

Bioquímica Digestiva en Especies Acuicultivadas: Aplicaciones en Nutrición

Fco. Javier Moyano López

Dpto. Biología Aplicada. Esc. Politécnica Sup. Univ. Almería

04120. Almería. España

E-mail: fjmoyano@ual.es

Resumen

El estudio de las enzimas digestivas, sus características, funcionalidad y adaptaciones al régimen alimenticio, conforman uno de los campos de investigación más amplios e interesantes en la nutrición de especies acuicultivadas. Un gran número de investigaciones han abordado aspectos que van desde la descripción de los parámetros funcionales de las principales enzimas hasta la forma en que éstas pueden ser utilizadas para modelizar la digestión en una especie concreta o su papel como indicadores de la condición nutricional durante la etapa larvaria. El presente trabajo pretende llevar a cabo un repaso somero a todos estos aspectos, planteando además las perspectivas de futuras investigaciones en bioquímica de la digestión.

Introducción

La producción animal acuática, como cualquier otra actividad orientada a producir alimento, es en esencia un proceso de transformación energética. Se caracteriza por utilizar diferentes especies de moluscos, crustáceos y peces para transformar la energía contenida en una serie de materias primas (harinas vegetales y animales que en buena parte no son aprovechadas directamente por los humanos) en otro tipo de energía, que queda retenida en sus tejidos y sí es directamente utilizable, además de presentar otros valores añadidos. Desde esta perspectiva, se pone de manifiesto que el fundamento de todo el proceso reside en conocer en detalle tanto las necesidades nutricionales de las diferentes especies como la mejor forma de cubrirlas mediante programas adecuados de alimentación y que, en última instancia, los conocimientos en genética, reproducción o patología van orientados a mantener en las mejores condiciones la base animal necesaria para dicha transformación energética, tanto en número como en aptitud productiva. En este sentido, el gran reto actual de la alimentación en especies acuáticas es encontrar un compromiso óptimo entre dos aspectos esenciales: de una parte, maximizar el rendimiento técnico de la producción, mediante el desarrollo de los alimentos más adecuados a las necesidades fisiológicas de cada especie en sus diferentes etapas de crecimiento. De otra, maximizar el rendimiento económico, mediante el desarrollo de los alimentos más adecuados desde una perspectiva tecnológica, considerando tanto el valor nutritivo como el coste, disponibilidad y facilidad de procesado de las diferentes materias primas.

En este contexto destaca de manera especialmente relevante la función del aparato digestivo. Su extraordinario papel es el de actuar como interfase entre el alimento y el organismo animal, dado que en él se lleva a cabo la manipulación inicial, hidrólisis y transferencia de los nutrientes hacia el interior del cuerpo. En todas estas funciones, cumplen un papel primordial diferentes enzimas, tanto las que inician la degradación de las macromoléculas en los primeros compartimentos del tracto digestivo, como las que completan dicha transformación y colaboran en la absorción de los principios inmediatos a nivel del epitelio intestinal. De aquí se deduce la gran importancia de obtener un conocimiento detallado de tales enzimas, cuyo funcionamiento se ve afectado en diferente medida por un buen número de factores ligados tanto a la fisiología del animal, como a las características del alimento o la forma en que este es suministrado. Dicho conocimiento posee indudables repercusiones de índole práctica en la optimización de la alimentación de las diferentes especies.

La Importancia de Estudiar las Enzimas Digestivas para la Acuicultura

El tipo y funcionalidad de las enzimas digestivas presentes en cualquier especie acuática es el resultado de un proceso evolutivo en el que el principal factor de selección ha sido sin duda el régimen alimenticio, tanto desde el punto de vista de la composición de los alimentos ingeridos preferentemente como de las pautas de alimentación. Cuando los humanos han seleccionado especies acuáticas para su cría en cautividad, con frecuencia han modificado de manera radical tanto las características del alimento suministrado en relación al alimento natural de dicha especie (tipo de ingredientes, densidad energética y proteica, aspecto físico, palatabilidad) como las pautas de alimentación en relación con los ritmos biológicos normales o la edad de los

Fco. Javier Moyano López. 2006. Bioquímica Digestiva en Especies Acuicultivadas: Aplicaciones en Nutrición. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15 - 17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.

individuos. Todas estas modificaciones tienen profundas repercusiones en la efectividad con que el alimento es procesado, en buena medida porque las enzimas digestivas:

- Pueden no ser producidas en cantidad suficiente para mantener una relación enzima/sustrato adecuada a la composición de dicho alimento,
- Pueden no estar actuando en las condiciones más adecuadas en cuanto a pH y/o temperatura,
- Pueden estar siendo afectadas por sustancias presentes en el alimento que las inhiban o las inactiven parcialmente.

Cada uno de estos aspectos plantea diferentes líneas de investigación que han sido abordadas en mayor o menor medida para diferentes especies. De hecho, existe una ingente cantidad de trabajos sobre bioquímica digestiva en especies de organismos acuáticos, pero dada la gran variabilidad existente, la información obtenida en especies salvajes sólo puede ser extrapolada en parte a las mantenidas en cultivo. Desde un punto de vista descriptivo, el estudio de la bioquímica digestiva en las especies acuicultivadas tendría como objetivos determinar cuantitativa y cualitativamente las enzimas presentes en las diferentes especies y sus variaciones a lo largo del desarrollo así como estudiar los factores que influyen en su producción y condicionan su actividad. A partir de esta información se derivan una serie de aplicaciones prácticas que permiten por ejemplo:

- Mejorar la selección de los ingredientes más adecuados para utilizar en los piensos para cada especie, considerando tanto la susceptibilidad a ser hidrolizados como su contenido en factores antinutritivos que puedan afectar el funcionamiento de las enzimas.
- Adecuar las pautas de alimentación a los ritmos de secreción y a las tasas de hidrólisis de los sustratos que presentan dichas enzimas.

Pero existen además otros posibles campos de aplicación derivados de un conocimiento de la bioquímica digestiva, tales como:

- Utilizar la inhibición parcial (por ejemplo de las pepsinas estomacales) para reducir la acción sobre sustancias bioactivas que deban ser absorbidas en el intestino.
- Llevar a cabo suplementaciones de enzimas que faciliten la hidrólisis de macronutrientes en determinadas condiciones de baja producción natural (larvas y juveniles, época invernal en el engorde).
- Llevar a cabo suplementaciones con enzimas no presentes en el digestivo del pez que mejoren la utilización de determinados compuestos (p. ej. fitasas).

- Desarrollar modelos que permitan simular *in vitro* la digestión del alimento efectuada por una especie concreta.
- Emplear la actividad de las enzimas como indicador del estado nutricional del animal.
- Utilizar las enzimas digestivas como indicadores de selección, evaluando la posible presencia en las poblaciones de individuos con isoformas enzimáticas que pudieran representar una ventaja funcional.

A continuación se resumen algunos de los resultados obtenidos en diferentes trabajos que han abordado los aspectos antes indicados. Dada la amplitud del tema a tratar, la presente revisión se ha centrado en los estudios realizados sobre enzimas de peces, para los cuales existe mucha mayor bibliografía, aunque el planteamiento general podría ser válido para otros grupos de organismos acuicultivados como crustáceos o moluscos. Se comprobará igualmente que dentro de las enzimas digestivas, se presta especial atención a las proteasas; esto es debido a su papel fundamental en la hidrólisis de la proteína, el nutriente clave para la alimentación de la inmensa mayoría de las especies cultivadas en la actualidad.

Estudios Descriptivos

Estudios de purificación y caracterización de enzimas

El número de trabajos realizados con este objetivo es muy considerable y abarca por tanto un gran número de especies; no obstante, la mayoría de ellos se han realizado en especies que no son cultivadas y la justificación más frecuente suele ser la búsqueda de una aplicación en el campo de la tecnología de alimentos, más que el obtener un conocimiento aplicable a la alimentación de las especies en cuestión (Haard, 1992). Dentro de los realizados en especies cultivadas, las especies más estudiadas han sido los salmónidos y ciprínidos (Bradford, 1960; Cohen *et al.*, 1981; Dimes *et al.*, 1994, Kurtovic *et al.*, 2006), pero también se han estudiado las enzimas de otras especies como el lenguado (Clark *et al.*, 1985), el bacalao (Beirao *et al.*, 2001) o la tilapia (Becerra *et al.*, 2005)

En general, estos trabajos se basan en la purificación de enzimas digestivas, a partir de extractos tisulares de diverso origen y su objetivo es la caracterización funcional de las mismas. Algunos de estos estudios se ha llevado a cabo empleando extractos escasamente purificados, por lo que los resultados obtenidos no se refieren a una única enzima sino al conjunto de actividades de tipo proteasa o amilasa presente en el digestivo del animal. De hecho, la gran mayoría de los estudios descriptivos de este tipo se refieren a la actividad de tipo proteasa (y dentro de ella a las proteasas alcalinas presentes en el intestino), pero destaca la escasez de estudios sobre purificación y caracterización de amilasas y particularmente de lipasas. En el caso de las proteasas, una vez purificadas empleando diferentes procedimientos, siendo el más frecuente la cromatografía de afinidad, se procede a establecer sus parámetros operacionales (pH y temperatura óptimas) y cinéticos (velocidad de reacción o afinidad para sustrato), así como a evaluar otros aspectos como la sensibilidad frente a inhibidores específicos, con objeto de conocer con más detalle su

Fco. Javier Moyano López. 2006. Bioquímica Digestiva en Especies Acuicultivadas: Aplicaciones en Nutrición. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15 - 17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.

mecanismo de acción. A pesar de los numerosos estudios existentes, resulta difícil comparar los valores de capacidad catalítica de las enzimas de distintas especies, ya que los parámetros cinéticos han sido determinados con sustratos diferentes, no obstante, en líneas generales se puede decir por ejemplo que las proteasas de peces muestran una elevada afinidad por su sustrato y velocidades de reacción iguales o superiores a las que presentan sus homólogas de animales terrestres.

Estudios descriptivos sobre el tipo y actividad de las enzimas presentes en el digestivo de una especie.

Estos trabajos normalmente se orientan hacia la realización de un barrido general para establecer el conjunto de actividades enzimáticas presentes en el digestivo de una o varias especies. En su práctica totalidad se basan en el empleo de extractos escasamente purificados pero su objetivo no es tanto identificar la presencia de una enzima concreta sino establecer la importancia relativa de un conjunto de actividades (endo y exoproteasas, amilasa, lipasa, etc.) en el digestivo de una especie. Algunos de estos estudios realizan la comparación entre especies próximas o muy diferentes para establecer similitudes y/o diferencias y de aquí extraer algunas conclusiones acerca del potencial digestivo de la especie estudiada (Munilla-Morán & Saborido, 1996; Alarcón *et al.*, 1998; Tengjaroenkul *et al.*, 2000; Furné *et al.*, 2005). Aunque la mayor parte de tales trabajos se centran en las proteasas, también algunos prestan especial atención a las carbohidrasas (Chiu & Benítez, 1981; Alarcón *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2001;). En buena medida estos trabajos realizan el mismo tipo de determinaciones que se llevan a cabo con enzimas purificadas (óptimos de pH y temperatura para las distintas actividades, estabilidad frente a variaciones de pH y temperatura, etc.), pero dado que el momento de muestreo y el historial alimenticio de los animales empleados influye enormemente en la cantidad de actividad, los datos obtenidos por un autor son en general veces difíciles de comparar con los de otros.

Una categoría especial de estos estudios se centra en evaluar el desarrollo de las diferentes actividades enzimáticas durante las primeras semanas de vida de los peces. Hace algunos años eran bastante escasos, pero en la actualidad, debido al creciente número de especies que se adaptan al cultivo pudiendo criarse desde las etapas larvarias, se ha multiplicado el número de trabajos que abordan este aspecto (Baglolle *et al.*, 1998; Segner *et al.*, 1994, Gawlicka *et al.*, 1995; Moyano *et al.*, 1996, Martínez *et al.*, 1999). La principal utilidad de tales estudios, además de evaluar las diferencias entre especies, es establecer mediante los niveles de actividad el grado de madurez funcional de aparato digestivo y por tanto la mayor o menor dependencia respecto al suministro de alimento vivo (de más fácil digestión). Resultan estudios de gran interés para determinar igualmente el momento más adecuado para llevar a cabo el destete. Una objeción recurrente en muchos de estos estudios es que, a diferencia de los llevados a cabo con adultos, el pequeño tamaño y la fragilidad de las larvas hacen muy difícil aislar el tejido secretor del resto del organismo, por lo que los extractos se preparan normalmente mediante homogenización de individuos completos. En general esto representa un muy pequeño porcentaje de contaminación o sobreestimación de actividades debido al bajo contenido comparativo de enzimas intracelulares y al hecho de que las condiciones de ensayo que suelen establecerse resultan adecuadas para las proteasas alcalinas del digestivo, pero no para las catepsinas lisosomales. Por otra parte, la gran

variabilidad existente entre el estado nutricional y de desarrollo que puede encontrarse en un mismo grupo de larvas hace que los estudios de este tipo llevados a cabo usando pools de larvas ofrezcan sólo una aproximación a la situación real de desarrollo de las diferentes actividades en un momento dado. En la actualidad es posible realizar las determinaciones sobre una única larva aislada empleando sustratos fluorescentes altamente sensibles (Izquierdo & Henderson, 1998, Cara *et al.*, 2006).

Factores que influyen en la producción de las enzimas.

Se trata de estudios de corte fisiológico que buscan determinar los mecanismos que activan y regulan la secreción de las enzimas. Aunque los peces, presentan diferencias anatómicas significativas en sus tejidos secretores en relación con los vertebrados terrestres, muestran mecanismos de regulación muy semejantes. El importante papel de la colecistoquinina en la secreción de las proteasas ha sido puesto de manifiesto en diferentes estudios realizados tanto en peces adultos (Einarsson *et al.*, 1997; Olson *et al.*, 1999) como en larvas (Koven *et al.*, 2002; Rojas-García *et al.*, 2002; Cahu *et al.*, 2004). Igualmente, las interacciones entre la ingesta de determinados aminoácidos, la secreción de colecistoquinina y la producción de tripsina ha sido evidenciada en estudios recientes (Ronnestad *et al.*, 2001). El papel activador de la glutamina sobre la maduración del intestino, incluyendo las enzimas ligadas al epitelio ha sido recientemente puesto de manifiesto en carpas (Yan & Qiu-Zhou, 2006).

Por otra parte, algunos estudios se han centrado en identificar la posible existencia de patrones internos de secreción enzimática que resulten independientes de la presencia de alimento en el digestivo (Maragoudaki *et al.*, 2001; Sánchez-Muros *et al.*, 2003). Algunos autores han propuesto que incluso la intensidad y duración de la iluminación puede tener un efecto sobre la secreción de enzimas digestivas (McKenzie *et al.*, 1999; Cuvier-Péres *et al.*, 2001).

Estudios Aplicados

Variaciones de la secreción enzimática con el cambio de alimento.

Un significativo número de trabajos ha evaluado los cambios producidos en la bioquímica digestiva como resultado de modificar la composición del alimento, principalmente variando la proporción de macronutrientes del mismo. En tales trabajos, la mayor parte de los cuales se ha basado en modificar los contenidos en proteína de la ración, se evidencia que existe una importante capacidad de adaptación que refleja cómo la secreción enzimática responde en buena medida a la presencia de sustratos específicos en la cantidad adecuada. Este tipo de estudios reviste especial importancia en el caso de la alimentación larvaria, donde se han evaluado diferentes aspectos, tales como:

- La dependencia respecto el aporte exógeno de enzimas (Kolkowski, *et al.*, 1993).
- Los cambios producidos por la introducción de alimento inerte (Zambonino & Cahu, 1994).

- El efecto de diferentes tipos de fuentes de nitrógeno (Cahu & Zambonino, 1995) o tipo de lípidos del alimento (Hoehne-Reitan, et al 2001).

Otros trabajos han evaluado las variaciones en secreción enzimática como respuesta a ayunos de diferente duración. La esencia de una buena parte de tales estudios es establecer si existe una respuesta compensatoria en la que intervengan, entre otros factores, una sobreproducción temporal de enzimas digestivas que permita aprovechar mejor el alimento tras un periodo de escasez debido a causas naturales o de manejo, algo que parece haber sido demostrado en salmón atlántico por Einarsson *et al.*, (1996) y más recientemente en dentón común por Díaz et al (2005).

Factores que afectan a la funcionalidad de las enzimas.

Quizá uno de los aspectos que reviste mayor interés aplicado en el estudio de la bioquímica digestiva sea el de determinar qué factores y en qué medida pueden afectar a la funcionalidad óptima de las enzimas digestivas en condiciones de cultivo. De hecho, parte de la información obtenida en los estudios generales de caracterización permite establecer la sensibilidad de las enzimas frente a los cambios de pH y temperatura. En este sentido conviene destacar que por ejemplo en los peces que poseen estómago raras veces se consigue un pH óptimo (entre 2 y 3) para la actuación de la pepsina (Deguara *et al.*, 2003; Yúfera *et al.*, 2004). Esta circunstancia se ve agravada por el hecho de emplear en los piensos ingredientes proteicos con una elevada capacidad tampón (por ejemplo las harinas de origen animal), la ingesta continua de agua salada que tiene lugar en peces marinos, o la inducción de un rápido vaciamiento gástrico que impide la consecución de un pH adecuado mediante la producción de HCl, condicionada por ciertas pautas de alimentación que maximizan el número de tomas en un intervalo corto de tiempo.

La temperatura a la que se desarrolla la actividad de los organismos acuáticos tiene poco que ver con los óptimos determinados para la actividad de sus enzimas digestivas. En el caso de las proteasas se suele situar entre los 50-60°, extremo bien alejado de las condiciones fisiológicas (Kitamikado & Tachino, 1960; Munilla-Morán & Saborido 1994a; Alarcón *et al.*, 1998). No obstante, las curvas que representan la actividad de las enzimas en función de la temperatura no siempre presentan los mismos perfiles y es precisamente a partir de tales curvas de donde se puede deducir qué porcentaje sobre la máxima actividad estaría presente a la temperatura real del entorno de la especie.

El fuerte condicionamiento que representan las bajas temperaturas para la funcionalidad de las enzimas y por tanto para el conjunto del funcionamiento de la digestión en especies cultivadas en aguas frías ha sido el motivo de la búsqueda de variantes poblacionales que presenten enzimas operativas a más baja temperatura. Un buen ejemplo de esto son las tripsinas adaptadas a un funcionamiento a bajas temperaturas encontradas en salmón (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 1998), y que son representativas de una familia de tripsinas encontradas en diferentes especies de peces al parecer como respuesta evolutiva a las peculiares características de su hábitat (Roach, 2002).

Inactivadores e inhibidores.

El alimento natural de las especies acuáticas presenta pocas sustancias químicas que puedan afectar a su funcionamiento. La mayoría de los inhibidores de proteasas conocidos son una respuesta evolutiva de las plantas terrestres a la predación por los insectos y vertebrados fitófagos. Sólo cuando se han comenzado a utilizar tales ingredientes vegetales en la fabricación de piensos se ha puesto de manifiesto la vulnerabilidad de las enzimas digestivas de las especies acuáticas frente a tales sustancias. El catálogo de ingredientes de origen vegetal con posible efecto inhibitorio sobre una o más enzimas digestivas es enormemente amplio (Tacon & Jackson, 1985; Belitz & Weder, 1990). No obstante, diferentes estudios han puesto de manifiesto que existen importantes diferencias específicas en la sensibilidad a un mismo inhibidor, así como respuestas muy variables en función de su concentración total en el alimento (Moyano *et al.*, 1999; Alarcón *et al.*, 1999; El-Sayed *et al.*, 1999). El conocimiento del efecto que los inhibidores de las proteasas o la amilasa pueden ejercer a diferentes concentraciones resulta fundamental para determinar los niveles máximos de inclusión de algunos ingredientes en las raciones, ya que de lo contrario se estaría forzando al organismo animal a compensar la inactivación de parte de sus enzimas por una sobreproducción de las mismas. Por contraste, algunos estudios apuntan incluso hacia un posible efecto beneficioso de los inhibidores al actuar como “moduladores” de una hidrólisis proteica excesiva que de otro modo saturaría el transporte intestinal (Sveier *et al.*, 2001).

La modelización de la digestión en organismos acuáticos

Si hay un grupo animal donde resultan particularmente complejos los estudios de digestibilidad son precisamente los organismos acuáticos, lo que hace necesario el diseño de sofisticados sistemas de confinamiento y muestreo para la recolección de las heces (Cho & Slinger, 1979; Choubert *et al.*, 1982) y el uso de marcadores de diferente tipo. Conviene recordar que la medida de la digestibilidad no es sino un indicador de la efectividad con que se ha producido el proceso de digestión, y por tanto en última instancia, de la eficacia con que las diferentes enzimas han podido actuar sobre sus respectivos sustratos durante el tiempo de tránsito digestivo por lo que su determinación resulta fundamental en el ámbito de la alimentación en piscicultura. Una alternativa es el uso de sistemas que simulan la digestión *in vitro*. Los extractos activos de estómago e intestino han sido la base para el diseño de diferentes sistemas de reacción controlada con los que se pretende simular el proceso de hidrólisis de macronutrientes que tiene lugar en el digestivo de diferentes especies acuáticas. El objetivo final es obtener una medida lo suficientemente aproximada de la digestibilidad de los alimentos como para hacer innecesarios (o al menos reducir el número) de ensayos *in vivo*.

Pero no es sólo en esta directamente aplicada donde reside el interés de desarrollar sistemas de evaluación nutritiva *in vitro*. Existe una gran variabilidad en la utilización digestiva de los nutrientes por los organismos acuáticos, influenciada por diversos factores tanto intrínsecos (especie, estado de desarrollo, estado fisiológico) como extrínsecos (temperatura, cantidad y composición del alimento, presencia de factores antinutritivos). Una forma razonable de modelizar la importancia relativa de cada uno de tales factores y de establecer su influencia en el

Fco. Javier Moyano López. 2006. Bioquímica Digestiva en Especies Acuicultivadas: Aplicaciones en Nutrición. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15 - 17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.

aprovechamiento final de alimento es precisamente a través de los ensayos *in vitro*. Por otra parte, en no pocos casos, los ensayos *in vivo* son excesivamente costosos o difíciles de realizar, sobre todo al tratar de establecer las necesidades nutricionales de especies de reciente puesta en cultivo, ya que en estos casos los stocks son muy heterogéneos, y los ejemplares demasiado escasos y valiosos. En tales situaciones los ensayos *in vitro* pueden dar una orientación preliminar acerca de la idoneidad del empleo de unas materias primas u otras en los piensos que se tratarán de formular.

Por último, no hay que olvidar que uno de los aspectos de mayor relevancia en la formulación actual de piensos parte de la base de maximizar el aprovechamiento de la fracción nitrogenada del alimento, con el fin de reducir en lo posible la eliminación de agentes eutrofizantes al medio. Desde esta perspectiva, también los sistemas de digestibilidad *in vitro* pueden resultar de gran utilidad al permitir evaluar y comparar la calidad nutricional de distintas fuentes de proteína de forma rápida y eficaz.

En esencia, todos los sistemas de evaluación de calidad proteica se han centrado en la simulación de la digestión de las proteínas realizada en el tracto digestivo de diferentes especies animales a través de una hidrólisis realizada bajo condiciones controladas. Es posible distinguir distintos tipos de ensayos en función de tipo y número de enzimas, las condiciones de hidrólisis (tasa inicial o producto final), el método de separación de los residuos y la determinación de los productos de la hidrólisis. En este sentido, se han llevado a cabo diferentes aproximaciones utilizando distintas metodologías como el pH-stat (Dimes *et al.*, 1994), el pH-stat modificado incluyendo una etapa de predigestión ácida que simula la acción del estómago (Alarcón *et al.*, 2004), sistemas de reacción en cámara cerrada (Bassompierre *et al.*, 1977; Rungruangsak-Torrissen, *et al.*, 2002) o sistemas no cerrados en los que los productos de la reacción son continuamente retirados cuando se producen, simulando de manera más aproximada lo que ocurre en el digestivo de los animales (Moyano & Savoie).

Todos estos sistemas presentan diferentes limitaciones:

- Homogeneidad de los extractos enzimáticos que se emplean y que penaliza la repetitividad de los ensayos.
- Realizan una valoración de la hidrólisis de los substratos, pero no de las transformaciones posteriores que incluyen la acción final de las peptidasas intestinales o el propio proceso de absorción, las cuales pueden modificar substancialmente los valores de digestibilidad estimados.
- Condiciones óptimas de los ensayos para obtener resultados repetitivos y fiables (concentración relativa E/S, volumen de reacción, temperatura, duración del ensayo).

Pero también ventajas:

A las ventajas tecnológicas de rapidez, bajo costo y posibilidad de estandarización, los ensayos *in vitro* unen la posibilidad de estudiar con más detalle algunos de los factores implicados en la hidrólisis proteica y la liberación de productos. Estos métodos deben ser simples, rápidos, deben mostrar una alta correlación con los resultados obtenidos *in vivo* y suficientemente sensibles para detectar los efectos que el procesamiento ejerce sobre la calidad de la proteína.

Enzimas digestivas como indicadores de condición

La idea de utilizar ciertos parámetros capaces de aportar información acerca del potencial de supervivencia y/o crecimiento larvario, comenzó a aparecer por primera vez en las empresas dedicadas a la explotación de pesquerías. A estos parámetros se les dio el nombre de indicadores de condición larvaria (ICL) y su función es la de medir el grado de bienestar, salud o fortaleza física de una larva (Pope, 2001).

Ha sido en los últimos años, con la creciente demanda de cría larvaria por parte del sector acuícola, cuando se ha comenzado a pensar en la posible aplicación de estos indicadores, a los cultivos larvarios. Los indicadores mencionados pertenecen a diferentes categorías; morfológicos, histológicos, higiosanitarios y bioquímicos (Ferron & Legget, 1994). Dentro de este último grupo, las enzimas digestivas son de particular interés, ya que la tasa de digestión en el sistema intestinal limita la cantidad de nutrientes que pueden ser aportados al torrente sanguíneo y por tanto influyen en el crecimiento del organismo completo (Lemieux *et al.*, 1999). Debido a la gran importancia de la fracción proteica en la nutrición de peces, un gran número de estudios se han centrado en la proteasa tripsina, como enzima clave en su proceso de digestión. Los niveles de secreción de esta enzima están relacionados con la ingesta de alimento y llenado del estómago (Pedersen *et al.*, 1984; Einarsson *et al.*, 1996), por lo que un período de ayuno o alimentación deficiente resulta en un descenso de la actividad (Ueberschar, 1995, Cara *et al.*, 2006). Por otro lado, otras proteasas alcalinas como la quimotripsina, pueden incluso ser un mejor indicador del status nutricional durante el estadio larvario, al menos en algunas especies (Appelbaum & Holt, 2003).

Isoformas y variantes poblacionales

Como para cualquier otro rasgo anatómico o funcional, se han descrito variaciones poblacionales en las enzimas digestivas de algunas especies de peces. Concretamente en el salmón se han identificado hasta 4 isoformas de tripsina, tres de ellas aniónicas y una catiónica que muestran evidentes diferencias funcionales (Male *et al.*, 1995, Outzen *et al.*, 1996). La presencia de tales isoformas parece tener repercusiones significativas en la forma en que es digerido el alimento y por lo tanto en el crecimiento final de los peces (Torrissen, 1991), por lo que se abre una interesante línea de trabajo en la que cabría indagar por la presencia de tales polimorfismos en otras especies de interés económico con objeto de utilizar dicho rasgo como carácter con peso en la selección de reproductores.

Conclusiones y perspectivas futuras

Existe una gran cantidad de investigación sobre bioquímica digestiva en peces cultivados que abarca aspectos tanto básicos como aplicados. A pesar de ello, existen lagunas importantes en el conocimiento ya que, por ejemplo, no existe en la actualidad ningún trabajo de revisión sobre los parámetros cinéticos de enzimas de especies acuícolas cultivadas, ni alguno en que se haya cuantificado con precisión la cantidad de enzima que es capaz de producir un individuo bajo diferentes condiciones de alimentación (relaciones óptimas enzima/sustrato). Igualmente, existen pocos trabajos que hayan medido el pH del estómago como resultado de diferentes pautas de alimentación o en relación al uso de distintos ingredientes en los piensos. Otros aspectos que han sido escasamente abordados y presentan un indudable interés, son los estudios de inhibición de las amilasas, la modelización de la digestión lipídica en peces o el estudio detallado de las enzimas que completan la digestión a nivel del epitelio intestinal. Por último, cabe destacar que la búsqueda de individuos que presenten variantes de enzimas con mayor operatividad puede ser una línea de enorme interés orientada a conseguir un mejor aprovechamiento de los nutrientes en condiciones de cultivo, aspecto en el que también cabe investigar el potencial de las hibridaciones.

Referencias

- 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*, L. and common dentex *Dentex dentex*. *Fish Physiol. Biochem.* 19, 257–267.
- Alarcón, F.J., Martínez, I.; Díaz, M., & Moyano, F.J. 2001. Characterization of digestive carbohydrase activity in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Hydrobiologia* 445:199–204
- Alarcón, F.J.; Moyano, F.J. & Díaz, M. 1999. Effect of inhibitors present on protein sources on digestive proteases of juvenile sea bream (*Sparus aurata*). *Aquat Living Resources* 12:233-238
- Alarcón, F.J.; Moyano, F.J. & Díaz, M. 2002. Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH-stat system. *J. Sci Food Agric* 82: 697-704
- Applebaum, S.L.; Holt, A.J. 2003. The digestive protease, chymotrypsin, as an indicator of nutritional condition in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Mar. Biol.*142:1159–67
- Baglolle, C. J., Goff, G. P. & Wright, G. M. 1988. Distribution and ontogeny of digestive enzymes in larval yellowtail and winter flounder. *Journal of Fish Biology* 53, 767–784.
- Beirao, L. H., Mckintosh, M. I., Evanilda, T. and César. 2001. Purification and characterization of trypsin-like enzyme from the pyloric caeca of cod (*Gadus morhua*) II. *Brazilian Arch. Biol. Techn.* 44 1: 33-40.
- Belitz, H.-D.; Weder, J. K. P. Protein inhibitors of hydrolases in plants foodstuffs. *Food Rev. Int.* 1990, 6, 151-211.
- Bezerra, R.S, Lins E.J., Alencar, R.B., Paiva, P.M.; Chaves, M.E., Coelho, L.C. & Carvalho, L.B. 2005. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochemistry* 40:1829–1834
- C. Cahu,, I. Rønnestad , V. Grangiera, & J.L. Zambonino Infante. 2004.Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin. *Aquaculture* 238:295–308
- Cahu, C.L. & Zambonino Infante, J. L. 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiology and Biochemistry* 14, 431–437.
- Cara, J. B, Moyano,; F.J.; Zambonino, J.L. & Fauvel, C. Trypsin and chymotrypsin as indicators of nutritional status of post-weaned sea bass larvae. *J. Fish Biology (in press)*
- Chiu, Y.N., Benitez, L.V., 1981. Studies on the carbohydrases in the digestive tract of milkfish *Chanos chanos*. *Mar. Biol.* 61, 247–254.

- Cho, C.Y. & Slinger, S.J. 1979. Apparent digestibility measurement in feedstuffs for rainbow trout. In: *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology* (Halver, J.E. & Tiews, K. eds), Vol. 2, pp. 239-247. Heenemann-Verlagsgesellschaft, Berlin.
- Choubert, G., de la Noue, J. & Luquet, P. 1982. Digestibility in Fish: Improved device for the automatic collection of feces. *Aquaculture*, 29, 185-189.
- Clark, J., Murray, K.R. and Stark, J.R. 1986. Protease development in dover sole (*Solea solea*) *Aquaculture* 53: 253–262.
- Cohen, T., Gertler, A., Birk, Y., 1981. Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*): I. Purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase. *Comp. Biochem. Physiol.* 69B, 639–646.
- Cuvier-Peres A., Jourdan, S.; Fontaine, P. & Kestemont, P. 2001. Effects of light intensity on animal husbandry and digestive enzyme activities in sea bass *Dicentrarchus labrax* post-larvae. *Aquaculture* 202:317–328
- Deguara, S., Jauncey, K. and Agius, C. 2003. Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. *Journal of Fish Biology* 62: 1033–1043.
- Díaz, M.; Sánchez, V.; Vila, E.; Arizcun, M. y Moyano, F.J. 2005. Variaciones cuali- y cuantitativas en las proteasas digestivas del dentón derivadas del incremento del ayuno en el historial de alimentación. Actas X Congreso Nac. Acuicultura. Valencia. España
- Dimes, L.E., Haard, N.F., Dong, F.M., 1994. Estimation of protein digestibility. II. In vitro assay of protein in salmonid feeds. *Comp. Biochem. Physiol.* 108 A, 363-370.
- El-Sayed, A.F.M, I. Martínez & Moyano, F.J. 2000. Assesement of the effect of plant inhibitors on digestive proteases of Nile tilapia using in vitro assays. *Aquaculture International*: 1-13
- Einarsson S, Spencer-Davies P, Talbot. C.1996. The effect of feeding on the secretion of pepsin, trypsin and chymotrypsin in the Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Fish Physiol. Biochem.*15:439-446
- Einarsson S, Spencer-Davies P, Talbot, C.1997. Effect of exogenous cholecystokinin on the discharge of the gallbladder and the secretion of trypsin and chymotrypsin from the pancreas of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Comp Biochem Physiol* C 117:63–67
- Fernandez, I.; Moyano, F.J.; Díaz, M., & Martínez, T. 2001. Characterization of α -amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 262: 1–12
- Ferron A, Leggett W.C. 1994. An appraisal of condition measures for marine fish larvae. *Adv. Mar. Biol.* 30:217-303
- Furné, M. M.C. Hidalgo, A. López, M. García-Gallego, A.E. Morales, A. Domezain, J. Domezain & A. Sanz. 2005. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture* 250 391–398
- 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.
- Haard N. F. 1992. A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *J Aquatic Food Product Technol* 1992;1:17–35.
- Hoehne-Reitan, K., Kjorsvik, E. & Retan, K. I. 2001. Bile salt-dependent lipase in larval turbot, as influenced by density and lipid content of fed prey. *Journal of Fish Biology* 58, 746–754.
- Izquierdo, M.S. & Henderson, R.J. 1998. The determination of lipase and phospholipase activities in gut contents of turbot (*Scophthalmus maximus*) by fluorescence-based assays. *Fish Physiol. Biochem.* 19: 153–162.
- Kitamikado, M. and Tachino, S. 1960. Studies on the digestive enzymes of rainbow trout proteases. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 26: 685–690.
- Kolkowski, S., Tandler, A., Kissil, G. W. & Gertler, A. 1993. The effect of dietary exogenous enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* 12, 203–209
- Koven; W. C.R. Rojas-García, R.N. Finn, A. Tandler & I. Rønnestad. 2002. Stimulatory effect of ingested protein and/or free amino acids on the secretion of the gastro-endocrine hormone cholecystokinin and on tryptic activity, in early-feeding herring larvae, *Clupea harengus* *Marine Biology* 140: 1241–1247
- Krogdahl A, Holm H. 1983. Pancreatic proteinases from man, trout, rat, pig, cow, chicken, mink and fox. Enzyme activities and inhibition by soybean and lima bean proteinase inhibitors. *Comp Biochem Physiol* 74B:403–9.
- Fco. Javier Moyano López. 2006. Bioquímica Digestiva en Especies Acuicultivadas: Aplicaciones en Nutrición. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. Avances en Nutrición Acuícola VIII .VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15 - 17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.

- Kurtovic, I.; Marshall, S.N.; Simpson B.K. 2006. Isolation and characterization of a trypsin fraction from the pyloric ceca of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 143:432–440.
- Lemieux H., Blier P., Dutil J.D. 1999. Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)? *Fish Physiol. and Biochem.* 20:293-303.
- Lin Yan & Xiao Qiu-Zhou. 2006. Dietary glutamine supplementation improves structure and function of intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) *Aquaculture* 256: 389–394.
- Male, R., Lorens, J.B., Smalas, A. & Torrissen, K.A. 1995. Molecular cloning and characterization of anionic and cationic variants of trypsin from Atlantic salmon. *Eur. J. Biochem.* 232, 677-685.
- Maragoudaki D, Paspatis M, Kentouri, M. 2001. Growth and feeding responses of juvenile red porgy to restrictive self-feeding regimes. *Aquaculture International* 9:153-70.
- Martínez, I.; Moyano, F.J.; Fernández-Díaz, C. & Yúfera, M. 1999. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*) *Fish Physiology and Biochemistry* 21: 317–323
- Moyano, F. J., Díaz, M., Alarcón, F. J. & Sarasquete, M. C. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry* 15, 121–130.
- Moyano, F.J.; Martínez, I.; Díaz, M. & Alarcón, F.J. 1999. Inhibition of digestive proteases by vegetable meals in three fish species; seabream (*Sparus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African sole (*Solea senegalensis*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 122 ; 327–332.
- Munilla-Morán, R. and Saborido-Rey, F. 1996. Digestive enzymes in marine species. I. Proteinase activities in gut from redfish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) *Comp. Biochem. Physiol.* 113B: 818–826.
- Munilla-Morán, R., Saborido-Rey, F., 1996. Digestive enzymes in marine species. II. Amylase activities in gut from seabream (*Sparus aurata*), turbot (*Scophthalmus maximus*) and redfish (*Sebastes mentella*). *Comp. Biochem. Physiol.* 113B, 827– 834.
- Olsson, C.; Aldman, G.; Larsson, A. & Holmgren, S. 1999. Cholecystokinin affects gastric emptying and stomach motility in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* *The Journal of Experimental Biology* 202, 161–170.
- Pedersen, B.H, Nilssen, E.M, Hjelmeland, K. 1987. Variations in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring (*Clupea harengus*) digesting copepod nauplii. *Mar. Biol.* 1987; 94:171-81.
- Pope, K.L, Kruse C.G. 2001. Assessment of Fish Condition Data. En: Guy C, Brown M, ed. *Statistical Analyses of Freshwater Fisheries Data*. American Fisheries Society Publication.
- Roach, J.C. 2002. A Clade of Trypsins Found in Cold-Adapted Fish. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 47:31–44.
- Rojas-García, C. R. Rønnestad, I., 2002. Cholecystokinin and tryptic activity in the gut of developing Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): evidence for participation in the regulation of protein digestion. *J. Fish Biol.* 61, 973–986.
- Rønnestad, I., Conceição, L. E. C., Aragão, C., Dinis, M. T., 2001. Assimilation and catabolism of dispensable and indispensable free amino acids in post-larval Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Comp. Biochem. Physiol. C.* 130: 461-466.
- Rungruangsak-Torrissen, K., Pringle, G.M., Moss, R. and Houlihan, D.F. 1998. Effects of varying rearing temperatures on expression of different trypsin isozymes, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 19: 247–255.
- Rungruangsak-Torrissen, K., Rustad, A., Sunde, J., Eiane, S.A., Jensen, H.B., Opstvedt, J., Nygård, E., Samuelsen, T.A., Mundheim, H., Luzzana, U. and Venturini, G. 2002. *In vitro* digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trial. *J. Sci. Food Agric.* 82: 644–654.
- Sánchez-Muros, M.J, Corchete, V., Suárez, M.D., Cardenote, G, Gómez-Milán, E., & De la Higuera M. 2003. Effect of feeding method and protein source on *Sparus aurata* feeding patterns. *Aquaculture* 224:89-103.
- Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W. & Hanke, W. 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Mar. Biol.* 119: 471–486. *Statistical Analyses of Freshwater Fisheries Data*. American Fisheries Society Publication.
- Sveier, H., Kvamme, B.O. & Raae, A.J. 2001. Growth and protein utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) given a protease inhibitor in the diet. *Aquaculture Nutrition* 7; 255-264.

- Tacon AGJ, Jackson AJ. 1985. Utilization of conventional and unconventional protein sources in practical fish feeds. In: Cowey CB, Mackie AM, Bell JG, editors. *Nutrition and Feeding in Fish*. London: Academic Press, 1985:119–45.
- Tengjaroenkul B, Smith B.J, Caceci, T, & Smith SA. 2000. Distribution of intestinal enzymes activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 182:317–27.
- Torrissen, K.R. 1991. Genetic variation in growth rate of Atlantic salmon with different trypsin-like isozyme patterns. *Aquaculture* 93: 299–312.
- Ueberschär B. 1995. The use of tryptic enzyme activity measurement as a nutritional condition index: laboratory calibration data and field application. *ICES Mar. Sci. Symp.* 201:119-29.
- Yúfera, M., Fernández-Díaz, C., Vidaurreta, A., Cara, J.B. and Moyano, F.J. 2004. Gastrointestinal pH and development of the acid digestion in larvae and early juveniles of *Sparus aurata* (Pisces: Teleostei). *Marine Biology* 144: 863–869.
- 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, 399–408.