculado para todos los zimogramas (Igbokwe y Downe 1978) y el peso molecular (MW) de cada banda con actividad de proteasa alcalina fue calculado como el ajuste lineal entre el Rf y el logaritmo decimal de los pesos moleculares de las proteínas usadas como marcadores usando el programa Quality One V 4.6.5 (Hercules, CA).

Análisis estadísticos

Para la evaluación del crecimiento larvario se utilizó un modelo de crecimiento exponencial con la expresión $y=ae^{bx}$ donde y = peso fresco individual, e = base exponencial, a = peso inicial y b = tasa de crecimiento y x = edad en días de la larva. La evaluación de los parámetros del modelo se realizaron por medio de iteraciones Mardquat usando el programa StatisticaTM v. 7.0.

Resultados

El crecimiento de las larvas de *C. undecimalis* muestra una tasa de crecimiento exponencial ($0.140 \text{ mg día}^{-1}$) para el peso (Fig. 21a) y la longitud total ($0.0782 \text{ mm day}^{-1}$) durante el larvicultivo (Fig. 21b) como se observa al utilizar el modelo exponencial.

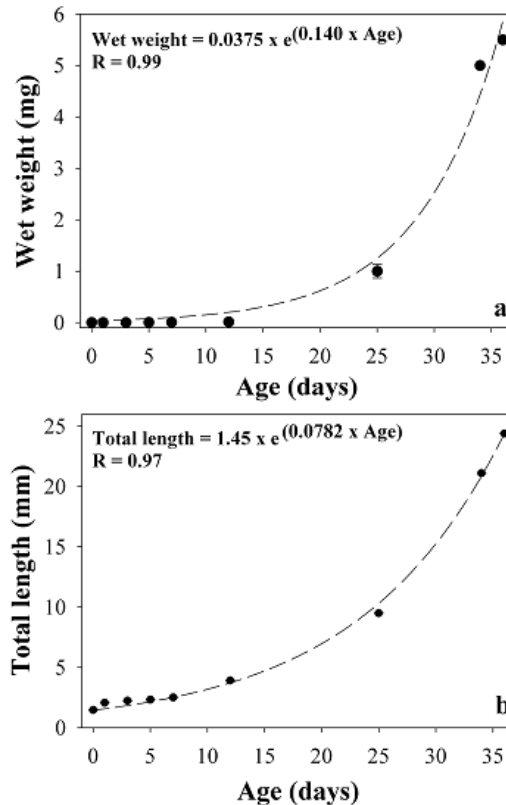


Figura 21. a) Peso promedio húmedo ($\mu\text{g larva}^{-1} \pm \text{dev. std.}$, $n = 3$ pool de larvas), y b) longitud total ($\text{mm larva}^{-1} \pm \text{dev. std.}$, $n = 3$ pool de larvas) de larvas de *C. undecimalis*.

Para todas las actividades de enzimas digestivas, tanto específicas como individuales, se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los días después de la eclosión (dde) a lo largo del larvicultivo (Figura 22a-l). La actividad específica de proteasas alcalinas fue detectada desde la eclosión (1 dde), incrementándose para el 3 dde, alcanzando su máxima actividad para el, siendo fluctuante hasta el 36 dde (Fig. 22a). La actividad específica de proteasas ácidas fue baja desde el 7 dde y se incrementó gradualmente a partir del 12 dde, para acelerar su valor rápidamente a 32 y 36 dde, siendo éste último el de máximo valor (Fig 22c). La actividad específica tipo tripsina tuvo dos picos de máxima actividad a los 7 y 12 dde, siendo el Segundo el más importante en valor; esta actividad disminuyó paulatinamente después de ese día (Fig. 22e). La actividad específica tipo quimotripsina se detectó desde el 5 dde, incrementándose gradualmente hasta alcanzar el máximo valor el 25

dde y disminuir gradualmente después de ese día (Fig. 22g). La actividad específica de la carboxipeptidasa A fue baja durante los primeros días, incrementando rápidamente a partir del 7 dde hasta el 12 dde, para reducirse a los 25 dde e incrementando nuevamente a los 34 y 36 dde (Fig. 22i). La actividad específica tipo leucina aminopeptidasa fue detectada desde la eclosión (1 dde), incrementándose gradualmente hasta alcanzar la máxima actividad en el 12 dde y decaer paulatinamente hasta el 36 dde (Fig. 28k). Para las actividades individuales de proteasa alcalina (Fig. 22b), proteasa ácida (Fig. 22d), tripsina (Fig. 22f), y carboxipeptidasa A (Fig. 22j) se detectaron incrementos graduales desde el inicio del larvicultivo alcanzando los valores máximos para todas en el 36 dde. Para las actividades individuales tipo quimotripsina se detectó un incremento similar, pero el valor máximo se detectó para el 32 dde, decayendo para el 36 dde (Fig. 22h). Finalmente, la actividad individual de la leucina aminopeptidasa fue diferente al resto, mostrando una actividad nula desde la eclosión hasta el 5 dde, incrementando rápidamente para el 7 dde y alcanzando la máxima actividad para el 12 dde, siendo fluctuante a lo largo del larvicultivo hasta el 36 dde (Fig. 22i).

La actividad específica de lipasas mostró un leve incremento para el 3 dde, manteniéndose con fluctuaciones e incrementando rápidamente para el 36 dde, siendo el día de máxima actividad (Fig. 23a). La actividad individual de lipase fue incrementando gradualmente desde la eclosión, alcanzando su máximo valor para el 32 dde y decayendo aceleradamente para el 36 dde (Fig. 23b). La actividad específica de α -amilasa estuvo presente desde la eclosión (1 dde), incrementándose a partir del 5 dde hasta el 12 dde, siendo el 7 dde el de máxima actividad, después del 12 dde la actividad decayó rápidamente (Fig. 23c). En relación a la actividad individual de la α -amilasa se detectaron dos picos de máxima actividad, el primero en el 7 dde y el segundo a los 34 dde, siendo este el día de máxima actividad (Fig. 23d). En el caso de la actividad específica de fosfatasa ácida se detectaron niveles bajos desde la eclosión hasta los 12 dde; sin embargo, del 25 dde la actividad se incrementa hasta alcanzar su máximo nivel para el 34 dde (Fig. 23e). La actividad

individual de la fosfatasa ácida tiene una tendencia similar al de otras enzimas, detectándose un primer pico de actividad para el 25 dde y el máximo valor para el 36 dde (Fig. 23f). Finalmente, la actividad específica e individual de la fosfatasa alcalina tuvieron patrones similares, presentando bajos valores desde la eclosión hasta el 12 dde, incrementándose rápidamente a partir del 25 dde, decayendo en el 34 y 36 dde (Figs. 23g y h).

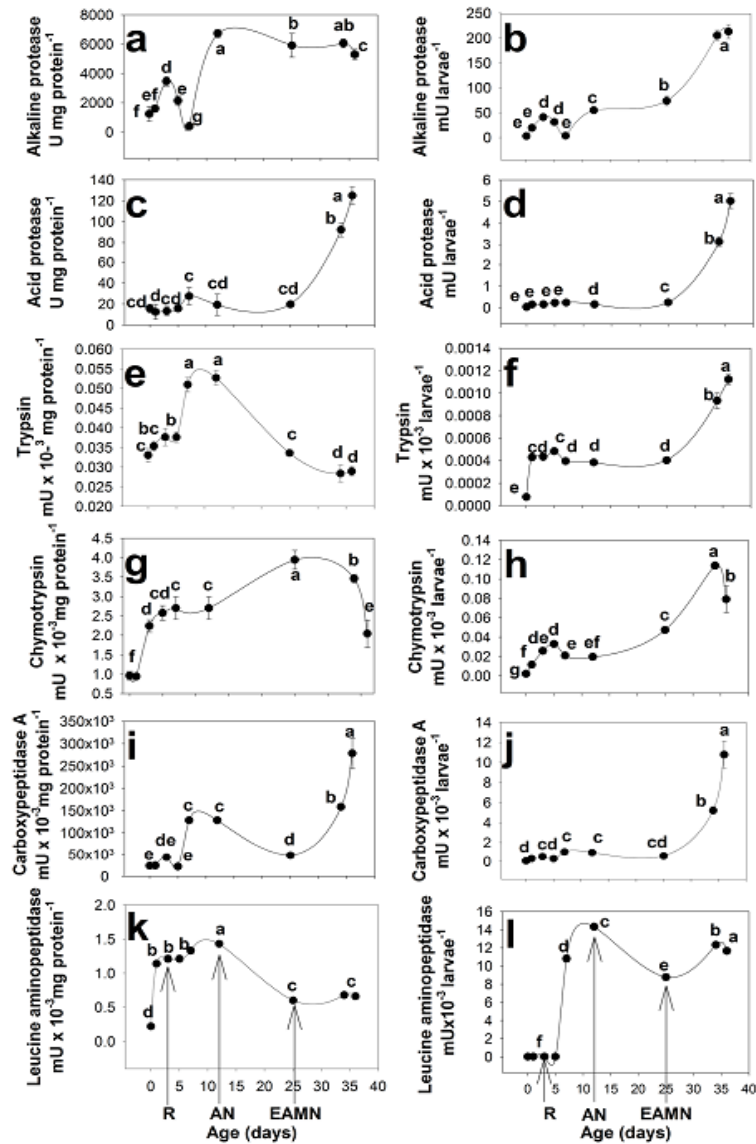


Figura 22. Actividad de enzimas digestivas durante el larvicultivo de *C. undecimalis* (promedio \pm DE, n = 3 pool de larvas). (a) Actividad específica de proteasas alcalinas, (b) Actividad individual de proteasas alcalinas, (c) Actividad específica de proteasas ácidas, (d) Actividad individual de proteasas ácidas, (e) Actividad específica de tripsina, (f) Actividad individual de tripsina, (g) Actividad específica de quimotripina, (h) Actividad

individual de quimotripsina, (i) Actividad específica de carboxipeptidasa A, (j) Actividad individual de carboxipeptidasa A, (k) Actividad específica de leucina aminopeptidasa, (l) Actividad individual de leucina aminopeptidasa. R: rotíferos, AN: nauplios de Artemia, EAMN: meta-nauplios de Artemia enriquecidos.

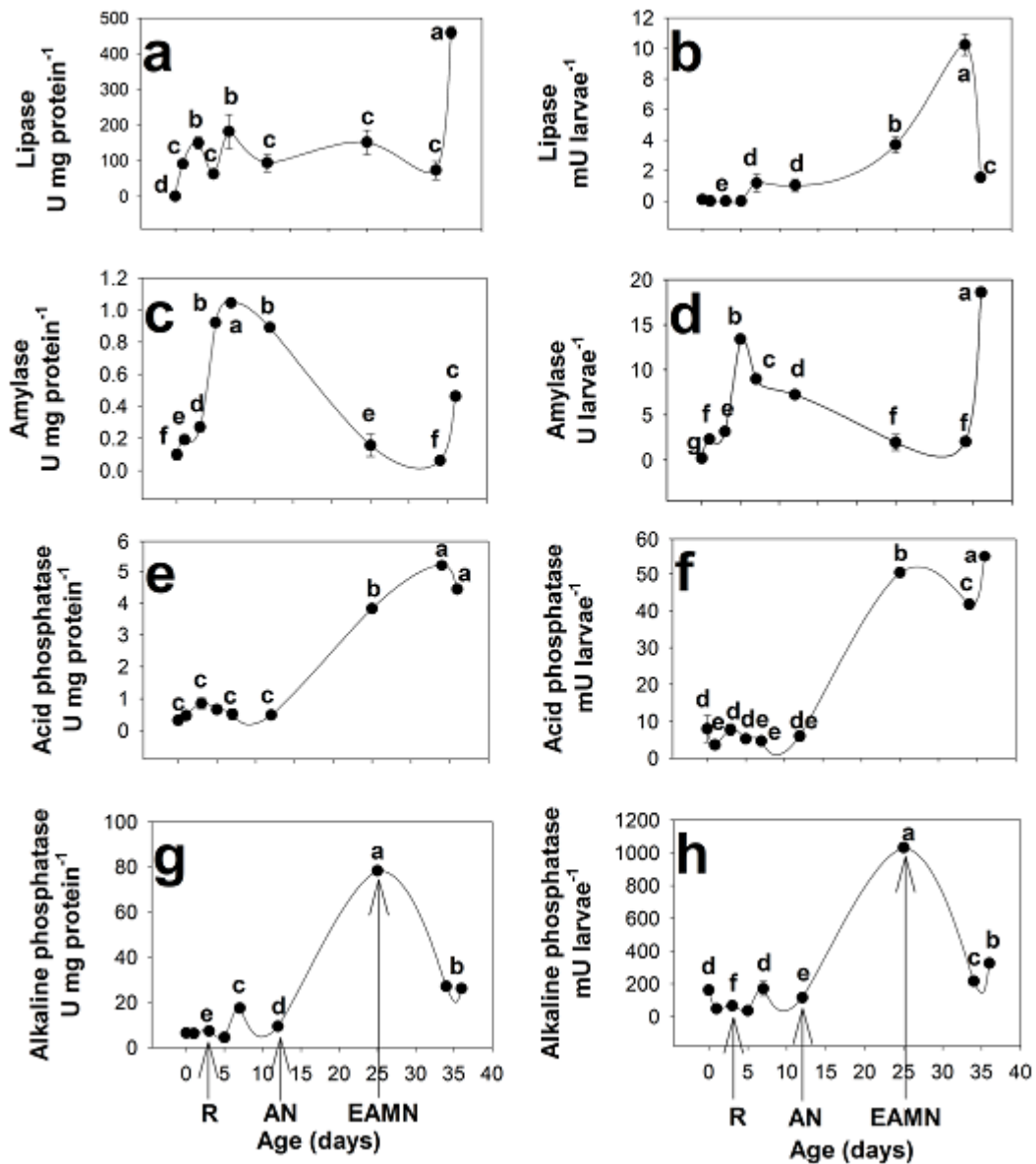


Figura 23. Actividad de enzimas digestivas durante el larvicultivo de *C. undecimalis* (promedio \pm DE, n = 3 pool de larvas). (a) Actividad específica de lipasa, (b) Actividad individual de lipasa, (c) Actividad específica de α -amilasa, (d) Actividad individual de α -amilasa, (e) Actividad específica de fosfatasa ácida, (f) Actividad individual de fosfatasa ácida, (g) Actividad específica de fosfatasa alcalina, (h) Actividad individual de fosfatasa alcalina. R: rotíferos, AN: nauplios de Artemia, EAMN: meta-nauplios de Artemia enriquecidos.

El zimograma de proteasas usando PAGE muestra dos diferentes tipos de bandas, la primera que tiene un Rf de 0.51 y la segunda banda con un Rf de 0.32, ambas fueron observadas a partir del día 35 DDE y se mantuvieron para el 36 DDE (Fig. 24a). En otro orden de ideas, el zimograma de proteasa alcalinas usando SDS-PAGE mostró una primer banda de actividad a partide del 25 dde que permaneció para los 34 y 36 dde, la cual mostró un peso molecular de 26.4 kDa; por otra parte, a partir del 36 dde se detectó una segunda con un peso molecular de 51.6 kDa (Fig. 24b).

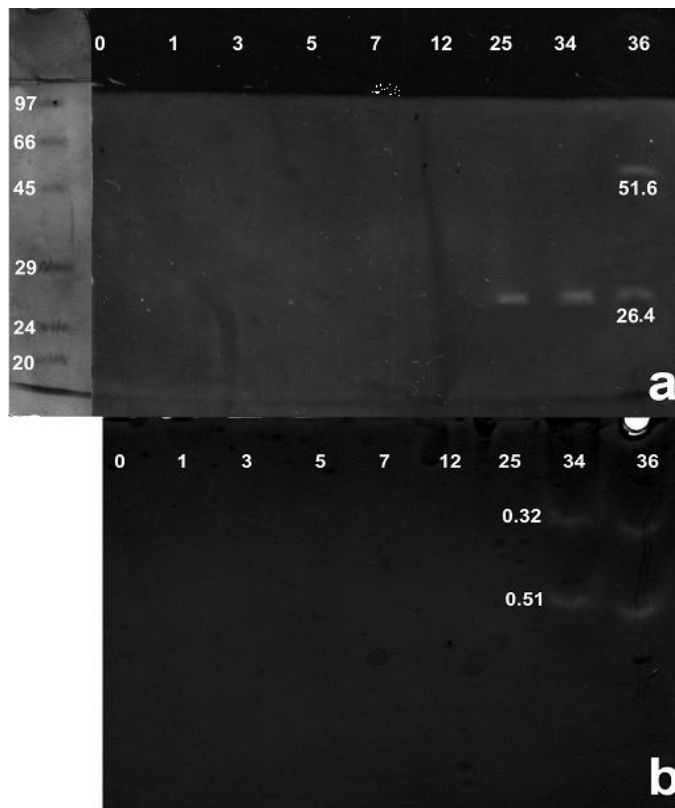


Figura 24. Zimograma de la actividad de proteasas ácidas (a) usando PAGE y alcalinas (b) usando SDS-PAGE durante el desarrollo de larvas de *C. undecimalis*. Los números superiores indican los días después de la eclosión. El primero peso indica el LWMM (kDa): 97) Fosforilasa; 66) Albúmina Bovina sérica; 45) Ovoalbumina; 29) Anhidrasa carbónica; 24) Tripsinógeno, 20) Inhibidor trípico de soya.

ETAPA 3) Estudio de la expresión de enzimas digestivas durante la ontogenia inicial del robalo blanco.

Materiales y métodos

Obtención de material biológico, condiciones de cultivo y crecimiento larval

En el presente estudio se utilizó como material biológico juveniles, huevos y larvas de *C. undecimalis* que fueron obtenidos de una serie de desoves artificiales consecutivos del lote de reproductores con los que cuenta el invernadero de peces marinos de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI-Sisal) de la Facultad de Ciencias de la UNAM ubicado en Sisal, Yucatán. La fertilización de los huevos se realizó siguiendo las instrucciones del manual de la Secretaría de Pesca “Desarrollo Científico y Tecnológico del Cultivo de robalo”, 1994. Los huevos fertilizados fueron transferidos a tanques circulares de 500 L de capacidad, conectados a un sistema de recirculación. El agua de los tanques fue mantenida a una temperatura constante de 28°C ±1, con una salinidad de 37%. Se proporcionó iluminación constante durante las dos primeras semanas de vida. La densidad inicial de las larvas fue de 50 a 80 larvas L⁻¹. Las larvas fueron alimentadas inicialmente con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) a 10 mL⁻¹ y microalgas (*Nannochloropsis* sp) durante los 12 días que comprendió el presente estudio.

Muestreo y procesamiento de tejidos y larvas

Un juvenil de robalo, fue sacrificado con ayuda de un shock térmico y se le realizó una disección para extraer el intestino, páncreas y estómago, los cuales fueron enjuagados con agua destilada, pesados y almacenados en tubos que contenían 1.0-1.5mL de RNALater (Ambion, Austin, TX, USA) y mantenidos de acuerdo a las instrucciones de esta sustancia.

Aproximadamente doscientas larvas por triplicado de *C. undecimalis* fueron muestreadas antes de la alimentación de la mañana para reducir la presencia de presas vivas en su

estómago. Se muestrearon los días 0, 1, 2, 3, 5 y 12 después de la fertilización para los experimentos de RT-PCR. Las larvas fueron enjuagadas con agua destilada y transferidas a tubos Eppendorf que contenían 1.0-1.5 mL de RNALater. Las muestras fueron almacenadas de acuerdo al protocolo del RNALater.

Caracterización de la secuencia de las enzimas digestivas

El ARN total de cada una de las porciones de intestino, estómago y páncreas que se tenían mantenidos en RNALater a -80°C fue aislado de acuerdo con el método de Valenzuela *et al.* 2005. Un microgramo de ARN total fue reversamente transcrito de acuerdo a las instrucciones del kit SuperScript III One-Step RT-PCR System con Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) utilizando los iniciadores específicos para los genes de: amilasa, aminopeptidasa, lipasa, pepsina y tripsina en un volumen total de 25 μl en un termociclador de tiempo real iCycler IQ5 Multicolor real-time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La secuencia de nucleótidos y la temperatura de alineamiento para cada enzima utilizada en este estudio esta detallada en la Tabla 13. Los iniciadores fueron diseñados a partir de la comparación de diferentes ARNm seleccionados y representan una región muy conservada de nucleótidos. Las condiciones de PCR para la RT-PCR de las enzimas fueron: 30 minutos a 55°C ; 30 ciclos de un minuto a 94°C , un minuto a la temperatura específica para cada enzima, dos minutos a 72°C ; diez minutos a 72°C . Los productos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa al 2%, utilizando una escalera de 100 pb como marcador (Promega, Madison, WI, USA). Las bandas observadas fueron cortadas del gel y purificadas utilizando el kit de Wizard SV gel y PCR clean-up system (Promega, Madison, WI, USA). Las bandas purificadas fueron enviadas a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM para ser secuenciadas.

Tabla 13. Secuencia de iniciadores y temperatura de alineamiento de RTAMI (ubiquitina), TAPSA (aminopeptidasa), TLPCA (lipasa), PEPNOT (pepsina) y TRINA (tripsina) utilizados en las reacciones de RT-PCR

Iniciador	Secuencia de nucleótidos (5'→3')	Temperatura de alineamiento (°C)
<i>RT-PCR RTAMI</i>		
RTAMI-F	TTCATATTGGCGTTAGTCCT	59.2
RTAMI-R	TTACAATTTGGAGTCCAAGAC	
<i>RT-PCR TAPSA</i>		
TAPSA-F	TACATCAGTAAAGCTGTCCG	60.7
TAPSA-R	AAGGCTCTCATGACCAAGAC	
<i>RT-PCR TLPCA</i>		
TLPCA-F	AGAAGAACCGCTACTACCAG	61
TLPCA-R	GATCTCATTCTCCTCCACCT	
<i>RT-PCR PEPNOT</i>		
PEPNOT-F	GAGTGCCTCCATAAGATTCC	59.3
PEPNOT-R	ACCAATGTACTTAGACTGGG	
<i>RT-PCR TRINA</i>		
TRINA-F	TCTCTTGTATTCGTTCTGCT	60
TRINA-R	AGAGGATGATGGAAGAAAGG	

Las diferentes secuencias de enzimas digestivas estudiadas en este trabajo fueron analizadas utilizando BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) para saber que tipo de enzima eran.

Experimentos de RT-PCR

El ARN total de las larvas de robalo blanco de los días 0, 1, 2, 3, 5 y 12 después de la fertilización que estaban mantenidas en RNALater será aislado y reversamente transcrito como se mencionó anteriormente. Los experimentos de RT-PCR se llevaran acabo para observar la expresión de ARNm durante el desarrollo del sistema digestivo. Iniciadores específicos para las secuencias de RTUbi (ubiquitina), RTLip (lipasa) y RTTri (Tripsina) fueron diseñados basándonos en las secuencias obtenidas en este estudio (Tabla 15). Se llevara acabo la amplificación de β -actina utilizando iniciadores específicos que fueron elegidos a partir de la comparación de diferentes ARNm y representan una región muy conservada de nucleótidos, para confirmar el nivel de expresión de un gen doméstico y proveer un control interno (Tabla 14).

Tabla 14. Secuencia de iniciadores y temperatura de alineamiento de RTUbi (Ubiquitina), RTLip (Lipasa), y RTTri (Tripsina) que serán utilizados en las reacciones de RT-PCR de larvas de robalo

Iniciador	Secuencia de nucleótidos (5'→3')	Temperatura de alineamiento (°C)
<i>RT-PCR Ubi</i>		
RTUbi5'	GCAACACACCTGACCTGAGG	52.6
RTUbi3'	CGTCCTGCTGATTGTATCCC	51.9
<i>RT-PCR Lip</i>		
RTLip5'	TGATGCCTGCAATCACGTCC	56.6
RTLip3'	TTAGCCACTGGGCCATCAGG	57.2
<i>RT-PCR Tri</i>		
RTTri5'	GCTCCACTGCTGACAGGAAC	52.0
RTTri3'	CAGAGTCACCCTGGCAAGAG	52.1
<i>RT-PCR Act</i>		

RTAct5'	CGCGACCTCACAGACTACCT	50.75
RTAct3'	GATTCCGCAGGACTCCATAC	51.0

Resultados

Amplificación por PCR

La amplificación por PCR utilizando los iniciadores de la Tabla 15 dio como resultado productos de aproximadamente 700, 350 y 200 pb para RTAMI1 (amilasa 1), RTAMI2 (amilasa 2) y RTAMI3 (amilasa 3) en intestino, 1200 para TLPCA (lipasa) en el páncreas y 800 pb para TRINA (tripsina) en el intestino (Fig. 25). En el caso de TAPSA (aminopeptidasa) y PEPNOT (pepsina) no se observó nada en los geles de agarosa.

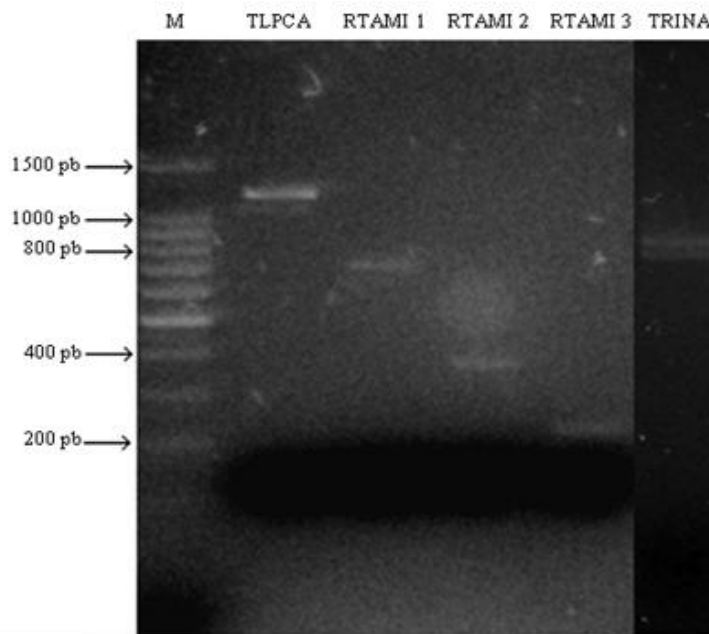


Figura 25. Productos amplificados de Lipasa (TLPCA), Amilasa 1 (RTAMI1), Amilasa 2 (RTAMI2), Amilasa 3 (RTAMI3) y Tripsina (TRINA) de *C. undecimalis*. Marcador (M)

Análisis de la secuenciación

De los 5 productos de PCR con sus respectivos iniciadores mandados a secuenciar solo de tres de ellos se obtuvieron productos de secuenciación (Tabla 15). Al hacer el análisis de las secuencias en el BLAST se observó que en el caso de los productos de secuenciación de RTAMI3, la secuencia tiene una similitud del 61% con un clon de la hidrolasa ubiquitina carboxiterminal 2 del salmón común (*Salmo salar*). En el caso de la alineación de las secuencias obtenidas para TLPCA-F y TLPCA-R se encontró una similitud del 90% con la lipasa pancreática parcial del pargo japonés (*Pagrus major*, Temminck & Schlegel). En la alineación de la secuencia de TRINAR se encontró una identidad máxima (95%) con el tripsinógeno del pez globo (*Takifugu rubripes*, Temminck & Schlegel). En la Tabla 15 se pueden observar con más detalle las similitudes encontradas para RTAMI3, TLPCA y TRINAR en el BLAST. Así mismo se obtuvo el dendograma de TRINAR con otras especies resultado del BLAST (Fig. 26).

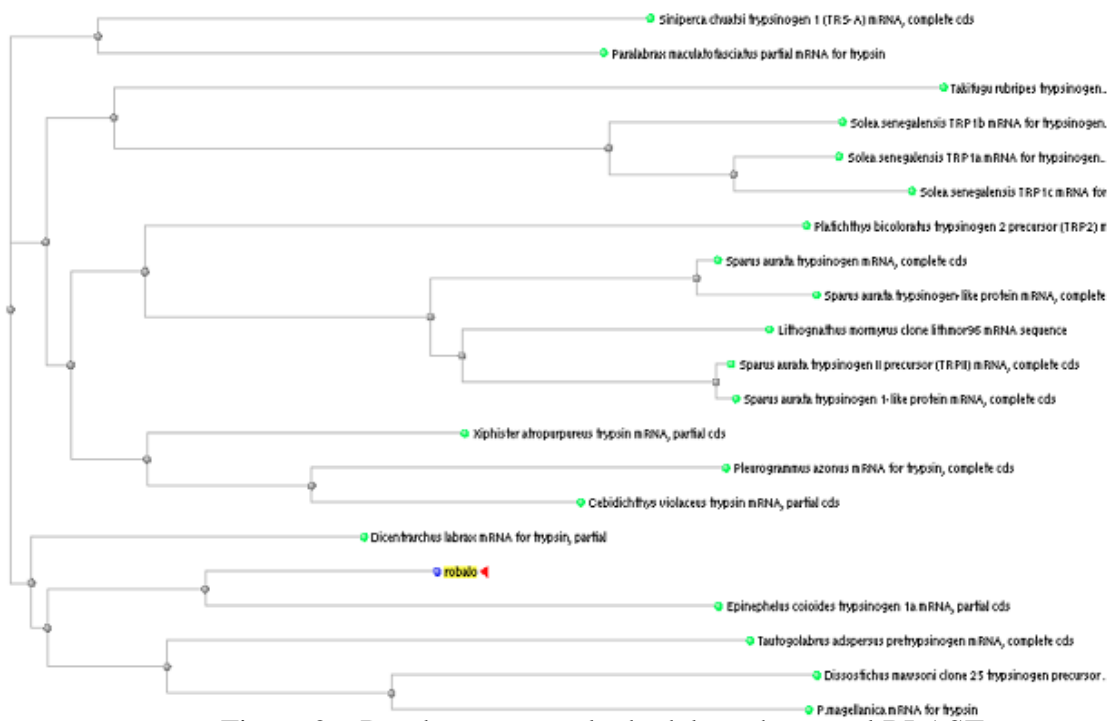


Figura 26. Dendrograma resultado del mapeo en el BLAST

Tabla 15. Resultado del alineamiento de la secuencias de RTAMI3 (Ubiquitina), TLPCA (Lipasa) y TRINA-R (Tripsina) en el BLAST

Organismo	Valor de e	Porcentaje de similitud
RTAMI3		
<i>Salmo salar</i> ARNm para el clon ssal-rgf-520-156 de la hidrolasa ubiquitina carboxiterminal 2, cds pseudogene	5e-27	61
<i>Danio rerio</i> ARNm similar para ubiquitina específica de peptidasa 2	1e-16	59
<i>Oryzias melastigma</i> ARNm para ubiquitina específica de peptidasa 2, cds parcial	6e-13	33
TLPCA		
<i>Pagrus major</i> ARNm para lipasa pancreática, cds parcial	0.0	90
<i>Mus musculus</i> ARNm para lipasa pancreática relacionada a proteína 1	1e-23	56
<i>Gallus gallus</i> ARNm para lipasa pancreática, cds parcial	1e-25	45
TRINA-R		
<i>Takifugu rubripes</i> ARNm para tripsinógeno, cds parcial	0.0	95
<i>Siniperca chuatsi</i> ARNm para tripsinógeno 1, cds completo	0.0	94
<i>Solea senegalensis</i> ARNm para tripsinógeno 1b, cds completo	0.0	94
<i>Pleurogrammus azonus</i> ARNm para tripsina, cds completo	0.0	94
<i>Solea senegalensis</i> ARNm para tripsinógeno 1c, cds completo	0.0	94
<i>Sparus aurata</i> ARNm para tripsinógeno, cds completo	0.0	94
<i>Paralichthys olivaceus</i> ARNm para tripsinógeno 2, cds parcial	0.0	94
<i>Sparus aurata</i> ARNm para precursor tripsinógeno II, cds completo	0.0	94
<i>Dissostichus mawsoni</i> ARNm del clon 25 para el precursor tripsinógeno, cds completo	0.0	93
<i>Solea senegalensis</i> ARNm para tripsinógeno 1ª, cds completo	0.0	93
<i>Tautoglabrus adspersus</i> ARNm para retrijsinógeno, cds complete	0.0	93
<i>P. magellanica</i> ARNm para tripsina	0.0	93
<i>Paralichthys olivaceus</i> ARNm para tripsinógeno 1, cds completo	0.0	92
<i>Epinephelus coioides</i> ARNm para tripsinógeno 1a, cds parcial	0.0	91

Discusión

Caracterización enzimática de proteasas

Desde hace varios años se han venido estudiando diversas enzimas digestivas en peces como la carpa (*Cyprinus carpio*, Linneaus) en que las proteasas alcalinas, alcanzaron una actividad óptima a pH de 10 siendo éste un pez agastro, mientras que en el siluro *S. glanis*

se observó, que la acción de la pepsina se realiza a un pH ácido (1,8-2,3) en la sección estomacal, siendo similar al encontrado en *C. undecimalis*. Existen diferencias en el proceso de caracterización de proteasas digestivas, este se realiza mediante el extracto crudo de proteasas, el cual es obtenido a través del homogenizado de los tejidos estomacales e intestinales después de eliminar su contenido visceral (Dimes *et al.*, 1994a y b; Alarcón *et al.*, 1999) o con el contenido visceral (Hofer & Schiermer, 1981; Álvarez-González, 2003; Castillo-Yañez *et al.*, 2004). Algunos investigadores liberan el extracto enzimático homogenizando el tracto digestivo completo (Castillo-Yañez *et al.*, 2004; Gérman *et al.*, 2004) o bien separándolo por regiones (Hofer & Schiermer, 1981; Alarcón *et al.*, 1999; Natalia *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006), otros autores optan por dejar al pez sin alimentación por un lapso de tiempo antes de ser sacrificados (Alarcón *et al.*, 2001a; Chong *et al.*, 2002a; Álvarez-González, 2003; Natalia *et al.*, 2004; Furné *et al.*, 2005) mientras algunos extraen directamente el tracto digestivo sin dejar reposar un tiempo después de la alimentación (Hidalgo *et al.*, 1999).

Los especímenes utilizados en este tipo de estudios, provienen de su hábitat natural (Hofer & Schiermer, 1981; Díaz-López *et al.*, 1998; Hidalgo *et al.*, 1999; Castillo-Yañez *et al.*, 2004) o de centros de cultivos, en donde son alimentados con dietas comerciales (Alarcón *et al.*, 1999; Alarcón *et al.*, 2001a; Natalia *et al.*, 2004; Bezerra *et al.*, 2005; Furné *et al.*, 2005). Estas diferencias hacen difícil comparar cuantitativa y cualitativamente las actividades enzimáticas de las diferentes especies de peces estudiadas (Alarcón *et al.*, 1998; Hidalgo *et al.*, 1999). Para el cultivo de peces, esta información puede ser útil en la selección de los ingredientes a emplearse en la formulación de alimentos, adicionando enzimas digestivas de diversos organismos (Álvarez-González, 2003).

pH óptimo y estabilidad de proteasas ácidas

El pH óptimo de las proteasas digestivas de los peces (ácidas o alcalinas) es similar con las condiciones internas del tracto digestivo del robalo blanco. Wang *et al.* (2006), mencionan que los peces secretan ácido hidroclicórico en el estómago y carbonatos en el intestino, como un medio de adaptación a las necesidades digestivas.

En robalo blanco, la digestión de la proteína se lleva a cabo tanto en la región ácida del estómago, como en la región alcalina del intestino, lo cual esta sustentado por varios estudios realizados sobre proteasas digestivas de otros peces, que también han mostrado una alta actividad en estas dos regiones del tracto digestivo de *S. glanis*, *Sebastes mentella* (Travis), *S. aurata*, *S. maximus*, *D. dentex*, *B. orbignyianus*, *S. aequifasciata*, *P. maculatofasciatus*, *S. formosus*, *Cebidichthys violaceus* (Girard), *Xiphister mucous* (Girard), *X. Atropurpureus* (Kittlitz), *Anoplarchus purpurescens* (Gill), *Sardinops sagax caerulea* (Girard), *Acipenser naccarii* (Bonaparte), *O. mykiss*, *S. senegalensis*, *S. maximus* y *T. orientali* (Jónás *et al.*, 1983; Munilla-Morán y Saborido-Rey, 1996; Alarcón *et al.*, 1998; Hidalgo *et al.*, 1999; Chong *et al.*, 2002a; García-Carreño *et al.*, 2002; Álvarez-González, 2003; Castillo-Yañez *et al.*, 2004; Donovan *et al.*, 2004; Natalia *et al.*, 2004; Furné *et al.*, 2005; Saénz *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Matus *et al.*, 2007).

Este estudio muestra que el robalo posee una estructura de estómago definida, la cual secreta proteasas ácidas que requieren un óptimo de pH 2 para su máxima actividad proteolítica. Este mismo valor de pH ha sido reportado para otras especies de peces con estómago (Tabla 16). Algunos autores comentan que la actividad de las proteasas ácidas mejora hasta que el pH del estómago ha disminuido; lo que se considera como una respuesta adaptativa que permite a la pepsina realizar la digestión completa de las proteínas, esto debido a que se ha detectado la presencia de pepsina en el intestino de algunos peces, como los encontrados por Munilla-Morán & Saborido-Rey (1996), en la dorada y el turbot,

enzima que lógicamente no se produce en ese tipo de tejidos, pero que puede seguir hidrolizando la proteína en el intestino como una posible adaptación de organismos poiquiloterms, que denotan respuestas fisiológicas más lentas que los mamíferos, hasta que aumenta el pH e inicia la acción de proteasas alcalinas (Munilla-Morán y Saborido-Rey, 1996; Álvarez-González, 2003).

La pepsina ha sido identificada como la proteasa ácida principal en el estómago del pez y se interpreta como la primera enzima proteolítica necesaria para romper las grandes cadenas polipeptídicas (Tengjaroenkul *et al.*, 2000). De esta manera, las proteasas gástricas mostraron ser estables a los diferentes pH, presentando una pequeña caída a medida que este se hace más alcalino, sin embargo se presentó un incremento en la actividad después de los 60 minutos de incubación, desestabilizándose a partir de pH 10. Según Jónás *et al.* (1983) y Alarcón *et al.* (1998). La capacidad hidrolítica de estas enzimas se mantiene por algún tiempo, aún con el incremento de pH.

Resultados similares divulgó Wang *et al.* (2006), en *S. maximus*, mostrando inestabilidad a pH 8. Es así que Castillo-Yañez *et al.* (2004), indican que en especies de aguas calientes, las proteasas gástricas son estables a pH neutro.

Tabla 16. Valores de pH's óptimos para las especies estudiadas.

Especie	pH óptimo Acido	pH óptimo Alcalino	Autor
<i>Silurus glanis</i>	1,8-2,3	8,0	Jónás <i>et al.</i> , 1983
<i>Clarias gariepinus</i>	3	8,0	Uys & Hecht, 1987
<i>Sparus aurata</i>	2-2,5	10	Alarcón <i>et al.</i> , 1998
<i>Dentex dentex</i>	2	10	Alarcón <i>et al.</i> , 1998
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1,5	8,5-9	Hidalgo <i>et al.</i> , 1999
<i>Sparus aurata</i>	1,5	10	Hidalgo <i>et al.</i> , 1999
<i>Carassius auratus</i>	3	8,5	Hidalgo <i>et al.</i> , 1999
<i>Tinca tinca</i>	3	10	Hidalgo <i>et al.</i> , 1999
<i>Symphysodon aequifasciata</i>	2,0	7,5-9; 11,5-12,5	Chong <i>et al.</i> , 2002a García-Carreño <i>et al.</i> , 2002
<i>Brycon orbignyanus</i>	2,5	10	2002
<i>Thunnus thynnus</i>	2 y 3,5	10 y 12	Essed <i>et al.</i> , 2002
<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	2	6-8 y 10	Alvarez-González, 2003
<i>Scleropages formosus</i>	1.5-2	9,5-10	Natalia <i>et al.</i> , 2004
<i>Acipenser naccarii</i>	3	9	Furné <i>et al.</i> , 2005
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	4,5	8,5	Furné <i>et al.</i> , 2005
<i>Solea senegalensis</i>	2	9-10	Sáenz <i>et al.</i> , 2005
<i>Diplodus puntazo</i>	1-3	6-11	Tramati <i>et al.</i> , 2005
<i>Scophthalmus maximus L.</i>	2	8	Wang <i>et al.</i> , 2006
<i>Centropomus undecimalis</i>	2	7 y 11	Presente estudio

pH óptimo y estabilidad de proteasas alcalinas

Las proteasas alcalinas presentaron dos picos de alta actividad proteolítica a pH's 7 y 11 respectivamente, datos similares fueron reportados para, *Symphysodon aequifasciata*, *T. thynnus* y *P. maculatofasciatus* (Chong *et al.*, 2002; Essed *et al.*, 2002; Álvarez-González, 2003), (Tabla 7), sugiriendo la presencia de al menos dos grupos principales de proteasas alcalinas, donde la actividad máxima mostrada a pH 7 en ensayos de caseína, probablemente sea debido a las altas actividades de tripsina, ya que varios estudios han mostrado que el pH óptimo para esta enzima va en un rango de 7-9 (Das & Tripathi, 1991),

Alvarez, A. et al. 2010. Avances en la fisiología digestiva del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) en Tabasco, México. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 98-231.

siendo la quimotripsina la responsable del segundo pico de actividad a pH 11, ya que esta actúa con pH de 9-11.

Las proteasas alcalinas son estables a pH alcalino, mostrando mayor actividad a pH 4-10 durante los primeros 120 minutos de incubación, disminuyendo su actividad a los 180 minutos, desestabilizándose en los primeros 60 minutos a pH extremos logrando ser estables a los diferentes pH's, a partir de los 120 minutos de incubación, alcanzando la máxima actividad a pH 8 superior al 100% de la actividad residual. Esto mismo fue reportado por Álvarez-González (2003), en *Paralabrax maculatofasciatus*, donde las proteasas alcalinas mostraron estabilidad a los pH's 5, 7, 9 y 12, siendo a pH 7 donde alcanzó la máxima actividad a los 60 minutos, por encima del 100% de la actividad residual.

Temperatura óptima y estabilidad de proteasas ácidas

En la mayoría de las especies estudiadas, las proteasas ácidas tienden a presentar valores óptimos de temperatura, 10°C por debajo de los mostrados por las proteasas alcalinas (Tabla 17). Sin embargo esta relación no siempre se cumple ya que en *S. senegalensis*, la diferencia entre las temperaturas óptimas fueron de solo 5°C (Saénz *et al.*, 2005), y el *Clarias gariepinus* (Burchel) las temperaturas óptimas estuvieron intercaladas con 30°C para la tripsina, 35°C para la pepsina y 40°C para la quimotripsina (Uys & Hecht, 1987). Algunos autores indican que la pepsina se desnaturaliza después de los 55°C (Alarcón *et al.*, 1998; Moyano *et al.*, 1998; Castillo-Yañez *et al.*, 2004). Sin embargo la pepsina de robalo mostró una temperatura óptima de 75°C, aunque se debe recordar que este solamente es un parámetro operacional que no refleja la acción fisiológica de la pepsina a ciertas temperaturas, y de la misma manera que las proteasas alcalinas, el tiempo de retención del alimento en el estómago, aún a temperaturas menores, favorecerá la hidrólisis de proteínas dietarias (Álvarez-González, 2003). Korostelev *et al.* (2005), menciona que las enzimas

digestivas de los peces se adaptan a las condiciones de funcionamiento, asegurando así la función óptima digestiva. La tolerancia a altas temperaturas de la pepsina del robalo, puede ser una adaptación biológica de la enzima, debido a que este pez habita en aguas cálidas con rangos de 15 a 35°C (Tucker Jr., 2003).

En el robalo blanco la actividad de la pepsina fue mayor a la actividad residual, mostrada por las proteasas alcalinas. Resultados similares fueron reportados para el *S. glanis*, *D. dentex*, *S. aurata*, *B. orbignyanus*, *S. sagax caerulea* y *S. senegalensis* (Jónás *et al.*, 1983; Moyano *et al.*, 1998, García-Carreño *et al.*, 2002; Castillo-Yañez *et al.*, 2004; Saénz *et al.*, 2005). Algunos investigadores indican que las especies de peces con paredes estomacales delgadas, requieren de un medio sumamente ácido, que permita la digestión bioquímica de la proteína, en contraste con aquellas con estómagos musculares, que se apoyan más en la falla mecánica de los polipéptidos, donde la secreción de pepsina es menor (Uys & Hecht, 1987; Chong *et al.*, 2002a; Wang *et al.*, 2006).

A los 90 minutos de exposición las proteasas ácidas presentaron mayor actividad a temperaturas de 25, 35 y 45°C, cuyos valores estuvieron por encima del 100% de actividad residual, mostrando ser estables a los diferentes cambios de temperatura. La pepsina presenta un incremento de actividad en los primeros 60 minutos de exposición a 65°C, pero ese incremento se reduce a partir de ese momento, prediciendo una pérdida de actividad después de los 90 minutos de exposición. Castillo-Yañez *et al.* (2004), obtuvo resultados similares para *S. sagax caerulea*, mostrando que a medida que aumentaba la temperatura, la actividad de las proteasas gástricas disminuía al incrementar el tiempo de incubación.

Temperatura óptima y estabilidad de proteasas alcalinas

Los rangos de temperaturas óptimas alcalinas para las especies de peces estudiadas, van de 30 a 60°C (Tabla 17). Las proteasas alcalinas de robalo presentaron actividad proteolítica

máxima a los 65°C, 5°C mayor a los reportados para *B. orbignyana* y *T. thynnus* (Essed *et al.*, 2002; García-Carreño *et al.*, 2002), por lo que las proteasas alcalinas de robalo blanco mostraron ser estables a rangos de temperatura de 45-65°C, presentando actividades máximas a temperaturas de 35 y 45°C a los 90 minutos de incubación. En *B. orbignyana* las proteasas alcalinas fueron estables a los 50°C (García-Carreño *et al.*, 2002), mientras Álvarez-González (2003), reporta estabilidad en las proteasas alcalinas de *P. maculatofasciatus* a temperaturas de 45 y 55°C, obteniendo altas estabilidades, con actividades relativas hasta de 160% a los 90 minutos de preincubación. En este estudio las proteasas ácidas mostraron ser mas estables que las proteasa alcalinas, sin embargo Essed *et al.* (2002), encontraron mayor estabilidad en las proteasas alcalinas de *T. thynnus*, en comparación con las proteasas ácidas.

Tabla 17. Temperaturas óptimas para proteasas de peces.

Especie	Temperatura óptima		Autor
	ácida	óptima alcalina	
<i>Silurus glanis</i>	50	55	Jónás <i>et al.</i> , 1983
<i>Clarias gariepinus</i>	35	30-40	Uys & Hecht, 1987
<i>Sparus aurata</i>	45	55	Alarcón <i>et al.</i> , 1998
<i>Dentex dentex</i>	40	55	Alarcón <i>et al.</i> , 1998
<i>Thunnus thynnus</i>	50	60	Essed <i>et al.</i> , 2002
<i>Brycon orbignyana</i>	50	60	García-Carreño <i>et al.</i> , 2002
<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	45	55	Alvarez-González, 2003
<i>Solea senegalensis</i>	35	40	Sáenz <i>et al.</i> , 2005
<i>Centropomus undecimalis</i>	75	65	Presente estudio

Caracterización mediante inhibidores y uso de SDS-PAGE

La caracterización de las proteasas digestivas se logró mediante el empleo de inhibidores específicos. Para la caracterización de proteasas ácidas se utilizó como sustrato la

Alvarez, A. et al. 2010. Avances en la fisiología digestiva del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) en Tabasco, México. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 98-231.

hemoglobina; la actividad de las proteasas ácidas se vio reducida en un 86% al ser expuesta al Pepstatin A, mostrando mayor resistencia a Pepstatin A con respecto a los datos reportados para otras (Tabla 18). En los resultados en ensayos con hemoglobina y PAGE, la banda activa de pepsina porcina y del robalo fueron inhibidas completamente por la presencia de Pepstatin A, un inhibidor exclusivo para proteasas tipo pepsina. Resultados similares reportaron para *S. aurata*, *D. dentex*, *B. orbignyanus* y *P. maculatofasciatus* (Alarcón *et al.*, 1998; Díaz-López *et al.*, 1998; García-Carreño *et al.*, 2002; Álvarez-González, 2003).

Tabla 18. Efecto de los inhibidores sobre proteasas de peces.

Especie	PMSF	Ovo	Fen	SBTI	TLCK	TPCK	EDTA	Pepstatin A	Autor
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	70		26	50	42		20		Dimes <i>et al.</i> , 1994a
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	44		28	32	30		11		Dimes <i>et al.</i> , 1994a
<i>Sparus aurata</i>	24			49	17	20	34	99	Alarcon <i>et al.</i> , 1998
<i>Dentex dentex</i>	45			41	6	26	30	99	Alarcon <i>et al.</i> , 1998
<i>Brycon orbignyanus</i>	26			85	52	3	29	90	García-Carreño <i>et al.</i> , 2002
<i>Symphysodon aequifasciata</i>	59			70	46	40	46		Chong <i>et al.</i> , 2002a
<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	20	5	20	20			40	95	Alvares-Gonzalez, 2003
<i>Scleropages formosus</i>	77				72	58	30	96	Natalia <i>et al.</i> , 2004
<i>Labeo rohita</i>	57			58,7	41	28	2,2		Chakrabarti <i>et al.</i> , 2006a
<i>Scophthalmus maximus L.</i>								100	Wang <i>et al.</i> , 2006
<i>Centropomus undecimalis</i>	60	59	85	41	68	17	40.5	86	Presente estudio

Alvarez, A. et al. 2010. Avances en la fisiología digestiva del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) en Tabasco, México. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 98-231.

La disminución significativa de las actividades totales de las proteasas digestivas de robalo, se vieron afectadas en un 60% por la presencia de PMSF. Efectos similares fueron reportados para *O. kisutch*, *S. aequifasciata*, *S. formosus* y *L. rohita* (Tabla 9). La inhibición de proteasas alcalinas en un 59% por la Ovoalbúmina fue alta en comparación al 5% reportado por Álvarez-González (2003), para *P. maculatofasciatus*. PMSF y Ovoalbumina son inhibidores exclusivos de proteasas tipo serina (Jonás *et al.*, 1983; Dimes *et al.*, 1994; Munilla-Morán & Saborido-Rey, 1996; Chong *et al.*, 2002a; García-Carreño *et al.*, 2002; Chakrabarti *et al.*, 2006 a y b), lo cual indica la presencia de serina proteasas en el intestino de robalo blanco.

Por su parte, García-Carreño *et al.* (2002), estimaron que en el intestino de *B. orbignyanus*, la tripsina contribuye en un 30% de la actividad total de la digestión de la proteína. Jonás *et al.* (1983) divulgaron que la tripsina generalmente presenta actividades mayores en peces carnívoros en comparación a especies omnívoras y herbívoras, donde las actividades de quimotripsina son mayores, lo cual también es resaltado por Hofer & Schiermer (1981). En este estudio la reducción de la actividad proteolítica por SBT1 fue del 41%, mientras Dimes *et al.* (1994a), observaron una reducción del 50% en la actividad proteolítica alcalina de trucha arcoíris con SBT1, y Alarcón *et al.* (1998), reportaron una inhibición de proteasas alcalinas en un 49 y 41% en *S. aurata* y *D. dentex*, respectivamente. La reducción de la actividad enzimática alcalina por la presencia de TLCK fue de 68%, valores mayores a los mostrados por *O. kisutch*, *S. aequifasciata*, *B. orbignyanus*, *S. formosus* y *L. rohita*.

El TPCK un inhibidor exclusivo de quimotripsina, inhibió la actividad enzimática en un 17%, valores similares fueron reportados por Alarcón *et al.* (1998) y Chakrabarti *et al.* (2006a) en *S. aurata*, *D. dentex* y *L. rohita*. El resultado conjunto de la inhibición con SBTI y TLCK en ensayos con caseína como sustrato y el gel SDS-PAGE electroforesis, indican la importancia de tripsina y quimotripsina para llevar a cabo la digestión en el robalo.

Los porcentajes de inhibición con SBT1, TLCK y TPCK, nos indica que la actividad de tripsina es mayor a la actividad de quimotripsina en el intestino de robalo, como resalta Jónás *et al.* (1983) en *S. glanis*, *Hipophthalmichthys molitrix* (Valenciennes) y *C. carpio*. Sin embargo, ambos tipos de proteasas juegan un rol de colaboración importante en la digestión de la proteína (Chong *et al.*, 2002a). La tripsina hidroliza los enlaces peptídicos extremos de los péptidos de lisina y arginina, mientras la quimotripsina hidroliza enlaces peptídicos de aminoácidos hidrófobos como tirosina, fenilalanina y triptofano (Neurath, 1989). El EDTA inhibió en un 40,5% la actividad enzimática, valor cercano a los publicados para disco (46%) y cabrilla arenera (40%), (Chong *et al.*, 2002a; Álvarez-González, 2003). En el caso de la 1-10 Fenantrolina el cual es un quelante que actúa sobre las metalproteasas, presentó un mayor porcentaje de inhibición con un 85%, valor bastante alto si se toman en cuenta los reportados por Dimes *et al.* (1994a), para trucha y salmón y por Álvarez-González (2003), para cabrilla arenera, que fluctuaron entre 20-30 % de inhibición enzimática. Asimismo, el efecto inhibitorio del EDTA también sugiere la presencia de metalproteasas en el intestino de robalo. La importancia de las metalproteasas en los peces ha sido reportada por Chong *et al.* (2002a) al ser las enzimas liberadoras de aminoácidos que son directamente absorbidos por los enterocitos, especialmente de aquellos aminoácidos considerados esenciales. La presencia de serina proteasas como la tripsina y quimotripsina, así como de metalproteasas como la aminopeptidasa y la carboxipeptidasas, sugieren un modelo de digestión proteínica similar a la de otros peces con hidrólisis de endoproteasas seguidos por hidrólisis de exoproteasas (Chong *et al.*, 2002a).

Las diferencias de sensibilidad de las proteasas digestivas de robalo blanco hacia los inhibidores de acuerdo a los datos reportados para otras especies (Tabla 9), también fue observado por Munilla-Morán & Saborido-Rey (1996), en *S. mentella*, *S. aurata* y *S. maximus*. Alencar *et al.* (2003), reportaron el TPCK no inhibió la actividad de la quimotripsina en *P. maculatus*, mencionando que puede deberse a que las estructuras

enzimáticas varían según las especies. Las tres bandas activas mostradas en los análisis con SDS-PAGE en intestino de robalo blanco, indican la presencia de proteasas digestivas alcalinas tipo tripsina, quimotripsina y metalproteasas, con una mayor actividad de tripsina, debido a su condición carnívora.

Los frentes de corrimiento (Rf), encontrados en este estudio fueron similares a pesos moleculares entre 25 y 35 kDa. Rivera (2003), reporta tripsina con peso molecular de 26,1 kDa en *Lutjanus vivanus* (Cuvier), mientras Rodríguez (2004), encuentra tripsina con 24 kDa. en *Haemulon plumierii* (Lacepède). Souza *et al.* (2007), reportaron Tripsina con 24 kDa. en *Pseudupeneus maculatus*. La banda de tripsina fue afectada por TLCK, el SBTI no afectó a la tripsina pero inhibió la banda perteneciente a la quimotripsina, mostrando que los inhibidores de tripsina afectan igualmente a la actividad de la quimotripsina (Figura 19), similar a lo reportado por Alarcón *et al.* (2001), donde los inhibidores de soya inhibieron bandas con pesos moleculares de 20 y 30 kDa, en *Lutjanus argentiventris* (Peters) y *L. novemfasciatus* (Gill). Así mismo Lazo *et al.* (2007), reportaron tripsina con pesos moleculares de 23 y 68 kDa y quimotripsina con 25 kDa. en *Sciaenops ocellatus* (Linnaeus), mientras Natalia *et al.* (2004), encontraron tripsina con y quimotripsina con pesos moleculares de 32,3 kDa. y 42,1 kDa respectivamente en *S. formosus*.

El Rf mayor encontrado corresponde a las metalproteasas las cuales tienen pesos moleculares entre 45 a 97 kDa, según lo reportado para *S. formosus*, (Natalia *et al.*, 2004). El EDTA inhibió completamente el 100% de las bandas activas, similar a lo reportado por Alarcón *et al.* (1998), para *D. dentex* y *S. aurata*, lo cual revela la dependencia de estas enzimas sobre cationes divalentes.

Estudios de digestibilidad *in vitro* de ingredientes

La necesidad de conocer los aspectos fisiológicos de la actividad digestiva del pez, para elegir los mejores ingredientes que pueden ser utilizados en la formulación de las dietas alimenticias para una especie en cultivo, requiere del estudio de la actividad enzimática y la capacidad que estas enzimas poseen para degradar las cadenas polipeptídicas de las diferentes fuentes proteínicas, contenidas en el alimento así como estudiar detalladamente el proceso de la hidrólisis de las proteínas durante la digestión. Las técnicas de digestibilidad *in Vitro*, pueden ser aplicadas no sólo para obtener información sobre la capacidad enzimática que tiene cada especie para degradar diferentes tipos de proteínas, sino también para realizar un seguimiento detallado de la hidrólisis de las distintas fracciones proteínicas durante el proceso de digestión (Oña *et al.*, 2003). La mayoría de los estudios aplicados a la digestibilidad *in vitro*, para el mejoramiento de las dietas alimenticias, mediante la utilización del pH STAT, están siendo aplicados a especies acuáticas, por representar la forma más viable para generar conocimientos sobre los aspectos fisiológicos de organismos de importancia comercial donde los resultados obtenidos han sido determinantes al momento de formular las dietas alimenticias, economizando así los costos de producción.

En el presente estudio se utilizó como fuente proteínica estándar para la fase ácida la hemoglobina y para la fase alcalina la caseína, cuyos valores en suma fueron tomados como el 100% de la hidrólisis total, para todas las harinas utilizadas en el ensayo, debido a que contienen aproximadamente el 98% de proteína en su composición, presentado un alto grado de hidrólisis (Dimes *et al.*, 1994b).

La mayoría de las harinas mostraron un 75% de hidrólisis final en los primeros 10 minutos de reacción, datos similares a los publicados por Oña *et al.* (2003), los cuales reportan un 60% de hidrólisis final en el mismo tiempo de reacción, para harinas de soya, maíz,

guisante y pescado, expuestas a enzimas digestivas ácidas de *D. dentex*, *P. pagrus* y *Dentex X Pagrus*. En este estudio las harinas de pescado de la empresa del Pedregal y la harina de sangre de res, mostraron valores de GH por encima de los valores de la hemoglobina. Oña *et al.* (2003), reportan altos valores de GH para la harina de pescado en *Dentex X Pagrus*, similar a lo reportado por Alvarez-Gonzalez (2003), para la harina de sangre en *P. maculatofasciatus*, mientras Alarcon *et al.* (2002), también publicaron altos GH's en harina de sangre y pescado, en *S. aurata*. En las Tablas 13 y 14, se puede observar que las harinas vegetales obtuvieron bajos valores de GH en comparación a las harinas que contenían proteína animal, esto se debe seguramente a que el robalo blanco es un pez altamente carnívoro.

En los análisis de aminoácidos libres totales, el valor más alto lo presentó la harina de pescado. Valores similares los reportaron Oña *et al.* (2003), para *D. dentex*, obteniendo el segundo valor mas alto para el híbrido *Dentex X Pagrus*.

En la fase alcalina el 70% de la hidrólisis de la mayoría de las harinas, se dio a los primeros 30 minutos de reacción. El valor de GH mas alto lo presentó la harina de pescado de la empresa del Pedregal, mayor aún que los valores obtenidos para la caseína; en *D. dentex*, *P. pagrus* y *Dentex X Pagrus*, tambien se encontraron altos valores de GH para la harina de sardina según Oña *et al.* (2005a). La mayor liberación de aminoácidos fue presentado por el hidrolizado de pescado, valor que estuvo por arriba de los valores presentados por la caseína, lo cual es normal, ya que esta harina esta previamente hidrolizada. Estos altos valores de AALT para el hidrolizado de pescado, fueron publicados por Alvarez-Gonzalez (2003), para *P. maculatofasciatus*. Las harinas que mostraron mayor cantidad de AALT, presentaron un mayor incremento aminoácidos libres después de los primeros 30 minutos de reacción. Oña *et al.* (2005a), reportaron este incremento después de los primeros 15 minutos. Por lo tanto la harina de sardina obtuvo valores semejantes a los obtenidos para la caseína, similar para *D. dentex* y *P. pagrus*.

Los altos valores de GH de la harina de jaiba en la fase ácida, la favorecieron para que alcanzara los mayores valores de digestibilidad, aun con la respuesta nula obtenida en la fase alcalina, datos similares son reportados por Alarcon *et al.* (2001b), para el guisante verde y la semilla de lupina en *S. aurata*. En nuestro estudio, esto sucedió en casi la totalidad de las harinas analizadas, sobre todo aquellas que estuvieron por encima del 100% de digestibilidad. La harina de sangre de res mostró un 137% de digestibilidad, valor similar al 132% mostrado en *S. aurata* (Alarcon *et al.*, 2002). Estos altos valores de digestibilidad para la harina de sangre también son mostrados en *P. maculatofasciatus* según Alvarez-Gonzalez (2003). En robalo blanco la harina de pescado de la empresa del pedregal presento altos valores de GH totales, solo superada por la harina de jaiba.

Las harinas vegetales utilizadas en estos ensayos presentaron bajos valores de GH y AALT, sin embargo la pasta de soya mostró mejores valores que el gluten de trigo, estos bajos valores según varios autores están relacionados a los antinutrientes presentes en estas harinas (Moyano *et al.*, 1998; Alarcón *et al.*, 2001b; Francis *et al.*, 2001; Alarcón *et al.* 2002; Chong *et al.*, 2002b; Pérez *et al.*, 2003; de Oña *et al.*, 2005b). Aunque de Oña *et al.* (2003), mencionan que las diferencias en los valores de hidrólisis entre las distintas proteínas, podrían estar relacionadas a dos factores principales: 1) a sus perfiles aminoacídicos: donde las enzimas ácidas hidrolizan enlaces peptídicos en los que participan aminoácidos aromáticos y ácidos, así la proporción de estos en una proteína, pueden condicionar el grado de hidrólisis de la misma 2) a las características de sus estructuras terciarias: la accesibilidad y flexibilidad de su estructura tridimensional condiciona la susceptibilidad de los enlaces peptídicos para ser hidrolizados por las proteasas. Se ha descubierto que el pH ácido puede modificar la estructura de las proteínas haciéndolas menos accesibles a las proteasas digestivas, y por lo tanto la proteína es menos degradada.

Al comparar los valores de AALT mostrados en la fase ácida y alcalina, las harinas de pescado de la empresa pedregal, hidrolizado de pescado, sangres de pollo, sangre de res y harina de sardina, fueron quienes mostraron los mayores valores de AALT, siendo el gluten de trigo quien mostró la menor cantidad de aminoácidos libres totales.

Las enzimas gástricas mostraron mayor actividad proteolítica que las enzimas intestinales, esto también se vio reflejado en la hidrólisis de las diferentes fuentes proteínicas utilizadas en este estudio, donde la fase ácida mostró valores mayores de hidrólisis que los presentados por la fase alcalina del intestino. En la fase intestinal se obtuvieron los mejores valores de AALT en comparación a los obtenidos en la fase gástrica estomacal, indicando que en el estómago del robalo se lleva a cabo la mayor parte de la degradación proteínica y en el intestino la degradación final de la proteína y por ende una mayor cantidad de aminoácidos libres que son absorbidos al torrente sanguíneo.

En los ensayos Con SDS-PAGE, se pudo observar que la degradación de las proteínas se presentó en las dos fases, mostrando el mismo patrón de respuesta a las obtenidas con las harinas, con una degradación gradual y una degradación en los primeros minutos de reacción.

La harina de jaiba aunque presentó altos valores de AALT en la fase ácida, estando inclusive por encima de los valores de AALT de la harina de cerdo y la harina de pollo, fue excluida como un ingrediente alimenticio del robalo, debido a su baja concentración proteínica, poca disponibilidad en el mercado y al alto costo de esta harina, lo que elevaría los costos de producción en esta especie.

Las harinas de sangre mostraron valores de AALT por arriba de los mostrados por la mayoría de las harinas analizadas, datos similares a los obtenidos por Álvarez-González (2003), en *P. maculatofasciatus* donde de igual manera reporta la gran cantidad de AALT por este tipo de harinas. Sin embargo a pesar de la buena aportación de AALT, estas

harinas se descartaron como fuentes de proteínas para dieta de robalo, debido a que se ha comprobado que el alto contenido de hierro en estas harinas, puede provocar el estrés oxidativo en las células intestinales al saturarse en poco tiempo con el exceso de hierro, causando una hipertrofia en los enterocitos, modificando así, la transferencia de otros metales como por ejemplo el cadmio, desde las células al torrente sanguíneo, provocando un rechazo en la dieta, escaso índice de conversión alimenticia y daños serios a las células hepáticas del intestino (Civera-Cerecedo *et al.*, 2008). Lehninger (1995), menciona que estos desordenes, están relacionados a la estructura globular de la proteína tipo fibrina o al suero de albúmina de la hemoglobina.

Riche & Brown (1992), sugieren que el exceso de hierro en la dieta produce un desbalance en los procesos energéticos a nivel molecular, al encontrar diferencias en el contenido de fósforo en músculos de *O. mykiss* alimentadas con dietas elaboradas con harina de sangre. En *O. niloticus* y *P. maculatofasciatus* se observó un bajo crecimiento al ser alimentadas con dietas que contenían este tipo de harinas (El-Sayed, 1998; Civera-Cerecedo *et al.*, 2008), presenciando en *P. maculatofasciatus* el desprendimiento del citoplasma hialino de los enterocitos, un proceso autolítico en el núcleo picnotico, heridas en la mucosa intestinal con grandes vacuolas picnóticas en el interior de los enterocitos, sugiriendo niveles próximos a 17% de harina de sangre en dietas de peces, causan anomalías en las células hepáticas y decrece la tasa de crecimiento.

Al descartar las harinas de sangre, por su baja calidad nutricional y a la harina de jaiba por las razones antes expuestas, las harinas seleccionadas para la elaboración de las dietas experimentales fueron: las harinas de pescado de la empresa del pedregal, harina de cerdo y la harina de pollo, las cuales dieron altos valores de AALT.

Estudios de digestibilidad *in vitro* de dietas

El alimento comercial Silver Cup presento altos valores de GH total y bajos valores de AALT, mostrando que sus altos valores de GH pueden ser debido a su condición de alimento extruído, mas que a los ingredientes proteínicos que este pueda contener, ya que estos alimentos presentan mayor grado de hidrólisis que los alimentos elaborados a presión de vapor, según datos publicados por Fenerci & Sener (2005), en estudios realizados con enzimas digestivas de *O. mykiss*.

Para los alimentos experimentales los mayores valores de GH se obtuvieron en la fase ácida, confirmando así, la importancia de la pepsina en la degradación de las grandes cadenas proteínicas, donde las proteasas intestinales realizan la degradación final de las proteínas, dándole al intestino la capacidad de una mayor liberación de aminoácidos y absorción de nutrientes.

Al comparar la cantidad de AALT de las dos fases digestivas, se observó que el alimento de pescado, presentó valores de AALT muy por encima de los mostrados por el alimento comercial, el cual obtuvo los valores más bajos. El alimento de pollo mostró una gran cantidad de AALT, pudiendo ser un buen candidato como complemento proteínico en dietas para robalo blanco.

Estudios de ontogenia enzimática de robalo blanco

La actividades de proteasas alcalinas generales, además de las endopeptidasas específica tripsina y quimotripsina, fueron detectadas desde la eclosión en bajos niveles, incrementando paulatinamente sus niveles conforme la larva se desarrolla, para después disminuir abruptamente; este tipo de comportamiento concuerda con lo observado para otras especies como *P. maculatofasciatus* (Alvarez-González *et al.* 2008 y 2010), *Seriola*

lalandi (Valenciennes) (Chen *et al.* 2006), *Paralichthys californicus* (Ayres) (Alvarez-González *et al.* 2006) y *S. ocellatus* (Lazo *et al.* 2007), donde se ha demostrado que la actividad de este tipo de proteasas alcalinas es el tipo de hidrólisis más importante la cual esta diréctamente relacionado tanto con los cambios morfofisiológicos al pasar de un tubo recto indiferenciado observado en los eleuteroembriones y larvas durante los primeros días de vida, así como a los propios cambios de la dieta, ya sean microalgas, rotíferos, nauplios de *Artemia*, *Artemia* adulta y/o alimentos artificiales, lo cual tiene una influencia directa sobre la capacidad de las larvas para aprovechar la proteína de estos alimento a través de la presencia y actividad de sus proteasas (Moyano *et al.* 1996). Estos cambios en las actividades también concuerdan con lo mencionado por Cahu y Zambonino-Infante (1994), quienes comentan que durante el periodo larvario, previo a la aparición de las proteasas estomacales, las enzimas pancreáticas son las encargadas de hidrolizar la mayor parte de las proteínas y una vez que inicia el desarrollo del estómago con la aparición del primordio estomacal, se activan las células gástricas que son las encargadas de secretar ácido clorhídrico y pepsinógeno, que a su vez es activado a pepsina por el propio ambiente ácido, por lo cual el estómago se convierte en el órgano encargado de realizar la hidrólisis de los combustibles, dejando la labor final al intestino de completar la hidrólisis de manera luminal y parietal hasta péptidos y aminoácidos, y la consecuente absorción de nutrientes en los enterocitos (Ueberschâer 1993; Baglolle *et al.* 1998; Kvåle *et al.* 2007). En este sentido, la aparición de las gándulas digestoras secretoras de pepsinógenos se ha observado en las larvas del *Paralichthys olivaceus* (Temminick & Schlegel) a los 45 dde (Kurokawua y Suzuki 1996); sin embargo, en ocasiones se ha detectado tempranamente una ligera actividad de proteasas ácidas que no es necesariamente son de origen estomacal, la cual puede ser provocada por una contaminación de otro tipo de hidrolasas (catepsinas) que trabajan en condiciones ácidas y que son detectadas por el uso de extractos enzimáticos de cuerpo entero de las larvas al hacer los homogenizados (Moyano *et al.* 1996), por lo cual es adecuado complementar la información de la actividad enzimática con la presencia de las células gástricas por medio de estudios histológicos como ha sido realizado en *D. dentex*

(Gisbert *et al.* 2009). Es así que en las larvas de *C. undecimalis* las máximas actividades de la proteasa ácida se observaron entre los 25 y 36 dde, coincidiendo con los descrito con especies como *Diplodus sargus* (Linnaeus), *D. dentex* y *Pagrus auriga* (Valenciennes) (Alarcón *et al.* 1998; Cara *et al.* 2003; Moyano *et al.* 2005), donde pudo comprobar cómo dicha actividad, es indicadora del inicio de la funcionalidad del estómago, indicando la posibilidad de realizar el cambio de alimentación de presas vivas a alimentos artificiales (Lazo *et al.* 2007).

Por otra parte, la máxima actividad enzimática tanto de la proteasa alcalina como tripsina observada en *C. undecimalis* a los 12 dde puede deberse al cambio de alimentación al momento de realizar la coalimentación de rotíferos con nauplios de *Artemia*, además de la eficientización en la secreción de zimógenos pancreáticos los cuales desempeñan un papel importante tanto en la hidrólisis de las proteínas del alimento como en la activación de otras proteasas alcalinas como la quimotripsina (Hjelmeland y Jorgensen, 1983). En estudios con larvas de *P. olivaceus* se ha reportado que la secreción de tripsinogeno antes de la aparición de la primera alimentación, la cual esta programado genéticamente, por lo cual está enzima está presente aun antes de la apertura de la boca, realizando en el momento de la primer alimentación la hidrólisis de proteínas y la activación de otros zimógenos pancreáticos (Kurokawa y Suzuki 1996). Es de esta manera, que al detectar la máxima actividad de la quimotripsina entre los 25 y 34 dde, además de complementar la hidrólisis alcalina de proteínas, es activada por la propia acción de la tripsina sobre los quimotripsinógenos, lo cual concuerda con lo mencionado con por Saez de Rodriguez *et al.* (2005) con larvas de *S. senegalensis*, quienes mencionan que un cambio en la relación entre las actividades tripsina y quimotripsina son indicadoras de la mayor capacidad digestiva de la larva, donde en condiciones normales la cantidad de tripsina va aumentando como respuesta a la demanda de hidrólisis proteínica, pero si los peces sufren algún tipo de restricción alimenticia, tanto en cantidad como en calidad, la proporción tripsina/quimotripsina se estanca o disminuye ya que se produce relativamente menos

tripsina frente a una secreción constante de quimotripsina, lo cual ha sido detectado para *S. aurata* y *D. sargus* (Moyano *et al.* 1996; Cara *et al.*, 2003).

En otro orden de ideas, las exopeptidasas leucina aminopeptidasa y carboxipeptidasa A fueron detectadas en muy bajos niveles en los embriones observando un incremento en los 2 y 7 dde respectivamente, lo cual para el caso de la aminopeptidasa coincide con los reportado con especies como *S. maximus* (Primo *et al.* 1987) y *D. labrax* (Cahu y Zambonino-Infante 1997), los cuales mencionan que esta enzima parietal, al estar situada en el borde en cepillo de los enterocitos, tiene como función la hidrólisis de los péptidos, permitiendo la liberación de aminoácidos a partir del lado amino terminal, cuya digestión inició por parte de las endoproteasas pancreáticas (tripsina y quimotripsina) a nivel luminal. Adicionalmente, la disminución de la actividad aminopeptidasa en días posteriores durante el larvicultivo tiene otra connotación, ya que se ha mencionado que el cruce entre esta enzima con el incremento de la actividad fosfatasa, indica la maduración de los enterocitos, lo cual es otra guía que puede ser considerada para la sustitución de las presas vivas por el alimento artificial (Cahu y Zambonino-Infante 1995; Gawlicka *et al.* 1995; Zambonino-Infante y Cahu 2001) y que ha sido reportado durante el desarrollo inicial de dos pleuronectiformes como *Pleuronectes ferruginea* (Storer) y *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum) (Baglolle *et al.* 1998). Por otra parte, en el caso de la actividad carboxipeptidasa, se sabe que esta exopeptidasa dependiente de Zn (metalo-proteasa), es producida en las células acinares del páncreas y tiene su acción en el lumen para la realizar la liberación de aminoácidos a partir del carboxilo terminal de los péptidos que hidroliza, su acción en los peces ha sido estudiada, principalmente en adultos de peces como *C. carpio* (Cohen *et al.* 1981), *Parasilurus asotus* (Linnaeus) (Yoshinaka *et al.* 1985), *S. maximus* I (Munilla-Morán y Stark 1990), y *Scyliorhinus canicula* (Linnaeus) (Hajjou *et al.* 1995), así como detectar su expresión en larvas de *P. olivaceus*, donde se observa su presencia desde la primera alimentación (Srivastava *et al.* 2002), al igual que con las larvas de *C. undecimalis* de este estudio, por lo cual se considera que tiene una connotación no solo

desde el punto de vista nutricional, sino también como un indicador de la presencia de posibles enfermedades (Vendrell *et al.* 2000).

En las técnicas electroforéticas (Zimogramas) realizadas a las larvas de *C. undecimalis*, se detectaron solamente dos isoformas para la actividad proteolítica alcalina, las cuales corresponden aparentemente por su masa molecular (21.1-21.4 y 51.6 kDa respectivamente) al tipo de las tripsinas y quimotripsinas (20 a 24 kDa), las cuales al ser endopeptidasas hidrolizan las proteínas liberando péptidos y alguna exopeptidasa como aminopeptidasa o carboxipeptidasa (35 a 60 kDa), las cuales como ya se comentó anteriormente, son las encargadas de liberar aminoácidos y usadas como indicadores de la madurez de los enterocitos (Zambonino-Infante y Cahu 1994); siendo estos pesos moleculares similares a los detectados en especies como el coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) y chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*, Walbaum) (2 isoformas de 22 kDa), *S. aurata* (5 isoformas de 24.5 a 90 kDa), *D. dentex* (8 isoformas de 24.5 a 69.5 kDa), *B. orbignyanus* (9 isoformas de 7 a 70 kDa), *S. aequifasciata* (8 isoformas de 19.2 a 76.5 kDa), *T. thynnus* (3 isoformas de 16.8 a 26.8 kDa), *L. rohita* (5 isoformas de 20.9 a 69.4 kDa) y *P. maculatofasciatus* (2 isoformas de 20.1 a 56.5 kDa) (Dimes *et al.* 1994a; Alarcon *et al.* 1998; García-Carreño *et al.* 2002; Chong *et al.* 2002a; Essed *et al.* 2002; Chakrabarti *et al.* 2006a; Alvarez-Gonzalez *et al.* 2008b). Adicionalmente, de acuerdo al trabajo realizado por Concha-Frías (2008) con juveniles silvestres (11 cm de longitud total en promedio) de *C. undecimalis* se detectaron tres isoformas activas para las proteasas digestivas alcalinas usando la misma técnica, lo cual es diferente de nuestro estudio al observarse solamente dos isoformas a los 36 dde; por lo que es posible que no se han activado la totalidad de las enzimas o por su baja actividad no haya sido reveladas; lo que indicaría que a esta edad todavía no se pueda considerar a *C. undecimalis* como un juvenil, aunque por la poca cantidad de isoformas detectadas conicidiría en ubicar a esta especie de acuerdo a Moyano *et al.* (1996), como un carnívoro extricto. Por otra parte, el zimograma de la actividad acida permitieron detectar dos isoformas (0.32 y 0.51 Rf's) a partir del día

34 dde; de esta manera, la detección de pepsina por medio de esta técnica ha sido reportada para otras especies como *L. vivanus* (una isoforma de 26.1 kDa), *H. plumierii* (una isoforma de 24 kDa), *P. maculatus* (una isoforma de 24.0 kDa) y *P. maculatofasciatus* (una isoforma detectada a los 12 dde, Rf=0.65) (Rivera 2003; Rodríguez 2004; Souza *et al.* 2007; Alvarez-Gonzalez *et al.* 2008b) donde los autores coinciden que estas pepsinas son similares a la pepsina porcina tipo A (35 kDa). En este mismo sentido, Concha-Frías (2008) con los juveniles de *C. undecimalis* inhibe el 86 % de la actividad de proteasas ácidas con pepstatin A de los extractos estomacales, lo que pone de manifiesto que la mayor parte de la actividad enzimática del estómago es de pepsina tipo A, aunque existe una actividad remanente que puede pertenecer a otro tipo de pepsinas y que se corrobora con la presencia de dos isoformas en las larvas de esta especie a los 34 y 36 dde, como ha sido detectado molecularmente para *T. orientalis* donde se detectó la expresión molecular de tres pepsinas, PG1 y PG2 que corresponden al tipo Pepsina A de 34.5, 39.4 kDa respectivamente y PG3 que corresponde a una pepsina tipo C de 39.3 kDa que tiene un origen filogenético diferente que PG1 y PG2 (Tangi *et al.* 2009).

De esta forma, las actividades de lipasa se detectó desde el 3 dde, incrementando rápidamente para el 36 dde, lo que concuerda con lo mencionado por Green y McCormick (2001) quienes consideran que la presencia de estas enzimas digestivas desde antes de la eclosión y durante los primeros días de vida está relacionado fuertemente con la absorción de los componentes nutricionales del saco vitelino. De esta manera, para el caso específico de la actividad de lipasas se han realizado diversos estudios durante el desarrollo larval de peces marinos, donde de manera recurrente la actividad muestra dos picos de alta actividad, el primero en los primeros días de vida relacionado con la hidrólisis de lípidos del vitelo y el segundo pico al momento de la maduración del sistema digestivo, aunque también puede haber fluctuaciones en la actividad que están relacionados directamente con el proceso de co-alimentación durante los cambios de alimentos y los procesos de enriquecimiento con emulsiones lipídicas (Hoehne-Reitan *et al.* 2001), como ha sido indicado por Martínez *et al.*

(1999) en las larvas de *S. senegalensis*, donde se detectaron dos picos de máxima actividad en las larvas de 7 y 36 dde; lo que se ha explicado ya que durante el catabolismo de los lípidos durante los primeros días de vida de la larva, se llevan por acción principalmente de esterases, las cuales hidrolizan ácidos grasos de cadena, que servirán para la obtención de energía, mientras que la acción de lipasas verdaderas, fosfolipasas y lipasas dependientes de colipasa y sales biliares, son las encargadas de liberar ácidos grasos altamente poli-insaturados y otros compuestos más complejos, lo cual generalmente se observa en días posteriores relacionándose con la maduración del sistema digestivo (Zambonino-Infante y Cahu 1999; Gawlicka *et al.* 2000; Sidell y Hazel 2002). Un aspecto que se debe resaltar es que aunque en la mayoría de los trabajos la acción de las esterases y lipasas pancreáticas ha sido medida por diferentes técnicas en el tubo digestivo de las larvas de diferentes especies usando diversas aproximaciones (Ribeiro *et al.* 1999; Murray *et al.* 2003; Morais *et al.* 2005; Gisbert *et al.* 2009); sin embargo, la acción de las lipasas ácidas en peces no ha sido estudiada; aunque se sabe que este tipo de enzimas, las cuales no dependen de cofactores ni colipasa, es producida por las células jefe en las glándulas fúndicas y actúan en conjunto con la pepsina y las condiciones ácidas del estómago (Miled *et al.* 2000). Si bien, la acción de las esterases juega un papel muy importante en la hidrólisis de los lípidos del alimento, donde inclusive la tripsina tiene esta propiedad, las lipasas pancreáticas las cuales adicionalmente son liberadas al lumen en forma activa, teniendo un peso molecular de 50 kDa y funcionando óptimamente a pH 8, además de depender de las sales biliares, que aumentan la formación micelar y por consecuencia, su acción en la interfase agua-lípido (van Tilbeurgh *et al.* 1992), siendo las encargadas de hidrolizar triacilglicéridos y liberar ácidos grasos (principalmente poli-insaturados de cadena larga) en las posiciones 1 y 3 del glicerol y monoglicéridos, que van a ser absorbidos por los enterocitos (Morais *et al.* 2005). De esta manera, al realizar la alimentación de las larvas, el uso adecuado de presas vivas y alimenos artificiales deben de cumplir con requerimiento en lípidos y ácidos grasos, ya sea por medio del uso de enriquecedores adionados a los alimentos, lo que es fundamental para

asegurar un adecuado crecimiento y alta supervivencia durante el periodo larvario (Díaz *et al.* 2002; Buchet *et al.* 2000).

En el caso de la actividad de la amilasa durante la ontogenia de *C. undecimalis*, su máxima actividad se detectó entre los días 5 y 12 dde, para posteriormente decender en días posteriores, lo cual concuerda con lo observado para otras especies de peces marinos, donde se reporta una alta actividad antes de la eclosión y durante los primeros días de vida (absorción de vitelo) y posteriormente una reducción en la actividad; por lo que se mencionan que esta actividad está genéticamente programado para aprovechar los componenetes del vitelo (glucógeno) y que solamente se mantiene durante poco tiempo para después disminuir, donde se ha mencionado que es análogo a lo que sucede en mamíferos con la acción de la lactasa sobre la lactosa de la leche (Zambonino-Infante y Cahu 1994; Moyano *et al.* 1996; Péres *et al.* 1996; Martinez *et al.* 1999; Buchet *et al.* 2000; Cuvier-Péres y Kestemont 2002; Alemán *et al.* 2004), aunque se ha observado que la actividad amilasa tiende a mantenerse en niveles bajos para aprovechar los carbohidratos del alimento, inclusive en especies carnívoras (Munilla-Morán y Saborido-Rey 1996). Sin embargo, autores como Fange y Grove (1979), Ugolev *et al.* (1983), e Hidalgo *et al.* (1999) han demostrado que la actividad de la amilasa tiende a ser mayor en los peces herbívoros y omnívoros comparada con peces carnívoros, observandose un incremento progresivo de la actividad, algo ya reseñado para otras especies y que corresponde más con una expresión “basal” que aumenta lógicamente en relación al crecimiento de la larva que a una necesidad nutricional.

Por otra parte, las enzimas digestivas parietales como las fosfatasas son muy importantes al ser las encargadas de terminar la digestión a nivel del epitelio intestinal además de apoyar en el transporte de los nutrientes ya hidrolizados al interior de los enterocitos (Smith *et al.* 2000; Zambonino-Infante y Cahu 2001), estas enzimas son sintetizadas directamente por los enterocitos para actual en el borde de cepillo (Harpaz y Uni 1999). De esta manera,

Alvarez-Gonzalez *et al.* (2008a), mencionan que las fosfatasa poseen dos grandes funciones; la primera es la hidrólisis de fosfatos inorgánicos que se utilizan para la producción de energía y la segunda en el transporte de nutrientes a través de membranas en las células (proceso de absorción). En este mismo sentido, Gawlicka *et al.* (2000) comentan que cuando los enterocitos alcance su capacidad máxima de hidrólisis y absorción, la actividad fosfatasa aumenta, lo que a su vez se relaciona con la caída de la actividad aminopeptidasa y por lo tanto la maduración de los enteocitos, como ha sido detectado en las larvas de *D. labrax* (Péres *et al.* 1997). De esta manera, las fosfatasa intervienen en el proceso de la digestión ya que facilitan la acción de otras enzimas digestivas, además de iniciar el proceso de migración de los nutrientes de la región crítica al borde de las microvellosidades para promover la absorción en las células (Copeland 1996). Es así que al aumentar abruptamente esta actividad en el curso del desarrollo larval, permite en conjunto con los cambios en el resto de las enzimas digestivas, indicar el momento en que el intestino madura y alcanza un carácter similar al de peces adultos, y por consecuencia determinar el momento más adecuado para realizar la sustitución de las presas vivas por alimento artificial (Ribeiro *et al.* 2002; Zambonino-Infante y Cahu 2007).

Finalmente, podemos concluir que desde muy temprana edad las actividades de proteasas alcalinas, lipasa, amilasa y fosfatasa estuvieron presentes en las larvas de *C. undecimalis*, aunque en niveles bajos, donde generalmente se observan fluctuaciones con los cambios de alimentos, lo cual concuerda con lo mencionado por Zambonino-Infante y Cahu (2001) con las larvas de *D. labrax* quienes detectaron una temprana aparición de las actividades enzimáticas digestivas antes de la adición del alimento, relacionando estas fluctuaciones con tres aspectos fundamentales: 1) con procesos genéticos, en especial al observarse cierta actividad específica en larvas en inanición durante la absorción del vitelo (por ejemplo, hidrólisis de fosfolípidos); 2) como una respuesta a la ingesta (comportamiento alimenticio), en el momento de agregar los alimentos vivos (rotíferos y *Artemia* sp), y 3) por la desaparición progresiva de la función metabólica en la cual está implicada una

determinada enzima (lactasa en el caso de los mamíferos), o por un relativo incremento del pool de proteína soluble en el organismo. Por otra parte, se observó un incremento en las actividades generalmente a partir de 3 dde, con el inicio de la alimentación (rotíferos), así como otra serie de incrementos entre los 10 y 25 dde, con el cambio de presas vivas (nauplios de *Artemia* y meta-nauplios de *Artemia* enriquecidos), lo que autores como Pedersen y Andersen (1992) mencionan está relacionado con la activación de las enzimas endógenas por medio de enzimas exógenas proveniente de las presas vivas, como ha sido comprobado en las larvas de *C. harengus* al usar diferentes alimentos como copépodos y microesferas, en donde se detectó que la secreción de tripsinogeno pancreático depende del tipo, tamaño y composición de humedad y nutrientes de los alimentos. En este sentido, Alvarez-González *et al.* (2008) mencionan que para algunas especies de peces marinos y en particular para *P. maculatofasciatus*, la participación enzimática exógena no es relevante, como ha sido corroborado por Díaz *et al.* (1997) en las larvas de *S. aurata* y García-Ortega *et al.* (2000) en larvas de *C. gariepinus*. Por su parte, la actividad de proteasas ácidas (pepsina) a partir del 25 dde y su incremento máximo observado a los 36 dde permite considerar a *C. undecimalis* como un juvenil desde el punto de vista de su fisiología digestiva desde los 34 dde, donde la baja presencia de isoformas de proteasas ácidas y alcalinas, permiten ubicarla como especie de hábitos carnívoros.

Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias al financiamiento del proyecto “Estudio sobre la fisiología digestiva del robalo blanco *Centropomus undecimalis*” SEP-CONACyT (CB-2006-1-58931). Los autores agradecen a Claudia Durruty Lagunes y Jaime Suárez Bautista por su asistencia técnica. Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por las becas otorgadas a Luis Daniel Jiménez-Martínez y Talhia Martínez Brugete.

Referencias

- Adler-Nissen J. (1976) Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *Journal of Agriculture Food and Chemistry* **24**, 1090-1093.
- Alarcon F.J., Díaz M., Moyano F.J. & Abellan E. (1998) Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiology and Biochemistry* **19**, 257-267.
- Alarcón F.J. (1997) Procesos digestivos en peces marinos: Caracterización y aplicaciones prácticas. Tesis de Doctorado, Universidad de Almería, España. 187 p.
- Alarcón, F.J., F.J. Moyano & M. Díaz (2002) Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH-STAT system. *Journal of the Science of food and Agriculture* **82**, 697-704.
- Alarcón F.J., F.J. Moyano & M. Díaz (1999) Effect of inhibitors present in protein sources on digestive proteases of juveniles sea bream (*Sparus aurata*). *Aquatic Living Resources* **12** (4), 233-238.
- Alarcón F.J., F.J. Moyano & M. Díaz (2001a) Use of SDS-page in the assessment of protein hydrolysis by fish digestive enzymes. *Aquaculture International* **9**, 255-267.
- Alarcón F.J., F.L. García-Carreño & M.A.N. del Toro (2001b) Effect of plant protease inhibitors on digestive proteases in two fish species, *Lutjanus argentiventris* and *L. novemfasciatus*. *Fish Physiology and Biochemistry* **24**, 179-189.
- Alarcón F.J., J.M. Díaz, F.J. Moyano & E. Abellán (1998) Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiology and Biochemistry* **19**, 257-267.
- Alencar R.B., M.M. Biondi, P.M. G. Paiva, V.L. A. Vieira, L.B. Carvalho Jr. & R. S. Bezerra (2003) Alkaline Proteases from the Digestive Tract of Four Tropical Fishes. *Brazilian Journal of Food and Technology* **6** (2), 279-284.
- Alvarez-González C.A. (2003) Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenosa *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae). Tesis doctoral, IPN-CICIMAR. 180 p.
- Alvarez-González C.A., Cervantes-Trujano M., Tovar-Ramírez D., Conklin D.E., Nolasco H., Gisbert E., & Piedrahita R. (2006) Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* **31**, 83-93.
- Alvarez-González C.A., Moyano-López F.J., Civera-Cercedo R., Carrasco-Chávez V., Ortiz-Galindo J., & Dumas S. (2008) Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*). I: Biochemical analysis. *Fish Physiology and Biochemistry* **34**, 373-384.
- Alvarez, A. et al. 2010. Avances en la fisiología digestiva del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) en Tabasco, México. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), Avances en Nutrición Acuicola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuicola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 98-231.

- Alvarez-González CA, Moyano-López FJ, Civera-Cercedo R, Carrasco-Chávez V, Ortiz-Galindo J, Nolasco-Soria H, Tovar-Ramírez D, Dumas S (2010). Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) II: Electrophoretic analysis. *Fish Physiology and Biochemistry* **36**, 29–37.
- Alvarez-Lajonchère L., Cequeira R.V. & Dos Reis M. (2002) Desarrollo embrionario y primeros estadios larvales del robalo chucumite, *Centropomus parallelus* Poey (Pices: Centropomidae) con interés para su cultivo. *Hidrobiológica* 12 (2): 89-100.
- Álvarez-Lajonchère L. & Taylor R.G. (2003) Economies of scale for juvenile production of common snook (*Centropomus undecimalis* Bloch). *Aquaculture Economics and Management* **7** (5/6), 273-291.
- Álvarez-Lajonchère L. & Tsuzuki M.Y. (2008) A review of methods for centropomus spp. (snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture in Latin America. *Aquaculture Research* **39**, 684-700.
- Álvarez-Lajonchère L. (2001) Fat snook breakthrough in Brasil. *Magazine World Aquaculture* March, 23-25.
- Andrews A. T. 1995. Electrophoresis: Theory, techniques, biochemical and clinical applications. Clarendon Press. Oxford, Great Britain. 452 p.
- Anónimo (2002) La Pesquería de robalo del Golfo de México. Manuales de la Secretaría de Pesca, México, pp. 773-792.
- Anson M.L. (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal of Genetic Physiology* **22**, 79-89.
- Applebaum S.L., R. Perez, J.P. Lazo & G.J. Holt. (2001) Characterization of chymotrypsin Activity during early ontogeny of larval red drum (*Sciaenops ocellatus*), *Fish Physiology and Biochemistry* **25**, 291–300.
- Apsmo I.S., S.J. Horn & V.G.H. Eijnsink. (2005) Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochemistry* **40**, 1957-1966.
- Arévalo-Galán L.M. (2009) Expresión del gen de tripsina durante la ontogenia inicial de la mojarra tenguayaca *Petenia splendida*. Tesis de Licenciatura. UJAT. 60 p.
- Ásgeirsson B., R. Hartemink & J. F. Chlebowski. (1995) Alkaline phosphatase from atlantic cod (*Gadus morhua*). Kinetic and structural properties which indicate adaptation to low temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology* **110B**, 315-329.
- Ávalos-Sánchez A.M. (2006) Digestibilidad *in vitro* de Dietas con Diferentes Combinaciones de Ligantes Diseñadas para Larvas y Juveniles de Pescado blanco del Lago de Patzcuaro *Chirostoma estor estor* (Jordan, 1879). Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH. 52 p.

- Avilés-Quevedo A., McGregor-Pardo U., Rodríguez-Ramos R., Morales-Castro O., Huerta-Bello M. & Hizawa M. (1995) Biología y cultivo de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868). Secretaría de Pesca. Instituto Nacional de la Pesca. JICA. México, 85 p.
- Baglolle C.J., Goff G.P. & Wright G.M. (1998) Distribution and ontogeny of digestive enzymes in larval yellowtail and winter flounder. *Journal of Fish Biology* **53**, 767-784.
- Barros A., F. J. Alarcón, F. J. Moyano & T.F. Martínez. (2002) Efecto de la suplementación de fitasa sobre la hidrólisis in vitro de la proteína en trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972). *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* **18** (1-4), 95-98.
- Behal F.J., B. Asserson, F. Dawson & J. Hardman. (1965) A study of human tissue aminopeptidase components. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **111**, 335-344.
- Benkel B.F., Nguyen T., Ahluwalia N., Benkel KI. & Hickey D.A. (1997) Cloning and expression of a chicken alpha-amylase gene. *Gene* **192**, 261-270.
- Bergmeyer H.V. (1974) Phosphatases. *Methods of enzymatic analysis*, vol 2. Academic Press.
- Bezerra R.S., E.J.F. Lins, R.B. Alencar, P.M.G. Paiva, M.E.C. Chaves, L.C.B.B. Coelho & L.B. Carvalho Jr. (2005) Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process in Biochemistry* **40**, 1829-1834.
- Bleir P.U., H. Lemieux & R.H. Devlin. (2002) Is the growth rate of fish set by digestive enzymes or metabolic capacity of the tissues? Insight from transgenic coho salmon. *Aquaculture* **209**, 379-384.
- Bórquez A. & V. R. Cerqueira. (1998) Feeding behavior in juvenile snook, *Centropomus undecimalis*. I. Individual effect of some chemical substances. *Aquaculture* **169**, 25-35.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. of Biochemistry* **72**, 248-254.
- Brock D., Robinette H.R. & Heinen J. (1992) Culture system for evaluating live and formulated diets for larval fish. *Progressive Fish Culturist* **54**, 270-273.
- Buchet V., Zambonino-Infante J.L. & Cahu C. (2000) Effect of lipid level in a compound diet on the development of red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. *Aquaculture* **184**, 339-347.
- Cahu C.L., Ronnestad I., Grangier V. & Zambonino-Infante J.L. (2004) Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact y hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin. *Aquaculture* **238**, 295-308.
- Cahu C.L. & Zambonino-Infante J.L. (1995) Maturation of the pancreatic and intestinal function in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiology and Biochemistry* **14**, 431-437.

- Cahu C.L. & Zambonino-Infante J.L. (1994) Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology* **109A**, 213-222.
- Cahu C.L. & Zambonino-Infante J.L. (1997) Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding? *Aquaculture International* **5**, 151-160.
- Camacho D.R.B., M.J.M. Álvarez, D. García, C. Medina & A. Sidorovas. (2007) Caracterización de un hidrolizado proteico enzimático obtenido del pez caribe colorado (*Pygocentrus cariba* Humboldt, 1821). *Interciencia* **32** (3), 188-193.
- Camacho Z., J.R. Brown & G. B. Kitto. (1970) Purification and properties of trypsin-like proteases from the starfish *Dermasterias imbricata*. *The Journal of biological chemistry* **245** (15), 3964-3972.
- Cara J.B., Moyano F.J., Cardenas S., Fernandez-Diaz C. & Yufera M. (2003) Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *Journal of Fish Biology* **63**, 48-58.
- Castillo-Yañez F.J., R. Pacheco-Aguilar, F.L. Garcia-Carreño & M.A. Navarrete-Del Toro. (2004) Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. *Food Chemistry* **85**, 343-350.
- Castro-Aguirre J.L., H.E. Pérez & J.J. Schmitter-Soto. (1999) Ictiofauna Estuarino-Lagunar y Vicaria de México, Editorial Limusa, Primera Edición, México, 625 p.
- 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.
- Cequeira R.V. & Brügger A.M. (2001) Effect of light intensity on initial survival of fat snook (*Centropomus parallelus*, Pisces: Centropomidae) larvae. *Brazilian Archives of Biology and Technology International Journal* **44**(4), 343-349.
- Chakrabarti R., Rathore R.M., Kumar S. (2006a) Study of digestive enzyme activities and partial characterization of digestive proteases in a freshwater teleost, *Labeo rohita*, during early ontogeny. *Aquaculture Nutrition* **12**, 35-43.
- Chakrabarti R., R.M. Rathore, P. Mittal & S. Kumar. (2006b). Functional changes in digestive enzymes and characterization of proteases of silver carp (♂) and bighead carp (♀) hybrid, during early ontogeny. *Aquaculture* **253**, 694-702.
- Chávez H. (1961) Estudio de una nueva especie de robalo del golfo de México y redescrición de *Centropomus undecimalis* (Bloch) (Pisces: Centropomidae). *Ciencia* **XXI** (2), 177-199.
- Chen B.N., Jian G.Q., Martin S.K., Wayne G.H. & Steven M.C. (2006) Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture* **256**, 489-501.
- Cheung A.L., P. Yung & V.A. Fschetti. (1991) A method to detect proteinase activity using unprocessed X-ray films. *Annals of Biochemistry* **193**, 20-23.

- Chong A.S., Hashim R., Chow-Yang L. & Ali A.B. (2002a) Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquaculture* **203**, 321-333.
- Chong A.S., Hashim R. & Ali A.B. (2002b) Inhibition of protease activities in Discus *Symphysodon spp.* By three plant meals. *Aquaculture International* **10**, 433-441.
- Chong-Carrillo O. & Vega-Villasante F, (2003). El dicamarón: Diccionario de camaronicultura. Versión 1.0, CIBNOR-Universidad de la Habana.
- Chong A.S.C., R. Hashim, L. Chow-Yang & A.B. Ali. (2002a) Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquaculture* **203**, 321–333.
- Chong A., R. Hashim & A. Bin Ali. (2002b) Inhibition of protease activities in *Discus Symphysodon spp.* By three plant meals. *Aquaculture International* **10**, 433-441.
- Church F.C., H.E. Swaisgood, D.H. Porter & G. Catignani. (1983) Spectrophotometric assay using o-phthaldehyde for determination of proteolysis in milk proteins. *Journal of Dairy Science* **66**, 1219-1227.
- Civera-Cerecedo R., C.A. Álvarez-González, R.E.García-Gómez, V. Carrasco-Chávez, J.L. Ortiz-Galindo, M.O. Rosales-Velázquez, T. Grayeb-Del Álamo & F.J. Moyano-López. 2008. Effect of micro-particulate diets on growth and survival of spotted sand bass larvae *Paralabrax maculatofasciatus* at two early weaning times. *Journal of the World Aquaculture Society* **39**(1), 22-36.
- Cohen T., Gertler A. & Birk Y (1981) Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*): 1. Purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase B. *Comparative Biochemistry and Physiology* **69B**(3), 639-646.
- Concha-Frías B. (2008) Evaluación de la capacidad digestiva de juveniles de *Centropomus undecimalis* (bloch, 1792) sobre diferentes ingredientes proteínicos. Tesis de Maestría, Universidad Católica del Norte de Chile. 109 p.
- Copeland R.A. (1996) *Structural components of enzymes*. In: Enzymes, a practical introduction to structure, mechanism and data analysis. Wiley, New York, pp 35-65.
- Córdova-Murueta J.H. & F. L. García-Carreño. (2002) Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture* **210**, 371-384.
- Cousin J.C.B., Baudin-Laurencin F. & Gabaudan J. (1987) Ontogeny of enzymatic activities in fed y fasting turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Journal of Fish Biology* **30**, 15-33.
- Darias M.J., Murria H.M., Gallant J.W., Astola A., Douglas S.E., Yufero M. & Martínez-Rodríguez G. (2006) Characterization of a partial α -amylase clone from red porgy (*Pagrus pagrus*): Expression during larval development. *Comparative Biochemistry and Physiology* **143B**, 209-218.

- Darnis S., Juge N., Guo X.J., Marchis-Mouren G., Puigserver A. & Chaix J.C. (1999) Molecular cloning and primary structure analysis of porcine pancreatic alpha-amylase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1430**, 281-289.
- Das K.M. & S.D. Tripathi. (1991) Studies on the digestive enzymes of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *Aquaculture* **92**, 21-32.
- Davis B.J. (1964) Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Annals New York Academic Science* **121**, 404-427.
- De-Vecchi S.D. & Coppes Z. (1996) Marine Fish digestive proteases relevance to food industry and South West Atlantic region -a review. *Journal of Food Biochemistry* **20**, 193-214.
- Díaz-López M., Moyano-López F.J., Alarcón-López F.J., García-Carreño F.L. & Navarrete del Toro, M.A. (1998) Characterization of fish acid proteases by substrate-gel electrophoresis. *Comparative Biochemistry and Physiology* **121B**, 369-377.
- Diccionario Esencial de las Ciencias (2000) Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. ESPASA, Madrid, España, 1022 p.
- Dimes L.E., García-Carreño F.L. & Haard N.F. (1994a) Estimation of protein digestibility. III. Studies on digestive enzyme from the pyloric caeca of rainbow trout and salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology* **109**, 349-360.
- Dimes L.E. & N.F. Haard. (1994) Estimation of protein digestibility: I. Development of an in vitro method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **108A**(2-3), 349-362.
- Dimes L.E., N.F. Haard, F.M. Dong, B.A. Rasco, I.P. Forster, W.T. Fairgrieve, R. Arndt, R.W. Hardy, F.T. Barrows & D.T. Higgs. (1994b). Estimation of protein digestibility. II. In vitro assay of protein in salmonid feeds. *Comparative Biochemistry and Physiology* **108A**, 363-370.
- Dixon M. & E. Webb. (1979) *Enzymes*. Academic Press 3th. New York.
- Donovan P.D., M.H. Horn & A. Gawlicka. 2004. Digestive enzyme activities in herbivorous and carnivorous prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae): ontogenetic, dietary, and phylogenetic effects. *Physiological and Biochemical Zoology* **77** (5), 789-804.
- Douglas S.E., Gallant J.W. & Bullerwell C.E. (1999) Molecular investigation of aminopeptidase N expression in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Journal of Applied Ichthyology* **15**(2), 80-86.
- Douglas S.E., Mandla S. & Gallant J.W. (2000) Molecular analysis of the amylase gene and its expression during development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Aquaculture* **190**, 247-260.
- Dumermuth E., J. Bond, A. Flannery & R. Beynon. (1991) The astacin family of metalloendopeptidases. *Journal of Biology and Chemistry* **266**, 21831-21835.

- Dunn B.M. (1989) Determination of protease mechanism. pp. 57-81. In: *Proteolytic Enzymes: A practical approach*. I R.J. Beynon y J.S. Bond (Eds.).R.L. Press, Oxford, England.
- Eid A.E. & A.J. Matty. (1989) A simple *in vitro* method for measuring protein digestibility. *Aquaculture* **79**, 111-119.
- El-Sayed A.F.M. (1998) Total replacement of fish meal with animal protein sources in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), feeds. *Aquaculture Research* **29**, 275-280.
- El-Sayed A.F.M., I.N. Martínez & F.J. Moyano. (2000) Assessment of the effect of plant inhibitors on digestive proteases of Nile tilapia using *in vitro* assays. *Aquaculture International* **8**, 403-415.
- Erlanger B., Kokowsky N. & Cohen W. (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysic* **95**, 271-278.
- Essed Z., Fernández I., Alarcón F.J. & Moyano F.J. (2002) Caracterización de la actividad proteasa digestiva de atún rojo *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758). *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* **18**(1-4), 99-107.
- Ezquerria J.M., F.L. García-Carreño, R. Civera & N.F. Haard. (1997) pH-STAT method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* **157**, 251-262.
- Fabillo M.D., Herrera A.A. & Abucay J.S. (2004) *Effects of delayed first feeding on the development of the digestive tract y skeletal muscles of Nile Tilapia, Oreochromis niloticus* L. , pp. 301-315 In: Proceedings 6th International Symposium on Tilapia in Aquaculture Philippine International Convention Center Roxas Boulevard, Manila, Philippines.
- Fange R. & Grove D. (1979) *Digestion*, pp. 161-260. In: Hoar WS, Randall DJ, Brett JR (eds) *Fish Physiology*. Vol. 8, Academic Press. NY.
- FAO (2006) Examen mundial de la pesca y la acuicultura. (<http://www.fao.org/docrep/009/a0699s/A0699S04.htm>).
- FAO (2010) Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service. 2010. Aquaculture production 1950-2008. FISHSTAT Plus - Universal software for fishery statistical time series [online or CD-ROM]. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available at: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstat/en>.
- Fenerci S. & E. Sener. (2005) *In vivo* and *In vitro* protein digestibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972) fed steam pressured or extruded feeds. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **5**, 17-22.
- Folk J.E. & Schirmer E.W. (1963) The porcine pancreatic carboxypeptidase α system. *Journal of Biology and Chemistry* **238**, 3884-3894.
- Ford J.E. & D.N. Salter. (1966) Analysis of enzymatically digested food proteins by Sephadex-gel filtration. *Brazilian Journal of Nutrition* **20**, 843-860.

- 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**(3-4), 197-227.
- Fu X., C. Xue, B. Miao, Z. Li, X. Gao & W. Yang. (2005) Characterization of proteases from the digestive tract of sea cucumber (*Stichopus japonicus*): high alkaline protease activity. *Aquaculture* **246**, 321-329.
- Furné M., M.C. Hidalgo, A. López, M. García-Gallego, A.E. Morales, A. Domezain, J. Domezainé & A. Sanz. (2005) Digestive enzyme activities in adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture* **250**, 391-398.
- García-Carreño F.L., Albuquerque-Cavalcanti C., Navarrete del Toro M.A. & Zaniboni-Filho E. (2002) Digestive proteinases of *Brycon orbignyanus* (Characidae, Teleostei): characteristics and effects of protein quality. *Comparative Biochemistry and Physiology* **132B**, 343-352.
- García-Carreño F.L., Dimes L.E. & Haard N.F. (1993) Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytic Biochemistry* **214**, 65-69.
- García-Carreño F.L. (1992) Protease inhibition in theory and practice. *Biotechnology Education* **3**, 145-150
- García-Carreño F.L., A.N. del Toro & M. Ezquerro. (1997) Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility *in Vitro*. I: Effect of protease inhibitors in protein ingredients. *Journal of Marine Biotechnology* **5**, 36-40.
- García-Ortega A., Verreth J. & Segner H. (2000) Post-prandial protease activity in the digestive tract of African catfish *Clarias gariepinus* larvae fed decapsulated cysts of *Artemia*. *Fish Physiology and Biochemistry* **22**, 237-244.
- García-Ortega A., Verreth J.A.J., Coutteau P., Segner H., Huisman E.A. & Sorgeloos P. (1998) Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages. *Aquaculture* **161**, 501-514.
- Gaudix A., E.M. Gaudix, M.P. Páez-Dueñas, P. González-Tello & F. Camacho. (2000) Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica* **41**(1), 79-89.
- Gawlicka A., Leggiadro C.T., Gallant J.W. & Douglas S.E. (2001) Cellular expression of the pepsinogen and gastric proton pump genes in the stomach of winter flounder as determined by *in situ* hybridization. *Journal of Fish Biology* **58**, 529-536.
- Gawlicka A., Parent B., Horn M.H., Ross N., Opstad I. & Torrinsen O.J. (2000) Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture* **184**, 303-314.

- Gawlicka A., Teh S.J., Hung S.S.O., Hinton D.E. & De La Noue J. (1995) Histological and histochemical changes in the digestive tract of white sturgeon larvae during ontogeny. *Fish Physiology and Biochemistry* **14**, 357-371.
- Gisbert E., Gimenez G., Fernandez I., Kotzamanis Y. & Estevez A. (2009) Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture* **287**(3), 381-387.
- Gisbert E., Sarasquete M.C., Willot P. & Castelló-Orvay F. (1999) Histochemistry of the development of the digestive system of Siberian sturgeon during early ontogeny. *Journal of Fish Biology* **55**, 596-616.
- Grabner, M. (1985) An in vitro method for measuring protein digestibility of fish feed components. *Aquaculture* **48**, 97-110.
- Grabner M. & R. Hofer. (1985) The digestibility of the proteins of broad bean (*Vicia faba*) and soya bean (*Glycine max*) under in vitro conditions simulating the alimentary tracts of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* **48**, 111-122.
- Gracia-López V., Kiewek-Martínez M. & Maldonado-García M. (2004) Effects of temperature and salinity on artificially reproduced eggs and larvae of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea*. *Aquaculture* **237**, 485-498.
- Gracia-López V., Rosas-Vázquez C. & Brito-Pérez R. (2006) Effects of salinity on physiological conditions in juvenile common snook *Centropomus undecimalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **145A**(3), 340-345.
- Green B.S. & McCormick M.I. (2001) Ontogeny of the digestive and feeding systems in the anemone fish *Amphiprion melanopus*. *Environmental Biology of Fishes* **61**, 73-83.
- Grier H. (2000) Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: centropomidae). *Journal of Morphology* **243**(3), 265-81.
- Grier H.J. & Taylor R.G. (1998) Testicular maturation and regression in the common snook. *Journal of Fish Biology* **53**(3), 521-542.
- Haard N.F. (1998) Speciality enzymes from marine organisms. *Food Technology* **53**, 64-67.
- Haard, N.F., L.E. Dimes, R.E. Arndt & F.M. Dong. (1996) Estimation of protein digestibility. IV. Digestive proteinases from the pyloric caeca of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) fed diets containing soybean meal. *Comparative Biochemistry and Physiology* **115B** (4), 533-540.
- Hajjou M., Smine A., Guerard F. & Le Gal Y. (1995) Purification and some properties of a carboxypeptidase B from dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **110B**(4), 791-798
- Hardy R.W. (1989) *Practical feeding salmon and trout*. pp. 185-203. In: T. Lovell (Ed.). *Nutrition and Feeding in Fish*. Van Nostrand Reinhold, A VI, NY.

- Harpaz S. & Uni Z. (1999) Activity of intestinal mucosal brush border membrane enzymes in relation to the feeding habits of three aquaculture fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology* **124A**: 155-160.
- Hernández S.A. (1987) Biología y pesquería de robalo blanco *Centropomus undecimalis*, (Bloch) en el río San Pedro, Tabasco. Tesis Profesional. ITMar. Boca del Río, Ver. México.
- Heussen C. & E. B. Dowdle. (1980) Electrophoretic analysis of palminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytic Biochemistry* **102**, 196-202.
- Hidalgo M.C., Urea E. & Sanz A. (1999) Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* **170**, 267-283.
- Hjelmeland K. Huse, I., Jorgensen T., Molvik G. & Raa J. (1983) Trypsin and trypsinogen as indices of growth and survival potential of cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Flodevigen Rapp* **3**, 1-17.
- Hofer R. & F. Schiemer. (1981) Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits. *Oecologia* (Berl) **48**, 342-345.
- Holt J.G., Faulk C.K. & Schwarz M.H. (2007) A review of the larviculture of cobia *Rachycentron canadum*, a warm water marine fish *Aquaculture* **268**, 181-187.
- Hsu H.W., D.L. Vavak, L.D. Satterlee & G.A. Miller. (1977) A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Science* **42**, 1269-1273.
- Ibarra-Castro L. & Duncan N.J. (2007) GnRH α -induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture* **272**, 737-746.
- Igbokwe E.C. & Downe A.E.R. (1978) Electrophoretic and histochemical comparison of three strains of *Aedes aegypti*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **60B**, 131-136.
- Jensen M.S., Jensen S.K. & Jakobsen K. (1997) Development of digestive enzymes in pigs with emphasis on lipolytic activity in the stomach and pancreas. *Journal of Animal Science* **75**, 437-445.
- Jónás E., M. Rágyanszki, J. Oláh & L. Boross. (1983) Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis* L.), herbivorous (*Hipophthalmichthys molitrix* Val.) and omnivorous (*Cyprinus carpio* L.) fishes. *Aquaculture* **30**, 145-154.
- Kageyama T., Tanabe K. & Koiwai O. (1990) Structure and development of rabbit pepsinogens. Stage-specific zymogens, nucleotide sequences of cDNAs, molecular evolution, and gene expression during development. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 17031-17038.
- Knights M. (1985) Energetics and fish farming. p. 309-340. In: *Fish Energetics, New Perspectives*. P. Tytler y P. Calow (Eds.) Cromm Helm. London and Sydney.
- Kolkovski S. (2001) Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* **200**, 181-201.

- Komar C., Turnbull J.F., Roque A., Fajer E. & Duncan N.J. (2004) Effect of water treatment and aeration on the percentage hatch of demersal, adhesive eggs of the bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*). *Aquaculture* **229**, 147-158
- Köprücü K. & Y. Özdemir. (2005) Apparent digestibility of selected feed ingredients for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* **250**, 308-316.
- Korostelev S.G., A.N. Nevalenny & O.E. Levchenko. (2005) Characterization of Digestive Enzymes in the Intestine of the Pacific Halibut *Hippoglossus stenolepis* Schmidt, 1904 and the Starry Flounder *Platichthys stellatus* (Pallas, 1788). *Russian Journal of Marine Biology* **31**(3), 196-199.
- Koshikawa N., Hasegawa S., Nagashima Y., Mitsuhashi K., Tsubota Y., Miyata S., Miyagi Y., Yasumitsu H. & Miyazaki K. (1998) Expression of Trypsin by Epithelial Cells of Various Tissues, Leukocytes, and Neurons in Human and Mouse. *American Journal of Pathology* **153**, 937-944.
- Koven W., Y. Barr, S. Lutzky, I. Ben-Atia, R. Weiss, M. Harel, P. Behrens & A. Tandler. (2001a) The effect of dietary arachidonic acid 20:4n-6 on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture* **193**, 107-122.
- Koven W., S. Kolkovski, E. Hadas, K. Gamsiz & A. Tandler. (2001b) Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. *Aquaculture* **194**, 107-121.
- Kumar S., R.M. Rathore & R. Chakrabarti. (2005) Digestive enzyme study of hybrid of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) x Bighead (*Aristichthys nobilis*) during ontogeny. *Larvi`05 – Fish & Shellfish Larviculture Symposium*, Belgium.
- Kunitz M. (1947) Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *Journal of Genetic and Physiology* **30**, 291-310.
- Kurokawa T. & Suzuki T. (1996) Formation of the diffuse pancreas and the development of digestive enzyme synthesis in larvae of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* **141**, 267-276.
- Kvåle A., Mangor-Jensen A., Moren M., Espe M. & Hamre K. (2007) Development and characterization of some intestinal enzymes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. *Aquaculture* **264**, 457-468.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lau S.R. & Shafland P.L. (1982) Larval development of snook, *Centropomus undecimalis* (Pisces: Centropomidae). *Copeia*. **3**, 618-627.
- Lauff M. & R. Hauffer. (1984) Protolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture* **37**, 335-346.
- Lazo J.P., Mendoza R., Holt G.J., Aguilera C. & Arnold C.R. (2007) Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* **265**, 194-205.

- Lambertsen G. (1985) Digestive lipolytic enzymes in cod (*Gadus morhua*): Fatty acid specificity. *Comparative Biochemistry and Physiology* **80B**, 447–450.
- Lehninger A.L. (1995) Bioquímica. OMEGA. Barcelona, España.
- Lowerre-Barbieri K.S., F.E. Vose & J.A. Whittington. (2003) Catch-and-release fishing on a spawning aggregation of common snook: Does it affect reproductive output?. *Transactions of the American Fisheries Society* **132**, 940-952.
- Lundsted L.M., Melo, J.F.B. & G. Moraes. (2004) Digestive enzymes and metabolic profile of sulfuriformes pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) in response to different diet composition. *Comparative Biochemistry and Physiology* **137A**, 331-339.
- Lundsted L.M., J.F.B. Melo, C.S. Neto & G. Moraes. (2002) Diet influences proteolytic enzyme profile. p. 33-44. In: *Fish Biology Congress, 2002*, Vancouver. Fish Biology Congress 2002. Vancouver.
- Ma H., C. Cahu, J. Zambonino, H. Yu, Q. Duan, M. G. Le & K. Mai. (2005) Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Aquaculture* **245**(1-4), 239-248.
- MacDonald R.J., Swift G.H., Quinto C., Swain W., Pictet R.L., Thomas G. & Rutter W.J. (1980) Structure of a family of rat amylase genes. *Nature* **287**, 117-122.
- Maraux S., Louvard D. & Baratti J. (1973) The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochimie et Biophysia Acta* **321**, 282-295
- March B.E., C. Macmillan & F.W. Ming. (1985) Techniques for evaluation of dietary protein quality for the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* **47**, 275-292.
- Marshall A.R. (1958) A survey of the snook fishery of Florida, with studies of the biology of the principal species, *Centropomus undecimalis* (Bloch). *Florida State Bd. Conservation Technological Services* **22**, 5-37.
- Mathews C.K. & K.E. Van Holde. (1998) Bioquímica, Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid, España.
- Matus de la P.A., A. Rosas, J.P. Lazo & M.T. Viana. 2007. Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. *Fish Physiology and Biochemistry* **33**, 223–231.
- Morais S., Rojas-García C.R., Conceição L.E.C., Rønnestad I. (2005) Digestion and absorption of a pure triacylglycerol and a free fatty acid by *Clupea harengus* L. larvae. *Journal of Fish Biology* **67**, 223-238.
- Moyano F.J., Barros A.M., Prieto A., Cañavate J.F. & Cardenas S. (2005) Evaluación de la ontogenia de enzimas digestivas en larvas de hurta, *Pagrus auriga* (Pisces: Sparidae). *AquaNIC* **22**, 39-47.

- Moyano F.J., Diaz M., Alarcon F.J. & Sarasquete M.C. (1996) Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry* **15**, 121-130.
- Moyano F.J., I.M. Díaz, M.D. López & F.J. Alarcón. (1999) Inhibition of digestive proteases by vegetable meals in three fish species; seabream (*Sparus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African sole (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **122B**, 327–332.
- Moyano F.J., F.J. Alarcón & M. Díaz. (1998) Comparative biochemistry of fish digestive proteases applied to the development of in vitro digestibility assays. *Comparative Biochemistry and Physiology* **5**, 135-143.
- Moyano F.J., M. Diaz, F.J. Alarcón & M.C. Sarasquete. (1996) Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry* **15**, 121-130.
- Munilla-Morán R. & Saborido-Rey F. (1996) Digestive enzymes in marine species. I. Proteinase activities in gut from red fish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **113B**, 395-402.
- Munilla-Morán R. & Stark J.R. (1990) Metabolism in marine flatfish- VI. Effect of nutritional state on digestion in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology* **95B**(3): 625-53.
- Murray H.M., Gallant J.W., Perez-Casanova J.C., Johnson S.C. & Douglas S.E. (2003) Ontogeny of lipase expression in winter flounder. *Journal of Fish Biology* **62**, 816-833
- Nankervis L. & P.C. Southgate. (2006) An integrated assessment of gross marine protein sources used in formulated microbond diets for Barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* **257**, 453-464.
- Natalia Y., R. Hashim, A. Ali & A. Chong. (2004) Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquaculture* **233**, 305–320.
- Neurath H. (1989) The diversity of proteolytic enzymes. pp. 1-13. In: *Proteolytic Enzymes*. Beynon, R y Bond, J.S. (Eds.). IRL Pres Oxford. UK.
- NGS (1986) Aging of common snook *Centropomus undecimalis* larvae using sagittal daily growth rings. *Northeast Gulf Science* **8**(2), 173-175.
- Nishide T., Nakamura Y., Emi M., Yamamoto T., Ogawa M., Mori T. & Matsubara K. (1986) Primary structure of human salivary alpha-amylase gene. *Gene* **41**, 299-304.
- Oku H., Koizumi N., Okumura T., Kobayashi T. & Umino T. (2006) Molecular characterization of lipoproteine lipase, hepatic lipase and pancreatic lipase genes: Effects of fasting and refeeding on

- their gene expression in red sea bream *Pagrus major*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **145B**, 168-178.
- Oña C., F.J. Alarcón, M. Díaz & E. Abellán. (2003) Estudio comparativo de la degradación *in vitro* de proteínas por las proteasas estomacales de Denton (*Dentex dentex*), Pargo (*Pagrus Pagrus*) y el híbrido *Dentex x Pagrus*. II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (CIVA), 540-549.
- Oña C., F.J. Alarcón, M. Díaz & E. Abellán. (2005a) Hidrólisis proteica *in vitro* de materias primas de diferente calidad por las proteasas intestinales de tres esparidos. X Congreso Nacional de Acuicultura, Almería España.
- Oña C., F.J. Alarcón, M. Díaz & E. Abellán. (2005b) Efecto de los inhibidores presentes en harinas vegetales sobre las proteasas intestinales de dos espáridos y su híbrido. X Congreso Nacional de Acuicultura, Almería España.
- Paech C., T. Christianson & K. Maurer. (1993) Zymogram of proteases made with developed film from nondenaturing polyacrylamide gels after electrophoresis. *Analytic Biochemistry* **208**, 249-256.
- Payne R.M., Sims H.F., Jennens M.L. & Lowe M.E. (1994) Rat pancreatic lipase and two related proteins: Enzymatic properties and mRNA expressions during development. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology* **266**, G914-G921.
- Pedersen B.H. & Andersen K.P. (1992) Induction of trypsinogen in herring larvae (*Clupea harengus*). *Marine Biology* **112**, 559-567.
- Pedersen B. & B.O. Eggum. (1983) Prediction of protein digestibility by an *in Vitro* enzymatic pH-STAT procedure. *Journal of Animal Physiology* **49**, 265-277.
- Pedersen B.H., E.M. Nielsen & K. Hjelmeland. (1987) Variations in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring (*Clupea arengus*) digesting copepod nauplii. *Marine Biology* **94**, 171-181.
- Perales-García N. (2010) Ontogenia enzimática de la mojarra tenguayaca *Petenia splendida*. Tesis de Maestría, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 93 p.
- Péres A., Cahu C.L. & Zambonino-Infante, J.L. (1997) Dietary spermine supplementation induces intestinal maturation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* **16**, 479-485.
- Péres A., Cahu C.L., Zambonino-Infante J.L., Legall M.M. & Quazuguel P. (1996) Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the developmental stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* **15**, 237-242.
- Péres A., Zambonino-Infante J.L. & Cahu C.L. (1998) Dietary regulation of activities and RNAm levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* **19**: 145-152.

- Pérez J.J., G.A. Wicki, F.J. Moyano & F.J. Alarcón. (2003) Evaluación del efecto de inhibidores de proteasa presentes en ingredientes vegetales utilizables en piensos para dos especies piscícolas cultivadas en Argentina; Pacú (*Piaractus mesopotamicus*) y Pejerrey (*Odontesthes bonaeriensis*). *II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (CIVA)*. 442-453.
- Peyronel D.V. & A.M. Cantera. (1995) A simple and rapid technique for postelectrophoretic detection of proteases using azocasein. *Electrophoresis* **16**, 1894-1897.
- Quiroga B.C., Solís C.F. & Estrada J. (1996) La pesquería de robalo en México. Pesquerías Relevantes de México. XXX Aniversario del INP. *SEMARNAP/INP* (II), 559-578.
- Ramirez A.B. & Cerqueira V.R. (1994) Feeding behavior of young robalo (*Centropomus undecimalis* Bloch, 1792). I. The effect of chemical attractants. *Aquaculture* **124**(1), 289-290.
- Ribeiro L., Zambonino-Infante J.L., Cahu C. & Dinis M.T. (2002) Digestive enzymes profile of *Solea senegalensis* post larvae fed Artemia and a compound diet. *Fish Physiology and Biochemistry* **27**, 61-69.
- Ribeiro L., Zambonino-Infante J.L., Cahu.C. & Dinis M.T. (1999) Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture* **170**, 465-473.
- Riche M. & P.B. Brown. (1992) Availability of phosphorus from feedstuffs fed to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* **142**, 269-282.
- Ríos-Duran M.G. (2000) Actividad proteolítica en larvas de pez blanco *Chirostoma estor copandaro* (Pisces: Atherinidae): Implicaciones para su cultivo. Tesis de Maestría. UMSNH. 53 p.
- Rivera S.M. (2003) Purification and characterization of trypsin from intestinal and pyloric caecal tissues of the silk snapper, *Lutjanus vivanus* (Cuvier 1828). Tesis de Maestría, 40 p.
- Roberts D.E. Jr. (1987) Induced Maturation and Spawning of Common Snook, *Centropomus undecimalis*. Library of Congress Catalog Card number: 52-33786. Miami, Florida. 222-230. *Proceedings of the thirty-eighth annual*, Gulf and Caribbean Fisheries Institute.
- Robynt J.F. & Whelan W.J. (1968) In: *Starch and its Derivates*. Radley JA (ed) Chapman and Hall, London.
- Rodríguez M.A.R. (2004) Purification and kinetic characterization of trypsin from the intestine and pyloric caeca of the white grunt, *Haemulon plumierii*, (Lacepède, 1801). Tesis de Maestría, 29 p.
- Rosenlaud G., J. Stoss & C. Talbot. (1997) Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. *Aquaculture* **155**, 183-191.
- Rungruangsak-Torrissen K., A. Rustad, J. Sunde, S.A. Eiane, H.B. Jensen, J. Opstvedt, E. Nygard, T.A. Samuelsen, H. Mundheim, U. Luzzana & G. Venturini. (2002) In vitro digestibility based on fish crude enzyme Extract for prediction of feed quality in growth trials. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**, 644-654.

- Sáenz R.M., Alarcón F.J., Martínez M.I., Ruiz F., Díaz M. & Moyano F.J. (2005) Caracterización de las proteasas digestivas del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* **21**(1-4), 95-104.
- SAGARPA 2004. La Pesquería de Robalo del Golfo de México. Anuales de la Secretaría de Pesca, México pp. 773-792.
- Salvensen, G. & H. Nagase. (1989) Inhibition of proteolytic enzymes. pp. 83-104. In: *Proteolytic enzymes*. R. Beynon and J. S. Bond (Eds.). IRL Press Oxford. UK.
- Sánchez-Zamora A., C.V. Rosas, V.L. Durruty & J.B. Suárez. (2002) Reproducción en cautiverio de robalo: Una necesidad inaplazable en el sureste Mexicano. *Panorama Acuícola* **7**(5), 24-25.
- Sánchez-Zamora A., T.G. García, L.M.D.D. Gómez & J.B. Suárez. (2003) Cultivo de robalo blanco *Centropomus undecimalis*: Aspectos reproductivos y crecimiento de juveniles. IV Reunión Nacional de Redes de Investigación en Acuicultura P. 293-300.
- Satterlee L.D., H.F. Marshall & J.M. Tennyson. (1979) Measuring protein quality. *J. A. O. C. S.* **56**, 103-109.
- Saunders, R.M., M.A. Conner, A.N. Booth, E.M. Bickoff & G.O. Kohler. (1972) Measurement of digestibility of alfalfa concentrates by in vivo and in vitro methods. *Journal of Nutrition* **103**, 530-535.
- Savoie L. & S.F. Gauthier. (1986) Dialysis cell for the in vitro measurement of protein digestibility. *Journal of Food Science* **51**, 494-498.
- Seaman W.Jr., & M. Collins. (1983) Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (South Florida) -- snook. U.S. Fish Wildl. Serv. FWS/OBS-82/11.16. *U.S. Army Corps of Engineers*, TR EL-82-4. 16 p.
- Shaozhen F., Wensheng L. & Haoran L. (2008) Characterization and expression of the pepsinogen C gene and determination of pepsin-like enzyme activity from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) *Comparative Biochemistry and Physiology* **149B**, 275-284.
- Sheffner A.L., G.A. Eckfeldt & H. Spector. (1956) The pepsin-digestive residue (PDR) amino acid index of protein utilization. *Journal of Nutrition* **60**, 105-120.
- Sherwood N.M., Grier H.J., Warby C., Peute J. & Taylor R.G. (1993) Gonadotropin-releasing hormones, including a novel form, in snook *Centropomus undecimalis*, in comparison with forms in black sea bass *Centropristis striata*. *Regulation Peptides* **46**(3), 523-34.
- Shiau S. & H. Liang. (1995) Carbohydrate utilization and digestibility by tilapia, *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*, are affected by chromic oxide inclusion in the diet. *Journal of Nutrition* **125**, 976-982.
- Sidell B.D. & Hazel J.R. (2002) Triacylglycerol lipase activities in tissues of Antarctic fishes. *Polar Biology* **25**, 517-522.
- Smith T.K., Tapia-Salazar M., Cruz-Suarez L.E. & Ricque-Marie D. (2000) Feed-borne biogenic amines: natural toxicants or growth promoters? pp. 24-32. In: *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias*

- del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Olvera-Novoa MA, Civera-Cerecedo R (eds) Nov 19-22. Mérida, Yucatán, México.
- Sorgeloos P. (1980) The use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture. pp. 25–46. In: *The brine shrimp Artemia. Ecology, culturing and use in aquaculture*, Persoone, G., Sorgeloos, P., Ž. Roels, O., Jaspers, E. (Eds.). vol. 3. Universal Press, Wetteren.
- Souza A.A.G., Amaral I.P.G., Albérico R.E.S., Carvalho L.B. & Bezerra R.S. (2007) Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). *Food Chemistry* **100**, 1429-1434.
- Srivastava A.S., Kurokawa T. & Suzuki T. (2002) mRNA expression of pancreatic enzyme precursors and estimation of protein digestibility in first feeding larvae of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **132A**, 629-635.
- Stauffer C. (1989) Enzyme Assays for Food Scientists. Van Nostand Reinhold/AVI, New York. 552 p.
- Steffens W. (1989) Principles of fish nutrition, Ellis Horwood, London. 384 p.
- Stephen R. & Shafland P. (1982) Larval development of snook, *Centropomus undecimalis* (Pisces: Centropomidae). *Copeia* **3**, 618-627.
- Stoknes I. & Rustand T. (1995) Purification and characterization of multicatalytic proteinase from Atlantic Salmon (*Salmo salar*) muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology* **111B**(4), 587- 596.
- Stroud R. (1975) A family of proteins-cutting proteins. *Scientific American* **231**(1), 74-89.
- Sunde J. (2006) Digestive protease activities, growth and feed utilisation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Degree Doctor Scientiarium (Dr. Scient). University of Bergen. Norway.
- Tacon A.G.J. (1993) Feed ingredients for warmwater fish: fish meal and other processed feedstuffs. FAO Fisheries Circular 845: 64 p.
- Tacon A.G.J. (1995) Application of nutrient requirement data under practical conditions: special problems of intensive and semi-intensive fish farming. *Journal of Applying Ichthyology* **11**, 205-214.
- Tanji M., Yakabe E., Kubota K., Kageyama T., Ichinose M., Miki K., Ito H. & Takahashi K. (2009) Structural and phylogenetic comparison of three pepsinogens from Pacific bluefin tuna: Molecular evolution of fish pepsinogens. *Comparative Biochemistry and Physiology* **152B**, 9-19.
- Tarcisio T., Vinicius R. & Brown J. (2005) Early weaning of fat snook (*Centropomus parallelus* Poey 1864) larvae. *Aquaculture* **253**, 334-342.
- Taylor R.G., J.A. Whittington & D.E. Haymans. (2001) Catch-and-release mortality rates of common snook in Florida. *North American Journal of Fisheries Management* **21**, 70-75.
- Tengjaroenkul B., B.J. Smith, T. Caceci. & S.A. Smith. (2000) Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., *Aquaculture* **182**, 317–327.

- Tramati C., B. Savona & A. Mazzola. (2005) A study of the pattern of digestive enzymes in *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777) (Osteichthyes, Sparidae): evidence for the definition of nutritional protocols. *Aquaculture International* **13**, 89-95.
- Tringali D.M. & T.M. Bert. (1996) The genetic stock structure of common snook (*Centropomus undecimalis*), *Canadian Journal of Fishery and Aquatic Science* **53**, 974-984.
- Tucker Jr., W.J. & S.W. Campbell. (1988) Spawning season of common snook along the east central Florida coast. *Quarterly Journal of the Florida Academy of Sciences*, **51**(1), 1-5.
- Tucker Jr., W.J. (1998) Marine fish culture. Kluger Academic Publishers, Massachusetts, E.U.A. 750 p.
- Tucker Jr., W.J. (2003) Snook culture. *World Aquaculture*. Dec, 42-46.
- Tucker Jr., W.J. (1987) Snook and tarpon culture and preliminary evaluation for commercial farming. *Progressive Fish Culturist* **49**, 49-57.
- Ueberschäer B. (1993) Measurement of proteolytic enzyme activity: Significance and application in larval fish research. pp. 233-239. In: *Physiological and biochemical aspects of fish development*, Walther B T, Fyhn H J (eds). part III, Univ. of Bergen, Norway.
- Ugolev A.M., Yegorova V.V., Kuz'mina V.V. & Gruzdkov A.A. (1983) Comparative molecular characterization of membrane digestion on fish and mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology* **76B**, 627-635.
- Uys W. & Hecht T. (1987) Assays on the digestive enzymes of sharp-tooth catfish, *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae). *Aquaculture* **63**, 301-313.
- Uys W., T. Hecht & M. Walters. (1987) Changes in digestive enzyme activities of *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae) after feeding. *Aquaculture* **63**, 243-250.
- van Tilbeurgh H., Sarda L., Verger R. & Cambillau C. (1992) Structure of the pancreatic lipase-procolipase complex. *Nature* **359**, 159-162.
- Vendrell J., Querol E. & Avilés F.X. (2000) Metalloproteases and their protein inhibitors Structure, function and biomedical properties. *Biochimica et Biophysica Acta* **1477**, 284-298.
- Versaw W., Cuppett S.L., Winters D.D. & Williams L.E. (1989) An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *Journal of Food Science* **54**, 232-254.
- Versichelle D., Léger P., Lavens P. & Sorgeloos P. (1989) L'utilisation d'artémia. p. 241-259. In: *Aquaculture. Technique et Documentation*, Barnabé G (ed), Lavoisier, Paris.
- Wainwright P.C., Huskey S.H., Turingan R.G. & Carroll A.M. (2006) Ontogeny of suction feeding capacity in snook, *Centropomus undecimalis*. *Journal of Experimental Zoology* **305**(3), 246-52.
- Wallace A.R., S.M. Boyle, H.J. Grier, K. Selma & T.R. Petrino. (1993) Preliminary observations on oocyte maturation and other aspects of reproductive biology in captive female snook, *Centropomus undecimalis*. *Aquaculture* **116**, 257-273.

- Walter H.E. (1984) Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. pp 270-277. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer HJ (ed) Vol. V, Verlag Chemie Weinham.
- Wang H., Y. Wang, Q. Wang, C. Xue & M. Sun. (2006) Purification and characterization of stomach protease from the turbot (*Scophthalmus maximus L.*). *Fish Physiology and Biochemistry* **32**, 179–188.
- Watanabe T., C. Kitajima & S. Fujita. (1983) Nutritional value of live organism used in Japan for mass propagation of fish: A review. *Aquaculture* **34**, 115-143.
- Weber K. & M. Osborn. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Biology and Chemistry* **244**, 4406-4412.
- Wedermeier K. (1989) Zur methode der kunstlinchen verdauung stickstoffhaltiger futterbestandeile. *Landwirtschaftlichen Versuchsstationen* **51**, 375-385.
- Whitaker J.R. (1994) Principles of enzymology for the food sciences. 2da Edición Marcel Dekker, INC, New York. 789 pp.
- Williams D.E. & Reisfeld R.A. (1964) Disc electrophoresis in polyacrylamide gels: extension to new conditions of pH and buffers. *Annals of New York Academic of Science* **121**, 373-381.
- Yañes-Roca C., Rhody N., Nystrom M., Main K.L. (2009) Effects of fatty acid composition and spawning season patterns on egg quality and larval survival in common snook. *Aquaculture* **287**(3), 335-340.
- Yoshinaka R., Sato M., Tanaka H. & Ikeda S. (1985) Some enzymatic properties and digestive function of a pancreatic metalloproteinase in the catfish (*Parasilurus asotus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **80B**(2), 223-226.
- Zambonino-Infante J.L. & Cahu C. (1994) Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* **12**(5), 399-408.
- Zambonino-Infante J.L. & Cahu C.L. (2001) Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology* **130C**, 477-487.
- Zambonino-Infante J.L. & Cahu C.L. (2007) Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: applications to diet formulation. *Aquaculture* **268**, 98-105.
- Zarza-Meza E.A., J.M. V. Berruecos, C.P. Vásquez & P.T. Álvarez. (2006) Experimental culture of common snook *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) and fat snook *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) (Perciformes: Centropomidae) in freshwater in concrete pond in Alvarado, Veracruz, Mexico. *Vet Mex* **37**(3), 327-333.
- Zarza-Meza E.A., J.M.V. Berruecos, C.P. Vásquez & P.T. Álvarez. 2006. Cultivo experimental de robalo *Centropomus undecimalis* y chucumite *Centropomus parallelus* (Perciformes: Centropomidae) en estanques rusticos de tierra. *Ciencias Marinas*. **32**, 145-153.