

Modelizando el Biorreactor; o cómo Conocer Mejor el Digestivo de sus Peces

Fco. Javier Moyano

Dpto. Biología y Geología. Esc. Sup. Ingeniería. Univ. Almería.

Cañada S. Urbano s/n. 04120. Almería. España

E-mail: fjmoyano@ual.es

Resumen

El aparato digestivo de cualquier animal no es sino un biorreactor de complejidad variable en el que tienen lugar las reacciones de hidrólisis de los productos que constituyen el alimento. Su funcionamiento está en buena medida controlado por los mismos factores y leyes que los reactores químicos. El conocimiento de dichos factores y el modo en que afectan a la hidrólisis de los alimentos es la base para desarrollar modelos tanto teóricos como prácticos del aparato digestivo. Este último tipo de modelos es lo que se conoce como modelos de digestión *in vitro*, los cuales son cada vez más utilizados para comprender el funcionamiento del aparato digestivo en diferentes especies y como herramienta para evaluar la calidad nutritiva de los piensos. Se hace un repaso general de la modelización del aparato digestivo en especies acuáticas, así como de sus limitaciones y potencialidades.

Palabras clave: digestión, *in vitro*, modelos, acuicultura

El aparato digestivo como biorreactor

La producción de animales acuáticos es simplemente un proceso de transformación de la energía y la proteína contenida en una serie de materias primas e ingredientes que constituyen los piensos, en proteína y grasa animal de elevado valor nutritivo e interesantes cualidades organolépticas. En dicha transformación el aparato digestivo juega un papel primordial, dado que es en esencia un biorreactor complejo en el que tienen lugar los procesos de transformación mediante hidrólisis y la absorción de los mencionados ingredientes. Además, el aparato digestivo se constituye en la interfase entre el medio acuático externo y el organismo del animal y es el hábitat natural de la microbiota simbiote que también lleva a cabo significativas transformaciones de algunos nutrientes.

Un enfoque interesante para comprender mejor el funcionamiento del digestivo de los peces es considerar sus similitudes con los biorreactores artificiales. Al igual que estos, está formado por una serie de compartimentos en los cuales tienen lugar diferentes reacciones y procesos, está sujeto a un flujo constante de sustratos y genera productos de manera continuada (Figura 1). Además, su funcionamiento está afectado por una multitud de factores (temperatura, pH, relaciones enzima:sustrato, inhibidores enzimáticos, etc.) que modifican de manera muy significativa el resultado neto de los procesos que tienen lugar en su interior.

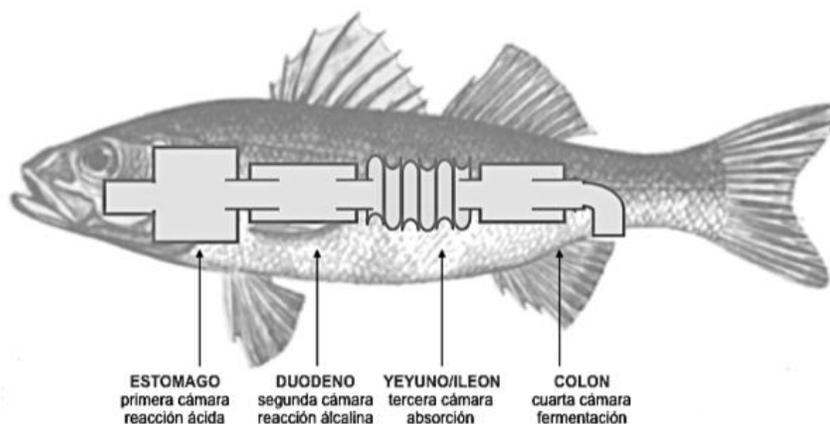


Figura 1. El digestivo de un pez como biorreactor complejo

La modelización del aparato digestivo como un biorreactor se puede plantear tanto desde una perspectiva teórica como práctica. La primera suele ser utilizada por los *ecólogos nutricionales* con objeto de investigar de qué modo las configuraciones de los aparatos digestivos existentes en distintas especies ayudan a maximizar la ganancia de energía y nutrientes. Este enfoque se fundamenta en la clasificación de los distintos tipos de reactores químicos realizada por Levenspiel (1999) que considera tanto su ritmo de funcionamiento (continuo o discontinuo) como la forma en que los reactivos y productos de la reacción se ponen en contacto (con o sin mezcla de ambos). Esto hace que en términos prácticos se distingan 3 tipos básicos de reactores (Figura 2). De este modo, el funcionamiento del aparato digestivo de cualquier animal puede asimilarse a uno de estos modelos o a una combinación en serie de varios de ellos, de forma que los animales que se alimentan de manera discontinua presentarían aparatos digestivos asimilables a un reactor por lotes o intermitente, en tanto que los que se alimentan de manera continuada poseerían aparatos digestivos asimilables a un reactor de flujo. Esta teoría de los reactores químicos, desarrollada de manera muy completa por Penry y Jumars (1987) ha sido utilizada por diferentes autores para analizar las relaciones existente entre la composición de la dieta, el procesado del alimento y la morfología del aparato digestivo, permitiendo obtener interesantes conclusiones respecto al modo en que la digestión se relaciona con las pautas de obtención de alimento en diferentes grupos de animales (Karasov y Diamond, 1988; Whelan y Schmidt, 2007) incluidos los peces (Horn y Messer, 1992; German, 2009).

El otro enfoque es el del *nutricionista animal*, que intentaría descubrir, mediante la utilización de *modelos físicos* de una parte concreta del aparato digestivo, qué características del funcionamiento del aparato digestivo en especies concretas le permiten optimizar la ganancia de nutrientes. Estos modelos, empleados para llevar a cabo lo que comúnmente se ha dado en llamar ensayos de “digestibilidad *in vitro*”, se vienen utilizando desde hace más de 60 años de manera rutinaria y con protocolos bien establecidos en el campo de la nutrición humana y de animales terrestres.

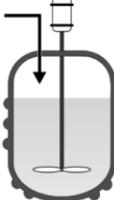
Tipo de reactor	Esquema	Pauta de funcionamiento	Pauta de mezcla	Parte del digestivo asimilable
Reactor por lotes (Batch reactor o BR)		Todos los reactivos se añaden a la vez. La reacción se produce durante un cierto tiempo tras el cual todos los productos y los reactivos remanentes son vaciados	Mezcla homogénea y continua. Las concentraciones son uniformes en todo el reactor y sólo varían con el tiempo	Estómago
Reactor de flujo continuo con agitación (continuous-flow stirred-tank reactor o CSTR)		Los reactivos y productos se introducen y retiran intermitentemente	Mezcla homogénea. No hay diferencias espaciales ni temporales	Estómago y ciego
Reactor de flujo continuo (plug-flow reactor o PFR)		Los reactivos y productos se introducen y retiran continuamente	No hay mezcla a lo largo del eje principal. Las concentraciones varían desde la entrada a la salida del reactor	Intestino

Figura 2. Tipos de reactores y su asimilación con distintas partes del aparato digestivo, según Penry y Jumars (1987)

En estos ámbitos se han realizado multitud de trabajos y existen muy buenas revisiones sobre el tema, tanto en la vertiente de su aplicación a la nutrición de rumiantes (Kitessa *et al.*, 1999; Mabweesh *et al.* 2000) como de monogástricos (Boisen y Eggum, 1991; Swaisgood y Catignani, 1991; Savoie, 1994; Boisen, 2000) y por supuesto en humanos (Woolnough *et al.* 2008; Hur *et al.*, 2011; Butts *et al.* 2012; Guerra *et al.* 2012). En los organismos acuáticos los modelos digestivos *in vitro* son de desarrollo más reciente y tienen dos aplicaciones principales: obtener una mejor comprensión de los diferentes factores que afectan la funcionalidad del digestivo con objeto de optimizar su funcionamiento y evaluar ingredientes y piensos de un modo más rápido y sencillo que mediante ensayos *in vivo*.

capacidad tampón de los ingredientes utilizados habitualmente en los piensos o la producción total de HCl. Por otra parte, el tiempo de reacción depende de factores intrínsecos (anatomía del digestivo, temperatura del agua) y extrínsecos (frecuencia de alimentación), pero tampoco hay muchos datos respecto a las tasas de tránsito digestivo bajo distintas condiciones y cómo afectan a la eficiencia neta del proceso de digestión.

En definitiva, la modelización precisa apoyarse en una serie de datos que pueden obtenerse mediante: a) ensayos biológicos sencillos (producción de HCl, cambios de pH tras ingesta, volumen estomacal, etc.); b) ensayos biológicos más complejos (tasas de tránsito digestivo, parámetros catalíticos de las principales enzimas, etc.) y d) ensayos *in vitro* (interacciones entre enzimas y productos, efecto de factores como el pH y la temperatura sobre las tasas de hidrólisis, etc.).

Bioaccesibilidad, biodisponibilidad y digestibilidad. ¿Cuál se puede realmente modelizar en un biorreactor?

Prácticamente la totalidad de investigadores que utiliza modelos de biorreactores para simular el funcionamiento de los digestivos animales indica que su objetivo es medir la **digestibilidad *in vitro***. Sin embargo, esta afirmación no resulta correcta si se tienen en cuenta tanto la definición de digestibilidad, como lo que realmente se puede medir con un biorreactor.

La digestión y la absorción de nutrientes son procesos fisiológicos complejos que resulta prácticamente imposible reproducir de manera ajustada *in vitro*. En un biorreactor se pueden modelizar para un determinado sustrato tanto las transformaciones físicas resultantes de los movimientos de disgregación y mezcla, como las químicas resultantes de su interacción con el medio acuoso (solubilización), el efecto del pH, los iones y de algunos factores antinutritivos, así como los procesos de hidrólisis llevados a cabo por enzimas concretas. Por el contrario, los efectos de la fibra, las secreciones proteicas endógenas, la actividad de las enzimas microbianas, etc., difícilmente pueden ser simulados. Bajo estas premisas se concluye que los ensayos *in vitro* son capaces de reproducir en cierta medida lo

que ocurre en el digestivo de un animal, pero están lejos de poder ofrecer una medida de la digestibilidad del ingrediente estudiado.

Desde una perspectiva más amplia, se podría decir que en última instancia, los ensayos nutricionales pretenden medir la biodisponibilidad de un nutriente. La *biodisponibilidad* de los nutrientes es un concepto asociado a la eficacia con la absorción y utilización metabólica de un nutriente ingerido (Gregory *et al.* 2005) que podría definirse como la fracción de dicho nutriente que resulta disponible para su utilización en las funciones fisiológicas o el almacenamiento tras todos los procesos pre-ingestivos (procesado) y post-ingestivos (hidrólisis y absorción). La biodisponibilidad real sólo podría ser medida evaluando por ejemplo los niveles de nutrientes en sangre o su posterior acumulación en los tejidos, es decir, una vez superada la barrera intestinal.

La medida de la digestibilidad *in vivo* no es más que un modo indirecto de estimar la biodisponibilidad potencial de un nutriente. Puede decirse que es un **método post-absortivo**, ya que asume que todo lo que no está en las heces es porque ha sido absorbido. El cálculo de la digestibilidad implica por tanto realizar un balance de masas entre la cantidad de nutrientes que ingresan en el aparato digestivo y los que son eliminados sin transformación posible; para ello es necesario medir tanto la cantidad de nutriente o compuesto suministrado como alimento como la remanente en las heces. No obstante, dado que la composición de estas últimas puede verse notablemente modificada por muchos factores (secreciones internas, biomasa bacteriana o productos derivados de su metabolismo) se asume que esta medida proporciona datos de *digestibilidad aparente*.

Una forma de obviar este error y proporcionar una medida más precisa de la digestibilidad es recurrir a la toma de muestras del contenido de la digesta antes de su entrada al intestino grueso, recurriendo para ello a la canulación; este procedimiento permite evaluar lo que se conoce como *digestibilidad ileal*, y resulta habitual en el estudio de este parámetro en algunos animales como los cerdos (Boisen y Moughan, 1996). Aparte de lo engorroso de su determinación, resulta evidente que se trata de una aproximación que a veces puede resultar

bastante inexacta, ya que la presencia de un nutriente en las heces puede estar bastante influenciada por la acción microbiana intestinal que tiene lugar durante y después del proceso de absorción.

Los métodos de simulación de la hidrólisis *in vitro* son una forma indirecta de estimar la biodisponibilidad potencial de los nutrientes. En este caso se trataría de **métodos pre-absortivos**, que en realidad estiman la fracción de nutrientes potencialmente disponible para absorción intestinal. En estos casos se asume que todo lo que se libere por la acción enzimática estará disponible para absorción intestinal (por eso es más correcto decir que son una medida de la *biodisponibilidad potencial*). En estrecha relación con la estimación de la biodisponibilidad potencial en los métodos *in vitro* (pre-absortivos) se encuentra el concepto de bioaccesibilidad, parámetro que mide la susceptibilidad de un nutriente para ser liberado de la matriz del alimento por acción de las enzimas (Hedrén *et al.*, 2002). La biodisponibilidad potencial dependerá estrechamente de la bioaccesibilidad, al menos para los macronutrientes, aunque no tanto para los micronutrientes (en los minerales depende más del pH de la digesta).

A su vez, la bioaccesibilidad está condicionada por numerosos factores; algunos de ellos están vinculados al sustrato (solubilidad de proteínas o carbohidratos, capacidad tampón, contenido en factores antinutritivos como inhibidores o quelantes) y otros al tratamiento físico-químico del alimento previo a la ingesta (calentamiento, tamaño de partícula). En cualquier caso resulta evidente que, con escasas excepciones (Martínez-Montaña *et al.*, 2010, 2011) la mayor parte de los modelos de digestibilidad *in vitro* sólo simula la etapa de hidrólisis y no la de absorción, y por lo tanto no pueden adoptar en propiedad ese nombre. No obstante, es en la posibilidad de evaluar mejor el posible efecto de todos estos factores sobre la biodisponibilidad donde radica el interés de los ensayos *in vitro*.

Modelización de la hidrólisis digestiva en organismos acuáticos

Los diferentes modelos de simulación de la digestión utilizados en animales acuáticos se pueden agrupar en las siguientes categorías:

Digestores simples (una etapa)

De **vaso cerrado** (no hay retirada de productos)

- Con medida de producto de hidrólisis
- Con medida de cambios de pH (pH-drop; pH-stat)

De **membrana** (permite retirada de productos)

Digestores compuestos (dos etapas)

Las configuraciones utilizadas para la modelización han sido preferentemente los digestores simples, bien orientados a la medida de los productos de hidrólisis o a los cambios de pH, tanto con la técnica de pH-stat como con pH-drop. En menor medida se han utilizado sistemas algo más complejos, como los digestores compuestos dotados de membrana. Las configuraciones y condiciones operativas utilizadas en una buena parte de los estudios analizados no parecen cumplir de manera adecuada con los requisitos antes mencionados. Así por ejemplo, bastantes de ellos simulan únicamente la etapa intestinal de la digestión, pero no la gástrica, algo que resulta llamativo considerando que la mayoría de las especies cuya digestión se pretende modelizar presenta un estómago claramente funcional. Aunque se ha demostrado que la etapa intestinal de la hidrólisis enzimática es la más importante tanto por su duración como por el número de enzimas implicadas, en el caso concreto de las proteínas se ha demostrado que la digestión gástrica tiene un profundo efecto sobre las etapas posteriores de hidrólisis, debido tanto a la acción del pH ácido como de la pepsina que modifican la accesibilidad posterior de las proteasas intestinales (Alarcón *et al.* 2002). Igualmente, se ha demostrado que el paso por el estómago inactiva parcialmente a algunos inhibidores de tripsina presentes en ingredientes vegetales (Krogdahl y Holm, 1981; Alarcón *et al.* 2001). Adicionalmente, en los casos en los que se pretende evaluar la biodisponibilidad de minerales como el fósforo, resulta crucial simular el paso por el

ambiente ácido estomacal si se pretende obtener una visión más realista de la fracción potencialmente disponible para absorción intestinal (Morales y Moyano, 2010). Cabe deducir por tanto que los resultados cuantitativos y cualitativos de hidrólisis proteica obtenidos con los modelos simples pueden estar bastante alejados de lo que ocurre en el pez vivo y que en este sentido, los modelos gastrointestinales que simulan las dos etapas de hidrólisis (Moyano y Savoie, 2001; Morales y Moyano, 2010) resultarían bastante más adecuados.

El tipo de enzimas utilizadas es un aspecto que resulta clave y condiciona enormemente los resultados obtenidos. Diferentes autores han demostrado que las enzimas digestivas de peces, y particularmente las proteasas, poseen características notablemente diferentes a las de otros vertebrados respecto a su afinidad por los sustratos, velocidad de reacción, óptimo térmico o sensibilidad frente a inhibidores (Díaz-López *et al.* 1998). Aunque en una gran mayoría de los modelos de simulación se han empleado extractos más o menos purificados obtenidos de distintas partes del digestivo de las especies estudiadas (Tibbetts *et al.* 2011) o incluso la propia digesta como fuente de enzimas, en otros se emplearon enzimas comerciales obtenidas a partir de vertebrados terrestres o microorganismos, lo que previsiblemente aleja bastante los resultados obtenidos de los potencialmente producidos en el animal vivo.

Tan importante como una configuración adecuada resulta la adaptación de los modelos a las condiciones existentes en el aparato digestivo de la especie cuyo funcionamiento se pretende simular. En este sentido hay varios parámetros fundamentales a considerar: pH, temperatura, duración de la reacción y relación enzima:sustrato utilizada. Sólo algunos estudios justifican los pH utilizados basándose en mediciones realizadas *in vivo* (Grabner y Hofer, 1985; Morken *et al.* 2012), en tanto que en la mayoría la hidrólisis se lleva a cabo dentro de valores de pH que se consideran óptimos para la actividad de las enzimas empleadas, en un rango que va de 7,5 a 9,0 para las hidrólisis alcalinas y generalmente a pH 2,0 en las ácidas. En este último caso, sin embargo, los resultados obtenidos pueden estar bastante alejados de la realidad dado que los pH existentes en el estómago de los peces

suelen ser considerablemente más elevados, lo que claramente afectaría a la funcionalidad de la pepsina (Márquez *et al.* 2012). Por otro lado, las temperaturas utilizadas varían entre los 15 y los 37 °C; las primeras tienen una base fisiológica ya que intentan reproducir la temperatura corporal en especies acuáticas, pero inevitablemente conllevan un entecimiento de las reacciones. Las temperaturas más elevadas aunque no tienen justificación fisiológica permiten obtener resultados analíticos en un tiempo menor.

Evidentemente no parece tener sentido intentar reproducir los tiempos de digestión existentes en animales vivos, los cuales en el caso de los peces y crustáceos están muy afectados por una gran diversidad de factores (edad, composición del alimento, temperatura, etc.) y presentan por tanto una gran variabilidad. En consecuencia, el tiempo de reacción utilizado debería ser un compromiso entre la necesidad de obtener resultados significativos y fiables y la de no prolongar excesivamente la duración de los ensayos, algo que iría en contra de una de las ventajas de los experimentos *in vitro*. Los tiempos de reacción empleados en los ensayos son enormemente variables y van desde los 10 min establecidos en los experimentos con pH-drop (Lazo *et al.* 1998; Fenerci y Erdal, 2005; Sultana *et al.* 2010) hasta las 24 h en algunos ensayos realizados con digestores simples (Bassompierre *et al.* 1998; Supannapong *et al.* 2008). El tiempo excesivamente corto utilizado en los primeros parece venir condicionado por la propia naturaleza del ensayo, que no permite observar grandes variaciones en este parámetro más allá de las producidas en los primeros minutos y evidencia las limitaciones de los modelos realizados en reactores cerrados y de pequeño volumen. Por otra parte, los tiempos de ensayos excesivamente prolongados no parecen adecuados principalmente por los problemas derivados de la contaminación bacteriana y la saturación por productos de reacción.

Un aspecto que se considera fundamental al intentar simular la hidrólisis que tiene lugar en el digestivo es la utilización de relaciones Enzima:Sustrato similares a las existentes en el animal vivo, algo a lo que se ha prestado especial atención en los estudios de simulación digestiva en animales terrestres y humanos (Smeets-Peeters *et al.* 1998; Ulleberg *et al.* 2011). Curiosamente, este es un aspecto mal explicado en la gran mayoría de los estudios,

en los cuales, salvo excepciones (Grabner y Hofer, 1985; Morales y Moyano, 2010; Morken *et al.* 2012) se utilizan cantidades de enzimas que no se justifican sobre una base fisiológica y únicamente parecen responder a la necesidad de obtener resultados fáciles de cuantificar. Nuevamente este aspecto hace pensar que los datos obtenidos en experimentos realizados en tales condiciones se alejarán mucho de los obtenidos *in vivo* y permite concluir que el objetivo final de la mayor parte de los estudios realizados hasta el momento ha sido realizar aproximaciones sencillas con un grado razonable de fidelidad y orientadas a evaluar diferencias en la calidad nutritiva de ingredientes, pero no simulaciones más ajustadas que además permitan entender el motivo de esas diferencias.

Los parámetros utilizados para evaluar la proteólisis son también muy variados. Grabner (1985) desarrolló una metodología en la cual la digestión se determinaba mediante el análisis detallado de las fracciones proteicas liberadas, un enfoque que permite aceptables estimaciones pero resulta algo lento y costoso. La mayor parte de los estudios se decanta por cuantificar de un modo u otro los productos nitrogenados solubles y en algunos casos los azúcares reductores resultantes de la hidrólisis de carbohidratos (Supannapong *et al.*, 2008).

Un enfoque alternativo es la metodología pH-drop en la cual el grado de proteólisis se evalúa mediante la caída del pH del sistema a lo largo del periodo de reacción y que ha sido utilizada en numerosos ensayos. No obstante, esta caída del pH puede modificar la actuación del enzima en ensayos prolongados, determinando una hidrólisis sólo parcial y subestimando los coeficientes de digestibilidad. El pH-stat (Pedersen y Eggum, 1983) evita este problema ya que el grado de digestión se relaciona con el volumen de alcalina necesario para mantener un pH constante a lo largo de la reacción. A pesar de sus ventajas, este sistema sigue presentando el inconveniente de realizarse en un reactor cerrado en el que los productos finales de la reacción se acumulan y acaban por detener y/o modificar la reacción, además de ser difíciles de separar de los sustratos iniciales para su medición. Por otra parte, en ensayos con sustratos complejos y extractos enzimáticos semipurificados, la presencia de lípidos y lipasas determina la liberación de ácidos grasos que también modifican el pH, lo que conlleva un error inherente ya que la valoración realizada no

permite distinguir qué cantidad de la variación en el pH se debe a hidrólisis proteica y cual no. En buena medida muchos de estos inconvenientes son eliminados al separar físicamente los productos de reacción del resto de la mezcla reactiva conforme aquellos se van liberando, algo que se consigue al emplear los reactores basados en el uso de membranas con distintos tamaños de exclusión molecular (Moyano y Savoie, 2001; Morales y Moyano, 2010; Perera *et al.*, 2010).

Correlación ensayos *in vivo-in vitro*

A pesar de que, como se ha indicado resulta claramente inapropiado hablar de ensayos de digestibilidad *in vitro*, considerando la diferencia entre los parámetros que es posible medir mediante ensayos con estas técnicas y los que se pueden evaluar en los ensayos *in vivo*, es necesario establecer correlaciones entre ambos tipos de parámetros para determinar en qué medida los resultados obtenidos con el primer tipo de métodos pueden ser predictores de los que se obtendrían *in vivo*. Las limitaciones que presentan los diferentes modelos para representar la verdadera digestión, y por tanto para correlacionar los parámetros con resultados obtenidos *in vivo* se entienden mejor al observar la Figura 3. Dado que la transformación de la digesta progresa desde el estómago (quimo) hasta el colon (heces), el grado de concordancia entre los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* aumentará en la medida en que se simulen etapas que generen productos parecidos al producto final de la digestión, algo que se consigue mejor con modelos que reproducen etapas avanzadas de dicho procesos o bien utilizan varias fases. Como se aprecia en dicha Figura los ensayos basados en el uso de digestores simples que únicamente simulan la digestión ácida producirán resultados notablemente alejados de la realidad, teniendo en cuenta que la fase gástrica de la digestión no presenta en la mayor parte de los peces una importancia equivalente a la que tiene en vertebrados terrestres (Márquez *et al.*, 2012). Esto explicaría por qué tales ensayos presentan correlaciones pobres con los resultados finales de digestibilidad *in vivo* (Nengas *et al.*, 1995; Gomes *et al.*, 1998). Los modelos que simulan etapas intermedias de la digestión (producción del quilo) consiguen buenos ajustes y estos

serán tanto mejores cuanto más importante sea la etapa de digestión alcalina en el conjunto del proceso (máxima en peces carentes de estómago como ciprínidos o tilapias).

Por otra parte, la naturaleza de los ingredientes influirá de manera muy significativa en las correlaciones. Los ingredientes de origen animal, salvo excepciones (colágeno) son sencillos de digerir y sufren pocas transformaciones tras la hidrólisis y la absorción, por lo que la composición de la digesta ileal resulta muy similar a la de las heces. Los de origen vegetal, por el contrario, presentan compuestos (principalmente carbohidratos de difícil digestión como celulosas o pectinas) que, además de condicionar la acción de las enzimas, son sustrato de fermentaciones importantes en el colon. Además, la acción mecánica durante su paso por el aparato digestivo determina una mayor pérdida de componentes endógenos. Todo ello hace que la composición de la digesta ileal se aleje bastante de la de las heces y por tanto la posibilidad de establecer correlaciones razonables. Estas diferencias se ponen claramente de manifiesto en diferentes estudios en los que las correlaciones se deben estimar de manera separada para cada tipo de ingredientes (Tibbetts *et al.* 2011b).

No obstante, para obtener correlaciones robustas son necesarios un gran número de datos y salvo excepciones, la mayor parte de los estudios realizados carece de ellos y sólo algunos evalúan más de 10 ingredientes (Gomes *et al.* 1998; Shipton y Britz, 2002; Lemos *et al.* 2009; Tibbetts *et al.* 2011b). Aunque algunos autores encuentran buenas correlaciones entre los valores *in vitro-in vivo* (Chong *et al.* 2002; Shipton y Britz, 2002; Lemos *et al.* 2009; Márquez *et al.* 2013), en la mayoría de ellos dicha correlación no existe o bien hacen falta modelos no lineales para describirla (Dimes *et al.* 1994; Fenerci y Erdal, 2005)

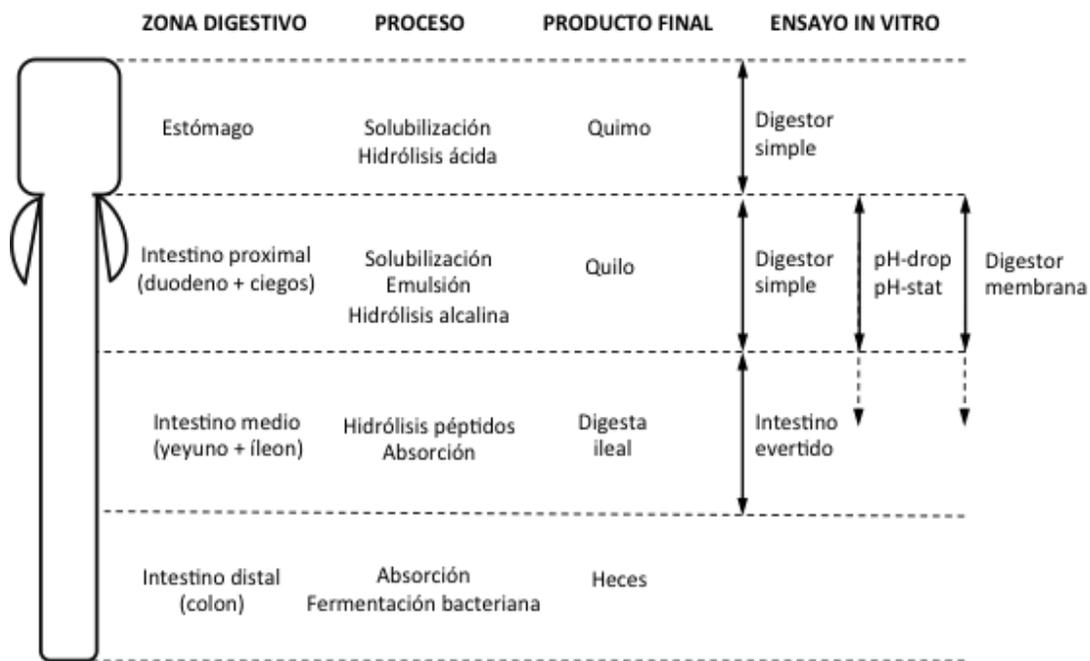


Figura 3. Correspondencia entre los procesos que tienen lugar en la digestión *in vivo* y los simulados mediante sistemas *in vitro*

Como conclusión final cabría destacar que aunque existe la necesidad de desarrollar correlaciones fiables entre los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* para la biodisponibilidad de nutrientes, resulta evidente que ambas aproximaciones pueden suministrar distintos tipos de información contribuyendo de este modo a obtener una visión más completa del objetivo principal; la calidad nutricional de la proteína la cual se verá finalmente reflejada en un mejor crecimiento del pez. Considerando esto, lo importante no es tanto si los ensayos se correlacionan entre sí, sino en qué medida se complementan para predecir el crecimiento observable *in vivo*, por lo que realmente los resultados de las evaluaciones de biodisponibilidad potencial *in vitro* deberían correlacionarse con otros indicadores de eficiencia, tales como el Índice de Conversión o la Tasa Específica de Crecimiento, tal y como proponen Dimes *et al.* (1994) o Rungruangsak-Torrissen *et al.* (2002).

Por último, cabe señalar que el enfoque de modelizar los aparatos digestivos de peces o crustáceos considerándolos como biorreactores presenta un amplio potencial de desarrollo futuro que se irá concretando a medida que se disponga de más datos objetivos sobre la fisiología y bioquímica de los mismos.

Referencias

- Alarcón, F. J., García-Carreño, F. L., Navarrete del Toro, M. A. (2001). Effect of plant protease inhibitors on digestive proteases in two fish species, *Lutjanus argentiventris* and *L. novemfasciatus*. *Fish Physiol Biochem* 24: 179-189
- 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
- Bassompierre, M., Kristiansen, H. R., McLean, E. (1998). Influence of weight upon *in vitro* protein digestion in rainbow trout. *J Fish Biol* 52: 213-216
- Boisen, S. (2000). *In vitro* digestibility methods: history and specific approaches. In *Feed evaluation: principles and practice*: 153-168. Moughan, P. J., Verstegen, M. W. A., Visser-Reyneveld, M. I. (Eds.). Wageningen: Wageningen Pers
- Boisen, S., Eggum, B. O. (1991). Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutr Res Rev* 4: 141-162
- Boisen, S., Moughan, P. J. (1996). Dietary influences on endogenous ileal protein and amino acid loss in the pig. *Acta Agricult Scand Sect A-Anim Sci* 46: 154-164
- Butts, C. A., Monro, J. A., Moughan, P. J. (2012). *In vitro* determination of dietary protein and amino acid digestibility for humans. *Br J Nutr* 108: 282-287
- Chong, A. S. C., Hasnim, R., Ali, A. B. (2002). Assessment of dry matter and protein digestibilities of selected raw ingredients by discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) using *in vivo* and *in vitro* methods. *Aquacult Nutr* 8: 229-238
- 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. *Comp Biochem Physiol B Comp Biochem* 121: 369-377.
- Dimes, L. E., Haard, N. F., Dong, F. M., Rasco, B. A., Forster, I. P., Fairgrieve, W. T., Arndt, R., Hardy, R. W., Barrows, F. T., Higgs, D. A. (1994). Estimation of protein digestibility--II. *In vitro* assay of protein in salmonid feeds. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 108: 363 – 370
- Fenerci, S., Erdal, S. (2005). *In vivo* and *in vitro* protein digestibility of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972) fed steam pressured or extruded feeds. *Turk J Fish Aquat Sci* 5: 17-22
- German, D. P. (2009). Do herbivorous minnows have "plug-flow reactor" guts? Evidence from digestive enzyme activities, gastrointestinal fermentation, and luminal nutrient concentrations. *J Comp Physiol B* 179: 759-771
- Gomes, E. F., Teles, A. O., Gouveia, A., Rema, P. (1998). *In vivo* and *in vitro* digestibility of diets and feedstuffs for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Appl Ichthyol* 14: 109-111
- Grabner, M. (1985). An *in vitro* method for measuring protein digestibility of fish feed components. *Aquaculture* 48: 97-110

- Grabner, M., Hofer, R. (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
- Gregory, J. F., Quinlivan, E. P., Davis, S. R. (2005). Integrating the issues of folate bioavailability, intake and metabolism in the era of fortification. *Trends Food Sci Tech* 16: 229-240
- Hedrén, E., Mulokozi, G., Svanberg, U. (2002). *In vitro* accessibility of carotenes from green leafy vegetables cooked with sunflower oil or red palm oil. *Int J Food Sci Nutr* 53: 445-453
- Horn, M. H., Messer, K. S. (1992). Fish guts as chemical reactors: a model of the alimentary canals of marine herbivorous fishes. *Mar Biol* 113: 527-535
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., McClements, D. J. (2011). *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chem* 125: 1-12
- Karasov, W. H., Diamond, J. M. (1988). Interplay between physiology and ecology in digestion. *BioScience* 38: 602-611.
- Kitessa, S., Irish, G. G., Flinn, P. C. (1999). Comparison of methods used to predict the *in vivo* digestibility of feeds in ruminants. *Aust J Agr Res* 50: 825-842
- Krogdahl, A., Holm, H. (1981). Soybean proteinase inhibitors and human proteolytic enzymes: selective inactivation of inhibitors by treatment with human gastric juice. *J Nutr* 111: 2045-2051
- Lazo, J. P., Romaine, R. P., Reigh, R. C. (1998). Evaluation of three *in vitro* enzyme assays for estimating protein digestibility in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *J World Aquaculture Soc* 29: 441-450
- Lemos, D., Lawrence, A. L., III, A. J. S. (2009). Prediction of apparent protein digestibility of ingredients and diets by *in vitro* pH-stat degree of protein hydrolysis with species-specific enzymes for juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 295: 89-98
- Levenspiel, O. (1999). *Chemical reaction engineering*. New York: Wiley.
- Mabjeesh, S. J., Cohen, M., Arieli, A. (2000). *In vitro* methods for measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: comparison of methods and inoculum source. *J Dairy Sci* 83: 2289-2294
- Márquez, L., Øverland, M., Martínez-Llorens, S., Morken, T., Moyano, F. J. (2013). Use of a gastrointestinal model to assess potential amino acid bioavailability in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 384–387: 46-55
- Márquez, L., Robles, R., Morales, G. A., Moyano, F. J. (2012). Gut pH as a limiting factor for digestive proteolysis in cultured juveniles of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol Biochem* 38: 859-869.
- Martínez-Montañó, E., Peña, E., Focken, U., Viana, M. T. (2010). Intestinal absorption of amino acids in the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*): *In vitro* uptake of amino acids using hydrolyzed sardine muscle at three different concentrations. *Aquaculture* 299: 134-139

- Morales, G. A., Moyano, F. J. (2010). Application of an *in vitro* gastrointestinal model to evaluate nitrogen and phosphorus bioaccessibility and bioavailability in fish feed ingredients. *Aquaculture* 306: 244 – 251
- Morken, T., Moyano, F. J., Márquez, L., Sørensen, M., Mydland, L. T., Øverland, M. (2012). Effects of autoclaving and sodium diformate supplementation to diets on amino acid composition, *in vivo* digestibility in mink (*Neovison vison*) and *in vitro* bioavailability using digestive enzymes from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Anim Feed Sci Technol* 178: 84-94
- Moyano, F. J., Savoie, L. (2001). Comparison of *in vitro* systems of protein digestion using either mammal or fish proteolytic enzymes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 128: 359-36
- Nengas, I., Alexis, M. N., Davies, S. J., Petichakis, G. (1995). Investigation to determine digestibility coefficients of various raw materials in diets for gilthead sea bream, *Sparus auratus* L. *Aquacult Res* 26: 185-194
- Pedersen, B., Eggum, B. O. (1983). Prediction of protein digestibility by an *in vitro* enzymatic pH-stat procedure. *J Anim Physiol Anim Nutr* 49: 265-277
- Penry, D. L., Jumars, P. A. (1987). Modeling animal guts as chemical reactors. *Am Nat* 129: 69-96
- Perera, E., Moyano, F. J., Rodríguez-Viera, L., Cervantes, A., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J. M. (2010). *In vitro* digestion of protein sources by crude enzyme extracts of the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804) hepatopancreas with different trypsin isoenzyme patterns. *Aquaculture* 310: 178-185
- Rungruangsak-Torrissen, K., Rustad, A., Sunde, J., Eiane, S., Jensen, H., Opstvedt, J., Nygard, E., Samuelsen, T., Mundheim, H., Luzzana, U., Venturini, G. (2002). *In vitro* digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. *J Sci Food Agric* 82: 644-654
- Shipton, T. A., Britz, P. J. (2002). Evaluation of an *in vitro* digestibility technique for the prediction of protein digestibility in the South African abalone, *Haliotis midae* L. *Aquacult Nutr* 8: 15-21
- Smeets-Peeters, M., Watson, T., Minekus, M., Havenaar, R. (1998). A review of the physiology of the canine digestive tract related to the development of *in vitro* systems. *Nutr Res Rev* 11: 45-69
- Sultana, Z., Ahmed, S., Iqbal, S., Chisty, A. H. (2010). Determination of *in vitro* protein digestibility of different feed ingredients for *Nilotica* (*Oreochromis nilotica*). *Bangladesh Res Publ J* 4: 87-94
- Supannapong, P., Pimsalee, T., A-komol, T., Engkagul, A., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Rungruangsak-Torrissen, K. (2008). Digestive enzymes and *in-vitro* digestibility of different species of phytoplankton for culture of the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis* (*Hyriopsis*) *bialatus*. *Aquacult Int* 16: 437-453
- Swaigood, H. E., Catignani, G. L. (1991). Protein Digestibility: *In Vitro* Methods of Assessment. *Adv Food Nutr Res* 35: 185-236
- Tibbetts, S. M., Milley, J. E., Ross, N. W., Verreth, J. A. J., Lall, S. P. (2011a). *In vitro* pH-Stat protein hydrolysis of feed ingredients for Atlantic cod, *Gadus morhua*. 1. Development of the method. *Aquaculture* 319: 398-406.
- Moyano, F. 2013. Modelizando el Biorreactor; o cómo Conocer Mejor el Digestivo de sus Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds). *Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola*, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.356-375.

- Tibbetts, S. M., Verreth, J. A. J., Lall, S. P. (2011b). *In vitro* pH-Stat protein hydrolysis of feed ingredients for Atlantic cod, *Gadus morhua*. 2. *In vitro* protein digestibility of common and alternative feed ingredients. *Aquaculture* 319: 407-416
- Ulleberg, E. K., Comi, I., Holm, H., Herud, E. B., Jacobsen, M., Vegarud, G. E. (2011). Human gastrointestinal juices intended for use in *in vitro* digestion models. *Food Dig* 2: 52-61
- Whelan, C. J., Schmidt, K. A. (2007). Food acquisition, processing, and digestions. In *Foraging: behavior and ecology*: 141-174. Stephens, D. W., Brown, J. S., Ydenberg, R. C. (Eds.). Chicago: University of Chicago Press
- Woolnough, J. W., Monro, J. A., Brennan, C. S., Bird, A. R. (2008). Simulating human carbohydrate digestion *in vitro*: a review of methods and the need for standardisation. *Int J Food Sci Tech* 43: 2245-2256