

Aplicaciones a la Mejora de la Utilización Nutritiva del Alimento en Cíclidos Cultivados en México

Uscanga-Martínez, A.¹, Moyano-López, F.J.², Álvarez-González, C.A.^{3*},
Perales-García, N.¹

1 Lab. de nutrición y producción acuícola, Campus del Mar, Universidad de Ciencias
y Artes de Chiapas, Tonalá, Chiapas. México. ² Departamento de Biología
Aplicada, Escuela Politécnica Superior. La Cañada de San Urbano, Universidad de
Almería, 04120, Almería, España. ³ Lab. Acuicultura, División Académica de
Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera
Villahermosa-Cárdenas km. 0.5, Villahermosa, Tabasco, CP. 86039, México
E-mail: *alvarez_alfonso@hotmail.com

Resumen

El abastecimiento de materias primas para la fabricación de alimento se está dejando sentir, el aumento de la demanda de ingredientes para la alimentación de peces se está enfocando en nuevas fuentes de proteínas, con la finalidad de disminuir la inclusión de harina de pescado, por tal razón en los últimos años las investigaciones pretenden enfocarse en la evaluación de fuentes de proteína de origen vegetal y animal. El presente trabajo pretende dar a conocer los avances en la investigación de nuevas alternativas alimenticias para la nutrición de peces, evaluando su digestibilidad, grado de inhibición, y evaluación de enzimas digestivas a través del tracto intestinal, dando como resultado que la hidrólisis de la proteína en especies como castarrica (*Cichlasoma urophthalmus*) muestran una mayor digestibilidad al sorgo, esto se debe a que los hábitos alimenticios de esta especie es omnívora, en el caso de las tenguayacas (*Petenia splendida*) se observó que los peces tienen mayor digestibilidad a las harinas de fuente animal por tener hábitos carnívoros, y con ello tener nuevas alternativas de fuentes de proteína para la fabricación de piensos altamente digeribles que con ello se cubren varios aspectos como tener las fuentes de proteínas a menor costo y obtener piensos que se han más amigables con el medio ambiente. Los resultados para la inhibición enzimática muestran que los extractos de los cíclidos frente a concentraciones crecientes de harinas reflejan que la harina de sorgo presenta los mayores niveles de inhibición sobre las proteasas alcalinas de la tenguayaca alcanzando un porcentaje de inhibición del (60%) a partir de una concentración de 1.2 mg/ml de harina. En la evaluación de eficiencia de proteína los resultados obtenidos en ambas enzimas tripsina y quimotripsina muestran un valor de $25.04 \pm$

Uscanga-Martínez, A. *et al.* 2011. Aplicaciones a la mejora de la utilización nutritiva del alimento en cíclidos cultivados en México. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 46-104.

3.70 y $24,41 \pm 1,26$ unidades, respectivamente, mientras que en el intestino posterior este es de $(2,39 \pm 1,00$ y $4,90 \pm 1,28$ unidades, respectivamente). Después del tiempo de hidrólisis el 10 % de los aminoácidos presentes fueron liberados

Palabras clave: eficiencia enzimática, digestibilidad, hidrólisis, inhibidores, harinas.

Introducción

La pesca a nivel mundial, probablemente ha alcanzado el potencial máximo de captura. En total, el 80% de las poblaciones mundiales de peces sobre las que se dispone de información han sido registradas como plenamente explotadas o sobreexplotadas (FAO, 2009). En el caso de México el 70% de las pesquerías se encuentran catalogadas como explotadas al máximo o en deterioro (Olmedo, 2009). Como alternativa al problema surge la acuicultura, que ha sido catalogada como el sistema de producción de alimento que tuvo el mayor ritmo de crecimiento en la última década, incrementándose de 30.6 millones de toneladas en 1998 a 41.9 millones de toneladas en el 2003 (FAO, 2007). A nivel mundial se considera como una biotecnología importante, con un enorme potencial de desarrollo para el cultivo de peces de aguas continentales, salobres y marinas (SAGARPA, 2003). Con el cultivo de especies de importancia alimentaria y comercial, como es la producción de carpas con 16,692,147 toneladas, salmones con 1,799,383 toneladas y las tilapias y otros cíclidos con 1,505,804 toneladas, y también aquellas en riesgo o peligro de extinción, que son recuperadas mediante técnicas de cultivo (FAO, 2007).

La acuicultura se presenta como una alternativa para cubrir la creciente demanda de proteína animal (Granados y Garduño, 1998), hacer productivas las extensiones de tierra que no son aptas para la agricultura y optimizar los recursos acuáticos (FAO, 1983), sobre todo en los sectores más vulnerables de la población. Por lo tanto existe gran interés en dirigir fondos y esfuerzos hacia esta actividad en zonas rurales para mejorar el nivel de vida en este sector (Escalera, 2006). Indudablemente el cultivo exitoso de cualquier especie comprende diversos aspectos biológicos, económicos, sociales y del medio ambiente. El continuo desarrollo y mejoramiento en la eficiencia de la producción acuícola requiere a su vez de mejoras sostenidas de la formulación y la tecnología de alimentos. Por consiguiente, la tecnología de la acuicultura ha ido evolucionando y mejorando los rendimientos, mediante el conocimiento científico de los hábitos alimenticios, requerimientos nutricionales, y digestibilidad de los diferentes productos, entre otros, y ello permitirá contribuir a incrementar los rendimientos económicos de la acuicultura, ya que el

desarrollo y rentabilidad de los cultivos intensivos de peces depende, inevitablemente, del diseño y producción de dietas comerciales que satisfagan los requerimientos de nutrientes esenciales y sean aceptadas en cantidades adecuadas para asegurar un crecimiento óptimo (De la Higuera, 1987; Soler *et al.*, 2000).

La nutrición es uno de los factores más importantes en la acuicultura, y con una dieta adecuada se obtiene un mejor desarrollo de los organismos (Carrillo *et al.*, 1987; Barletta, 2001). La determinación de los requerimientos nutricionales, y principalmente los proteínicos, es uno de los aspectos más importantes a considerar para la alimentación de los peces (Catacutan, 2001; Moon *et al.*, 2001; Ng *et al.*, 2001; Kim y Sang-Min, 2005), dada la importancia que tienen las proteínas y los aminoácidos en las numerosas funciones que éstos realizan (Barroso *et al.*, 1994; Kang-Woong *et al.*, 2004; Ali y Jauncye, 2005). La nutrición genera los mayores costos, más de la mitad de la operación del cultivo, por lo tanto es importante el conocimiento en la nutrición y la alimentación práctica ya que es esencial para el éxito en la acuicultura (National Research Council, 1993; Sang-Min *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001; Meyer y Machado, 2004; Ng *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2005). Los requerimientos nutricionales de todas las especies acuáticas cultivadas pueden clasificarse en cinco diferentes grupos de nutrientes; proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales (Tacon, 1994; Wing y Silas, 1994; Hernández, 2000). Los estudios sobre los requerimientos nutricionales son necesarios para la formulación de dietas adecuadas para cada estadio de desarrollo del organismo, tomando en cuenta el conocimiento de sus hábitos alimenticios y características físicas preferenciales de su dieta (D' Abramo y Novell, 1991; Kim *et al.*, 2002).

Las proteínas, al ser el componente básico de los tejidos, son esenciales para el mantenimiento y el crecimiento (Hepher, 1993). Constituyen alrededor del 50 % del peso seco de las células y son fundamentales en todos los aspectos de la estructura celular y de su función, y además aportan los aminoácidos necesarios para un gran número de procesos bioquímicos (Carrillo *et al.*, 1987). Las proteínas son compuestos orgánicos complejos de elevado peso molecular, que contienen, al igual que las grasas y los carbohidratos, oxígeno,

carbono e hidrógeno, y además tienen nitrógeno, y muchas de ellas azufre (Soler *et al.*, 2000). Estas moléculas contienen frecuentemente varias centenas de aminoácidos ya que estos son los constituyentes principales de la proteína y se caracterizan por poseer un grupo nitrogenado básico amino (-NH) y uno carboxilo (-COOH) (Curtis y Barnes, 2002). Se ha demostrado que para lograr el máximo crecimiento en los peces, los aminoácidos esenciales tienen que ser proporcionados en la alimentación ya que no pueden ser sintetizados por el organismo (Cowye, 1999). Sin embargo, los peces no tienen requerimientos de proteína cruda o absoluta, como lo describen Menghe Li *et al.*, (2003), sino que requieren ciertas cantidades de aminoácidos digestibles, mismo que está influido por varios factores como lo son la especie, la edad, la ración alimenticia, composición de la dieta y su contenido en energía digestible, y la temperatura del agua. Los peces cultivados en climas tropicales tienen un requerimiento de proteína más bajo (25 a 30 %) que los cultivados en climas moderados (30 a 40 %) (Hertrampf y Piedad-Pascual, 2000).

Una vez que la proteína es digerida o hidrolizada se liberan los aminoácidos, los cuales son absorbidos por el tracto intestinal y distribuidos a través de la sangre a todos los órganos y tejidos del pez (Soler *et al.*, 2000; Alam *et al.*, 2002). Las proteínas desempeñan gran diversidad de funciones, actúan como catalizadores, como elementos estructurales, en los sistemas contráctiles, como reserva de los elementos nutritivos y como vehículos de transporte; también actúan como hormonas y elementos de protección (Tacon, 1987; Lehninger, 1995). Desde el punto de vista de la nutrición, los requerimientos nutricionales desempeñan un papel importante, esta es la razón fundamental por la cual se estudian.

Una vez realizados estos estudio, se puede determinar la digestibilidad para la proteína, con el objetivo principal de maximizar el crecimiento y la supervivencia de los organismos al mínimo costo y en el menor tiempo posible (Knights, 1985). Sin embargo, para la elaboración de alimentos para la acuicultura, son innumerables las fuentes proteínicas que se utilizan; entre ellas destacan harinas y aceites de animales marinos, los cuales sirven de base para la formulación y fabricación de los pellets. Desafortunadamente, la mayoría de esas fuentes de proteína no son valoradas desde el punto de vista de la capacidad digestiva

de los organismos que las consumen. La formulación y fabricación de los alimentos se base en los denominados análisis proximales que relacionan la cantidad de combustibles que presentan los alimentos y no en función de la cantidad que requiere el organismo respecto al tiempo. Una aproximación que permite valorar la capacidad digestiva de los organismos se da por la utilización de métodos “*in vivo*”, en los que se determina una serie de parámetros o índices relacionados con el grado de aprovechamiento de las dietas en relación con el combustible 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. Por otra parte, el empleo de marcadores no digeribles (como el óxido de cromo), conlleva algunos problemas y solamente son una medida indirecta de la digestibilidad, lo cual resulta 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 y Liang, 1995).

Debido a lo anterior, se han desarrollado métodos “*in vitro*” que simulan la digestión de los organismos y permitan predecir la digestibilidad de las diferentes harinas que son susceptibles de utilizarse en la formulación de alimentos. De esta manera, algunos investigadores recomiendan que los estudios se encaminen hacia el desarrollo de este tipo de técnicas (Tacon, 1995). Originalmente, 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 membrana permeables a modo de diálisis que permiten separar y cuantificar en continuo los productos de hidrólisis (Savoie y Gauthier, 1986). Actualmente, se mejoraron los métodos anteriores, con el desarrollo del sistema del 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 y 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.

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 descompuestos 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 aminoacídica, como la suma de mmoles de aminoácidos por gramo de proteína. Desgraciadamente, la mayoría de los estudios se han aplicado a organismos terrestres, algunas especies de ciprínidos (Eid y Matty, 1989) y salmónidos (Grabner, 1985; Dimes y Haard, 1994).

Los cíclidos nativos son un recurso pesquero que debido a la sobreexplotación y a las modificaciones de su hábitat se considera deteriorada, ya que en los últimos años han sido sometidas a fuertes presiones de captura con lo que se ha provocado un agotamiento de las poblaciones silvestres. Esta problemática es evidente en las tallas que se ofrecen en el mercado, las cuales han disminuido. En este sentido, sería recomendable implementar alternativas de producción con el cultivo de estas especies, a la par de programas de manejo, que permitan restaurar las poblaciones naturales por medio del cultivo de peces ya sea para consumo o su liberación en los cuerpos de agua con el fin de reducir la presión sobre el recurso y ofrecer alternativas a las comunidades rurales. Además, que estas especies son consideradas como uno de los peces nativos con mayores posibilidades para su cultivo por las características biológicas y de manejo que presentan. Por otra parte, el Sureste de México presenta una alta demanda de este tipo de productos tanto para los mercados locales como regionales al tener una excelente tradición cultural de consumo. Por estas razones es imperativo conocer todos los aspectos biológicos básicos que permitan realizar el manejo adecuado durante su cultivo y por ende garantizar su rentabilidad. En la actualidad se cuenta con una amplia experiencia en investigación lo que indica que estas

especies son un excelente candidato para ser cultivados, sin embargo existen lagunas del conocimiento que tienen que ser abordadas para lograr un éxito completo. 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 costo, disponibilidad y facilidad de procesamiento 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. De aquí se deduce la gran importancia de obtener un conocimiento detallado sobre la función digestiva, dentro de la cual cumplen un papel primordial diferentes enzimas, cuyo funcionamiento se ve afectado por factores ligados tanto a la fisiología del animal como a las características del alimento o la forma en que este es suministrado. De entre los muchos factores estudiados hasta la fecha en relación con el funcionamiento de las enzimas digestivas (temperatura, salinidad, edad del pez, etc) existen algunos que determinan en buena medida la hidrólisis final de los sustratos y que no han sido hasta la fecha analizados con suficiente detalle. Este es el caso de:

- El tiempo de reacción; es decir el tiempo que permanecen en contacto con los sustratos presentes en la digesta. Este tiempo está estrechamente ligado a la velocidad de tránsito digestivo.
- La relación E:S; es decir, la cantidad de enzima que se pone en contacto con los sustratos correspondientes.
- Las diferencias en la sensibilidad frente a los inhibidores presentes en los ingredientes vegetales.

Por otra parte, se suele prestar enorme atención a los procesos de digestión y absorción de componentes nitrogenados, dado el papel primordial que los mismos representan en el metabolismo de los peces. Pero últimamente, el desarrollo de sistemas de producción acuícola muy intensificados, tanto en medios marinos como reservorios de agua dulce, así como el empleo de harinas vegetales con alto contenido en fósforo no biodisponible, han llevado a estudiar con más detalle la digestión de este elemento, así como la manera de reducir su aporte al medio, diseñando alimentos artificiales amigables al ambiente, evitando al máximo el desecho de sustancias nitrogenadas e incrementar la velocidad de crecimiento y la supervivencia. En este sentido, sabemos que la acuicultura nacional está sustentada en especies exóticas. Lo cual ha frenado el desarrollo tecnológico para el cultivo de especies nativas, por lo que el desarrollar esta tecnología es prioritario. En este sentido, el laboratorio de acuicultura de la UJAT-DACBIOL ha realizado los estudios biológicos básicos y cerrado los ciclos de cultivo de estas especies, lo que ha permitido iniciar la transferencia de esta tecnología a diferentes comunidades del estado.

Antecedentes

La acuicultura ha sido evaluada como el sistema de producción de alimento que tuvo el mayor ritmo de crecimiento en la última década, incrementándose de 30.6 millones de toneladas en 1998 a 41.9 millones de toneladas en el 2003 (FAO, 2006). De acuerdo a la estadística de la FAO de 2006, la producción en volumen por grupo de especies se distribuyó de la siguiente manera: peces de agua dulce 21,938,000 toneladas, moluscos 11,784,000 toneladas y crustáceos 2,131,000 toneladas. Dentro de la producción de peces, dominan por mucho la producción de carpas con 16, 692,147 toneladas, los salmones con 1,799,383 toneladas y las tilapias y otros cíclidos con 1, 505,804 toneladas. Esta situación se debe a la participación de los países asiáticos como China y la India, quienes dominan la producción mundial piscícola de agua dulce.

En México también se considera a la acuicultura como una biotecnología importante, teniendo un enorme potencial de desarrollo tanto por la posición geográfica como por la

disponibilidad de recursos de agua en nuestro país: 11,500 km de línea costera, 3 millones de km² de la zona económica exclusiva, 358,000 km² de plataforma continental, y más de 2.9 millones de hectáreas de aguas continentales, incluyendo 1.6 millones de lagunas costeras (Paniagua y Lizarraga, 1995; Anguas, 2001). Hasta el momento las estadísticas de producción indican que predomina el cultivo de las especies de agua dulce. Del total nacional de la producción de peces, tilapia, carpa, bagre, trucha, charales y lobina representan más del 55% de la producción (SEMARNAP, 2000). Sin embargo, la mayoría de los cultivos de peces que se realizan en México son con especies exóticas como las tilapias y las carpas. La razón de la introducción de especies al país se debe en mayor grado al desconocimiento de la biología y potencial de cultivo de las especies nativas (Harfush, 1992). La situación de las especies nativas en algunos casos ha llegado a ser crítica como consecuencia de diversos fenómenos de competencia y depredación por parte de las especies exóticas introducidas en habitats naturales (Rojas y Mendoza, 2000). De las especies identificadas que conforman nuestra diversidad íctica, más del 90% son nativas mientras que el resto son introducidas. De las especies nativas se han hecho intentos aislados y poco organizados para desarrollar su tecnología de cultivo y las especies introducidas cuentan con un mayor conocimiento de sus tecnologías, aunque estas han sido desarrolladas en otros países y continentes, y tan solo se han adaptado a las condiciones de nuestro país (Lozano, 2000).

La necesidad de desarrollar sistemas de producción para la utilización de la ictiofauna nativa para su cultivo es de gran importancia, no solo como parte del patrimonio cultural y biológico de cada región, ó como fuente de alimentación y consumo, lo cual ya es relevante, sino también hacer un uso racional y sostenido de nuestras especies nativas ya que es evidente como se ha determinado a través del creciente número de casos en donde la introducción indiscriminada de organismos han tenido consecuencias negativas sobre la diversidad y composición de las especies y sobre la calidad en el medio que habitan, como promotor de crecimiento productivo, empleo y divisas, particularmente si se desarrolla en un contexto de mercado y rentabilidad, de manera que puede satisfacer la demanda regional existente y las crecientes oportunidades del mercado exterior (Mendoza, 1994).

De esta forma, el impacto de las especies exóticas se refleja a nivel biológico (ecológico y genético) y socioeconómico, la base de datos sobre introducción de especies acuáticas, donde la FAO revela que la mayor parte de los efectos biológicos de especies introducidas han sido negativos, mientras que los impactos socioeconómicos han sido en su mayor parte positivos. Así, la alteración de los hábitats, la contaminación, la hibridación, la consanguinidad y la introducción de exóticos son actividades vinculadas a la acuicultura que conducen a la disminución de la biodiversidad en organismos acuáticos (Pérez, 1996; Soto *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2003). De igual manera, se ha señalado que el desarrollo de las actividades de acuicultura fundamentada en especies exóticas puede ser un problema más que una solución (Pérez *et al.*, 2000 y 2003).

Recientemente en el país se han realizado estudios para lograr el cultivo de las especies nativas debido principalmente a la sobrepesca y por consiguiente la reducción en los volúmenes de captura, así como cambios en la estructura y composición de las comunidades acuáticas (**NOM-041-PESC-2004**). De esta manera, los estudios para el cultivo de especies nativas pretenden disminuir la gran problemática en torno a su sobreexplotación como recurso pesquero en México, por lo que algunos de las especies más estudiadas son los cíclidos nativos, llamadas comúnmente mojarra, de las cuales las mas representativas en este sentido son las del género *Cichlasoma* y *Petenia* (Harfush, 1992). Las cuales indica que el alto potencial productivo de la tenguayaca *Petenia splendida* y castarrica *Cichlasoma urophthalmus* puede alcanzar a cubrir las demandas de la población, siendo estas especies las favoritas por los consumidores (Domínguez y Rodiles, 1998).

Tenguayaca.

La mojarra tenguayaca se distribuye desde el Sureste de México (Tabasco, Chiapas, Campeche y Quintana Roo), hasta Centroamérica. Es muy común en todo el estado de Tabasco sobre todo en lagunas, ríos y en lugares denominados popales (Resendez y Salvadores, 1983; Domínguez y Rodiles, 1998; Torres-Orozco, 1991). Es una especie tolerante a variaciones ambientales; se ha adaptado como un organismo resistente a

intervalos de temperatura que fluctúan de 24 °C a 34 °C (Reséndez y Salvadores, 1983; Páramo, 1984; Caro *et al.*, 1994; Gamboa *et al.*, 1997). En lo que se refiere a oxígeno disuelto, puede soportar rangos amplios, desde aguas anóxicas (1.6 mg/L) hasta agua sobresaturada (7.7 mg/L), pH entre 7.03 a 8.45 (Páramo *op cit.*). Es un pez que tiene un rango amplio de distribución desde dulceacuícola hasta aguas salobres (Caro *op cit.*). Alcanza tallas de hasta 37.5 cm de longitud total y 1,500 g de peso, su cuerpo es alto y comprimido, presenta aleta caudal redondeada, mandíbulas protráctiles, la inferior muy sobresaliente. Tiene boca grande y cada mandíbula esta armada con una hilera de dientes viliformes, la otra serie comprende dientes largos y cónicos (Toral, 1970), sin vaina escamosa en la base de las aletas dorsal y anal (Páramo, 1982). Presenta un solo par de aberturas nasales en la cabeza, con línea lateral interrumpida, una sola aleta dorsal continua formada por una porción espinosa y otra de radios; la aleta anal similar a la dorsal, pero más corta. En la parte media del cuerpo presenta siete manchas de color negro, que van desde el opérculo hasta el pedúnculo caudal, teniendo en la base de este una mancha más fuerte y definida. El cuerpo es grisáceo con tintes amarillos en la porción media, sobre todo en el opérculo y las mejillas (Velasco, 1976; Chávez-Lomelí *et al.*, 1989; Torres-Orozco, 1991; Domínguez y Rodiles, 1998; Contreras, 2003; Vidal, 2004).

La talla mínima de maduración sexual que se tiene registrada para la tenguayaca es de 16.5 cm de longitud total, esta especie pone sus huevos adheridos a superficies sólidas y tersas, asimismo se señala que las hembras ponen cerca del millar de huevos; este número varía de acuerdo al peso de la hembra, los huevos tardan en eclosionar de 3 a 5 días según la temperatura del agua. Los ovarios se encuentran bien definidos hasta el estadio IV, son de color anaranjado y se encuentran dos tipos de huevos: unos muy pequeños y otros grandes y alargados. Estos últimos cuando se encuentran en una fase muy cercana a la maduración miden de 1.0 a 2.0 mm de largo y tienen un color amarillo claro (Resendez y Salvadores, 1983). Se puede confirmar que la tenguayaca es un pez de reproducción precoz y potencialmente capaz de reproducirse durante todo el año, sin embargo presenta un período preferencial de reproducción; este período comprende de marzo a septiembre con temperaturas de por lo menos 28 °C (Chávez *et al.*, 1989; Martínez, 2004). En el medio ambiente natural es un pez principalmente carnívoro, esencialmente ictiófago, y en menor

intensidad se alimenta de restos vegetales, por lo que se determina que las tenguayacas en estadio juvenil son principalmente carnívoros, añadiendo mayor cantidad de vegetación a su dieta al convertirse en adultos. También se ha descrito que sus hábitos alimenticios son diurnos (Resendez y Salvadores, 1983; Caro *et al.*, 1994; Santiago *et al.*, 1997; Valtierra, 2000)

Castarrica

La distribución de esta especie abarca desde el sureste de México, en la porción media del estado de Veracruz, norte de Oaxaca, Tabasco, Campeche, Yucatán, ríos de Quintana Roo, hasta Centro América en Belice, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Miller (1976) citado por Martínez (1987). Es un pez dulceacuícola que alcanza más de 30 cm de longitud y más de 400 g de peso, tiene cuerpo alto y comprimido, un solo par de orificios nasales en la cabeza, mandíbulas con dientes en forma de conos; el par central de dientes en la mandíbula superior es más grande que los demás, la línea lateral es interrumpida, tiene una sola aleta dorsal y una anal, la aleta caudal es redondeada.

Chávez *et al.* (1989), mencionan que sus hábitos alimenticios son omnívoros con tendencia carnívora pero que utiliza igualmente los recursos más abundantes del medio donde se encuentra y se comporta como oportunista. Martínez-Palacios y Ross (1994), su dieta se compone, principalmente, de materia orgánica, crustáceos, camarones, anfípodos, moluscos, isópodos, poliquetos, huevos de invertebrados y restos tanto vegetales como de peces (Medina, 2003). Se describe a este pez con un color del cuerpo que varía de castaño rojizo a verde violáceo, con 7 bandas transversales azul oscuro o azul verdoso y una mancha de igual color en la base de la cola. La cabeza es verdosa mientras que la garganta y el pecho, son rojizos. Las aletas dorsal, caudal y anal son verdes y su borde es rojo; la dorsal presenta pequeñas manchas rodeadas de color rojo; las pectorales son amarillas. Crece y se reproduce en un amplio rango de ambientes, desde lagos de agua dulce hasta lagunas salobres y manglares.

Tilapia

Pez dulceacuícola y estuarino, que alcanza hasta 50 cm. y 2 Kg. de peso, cuerpo alto y robusto, la cabeza es pequeña en relación con la longitud del cuerpo. Presenta escamas grandes y fuertes, la línea lateral es interrumpida (Morales 1991). La aleta anal tiene 3 espinas y de 8 a 11 radios, Presenta colores variables, pero en general, posee un color gris plateado uniforme, generalmente las tilapias poseen dientes en la boca y en la faringe, esta es una característica de las especies herbívoras, ya que éstos últimos son muy fuertes, lo que les permite mayor trituración del alimento, factor que les ayuda a su digestión (Pillay, 1993; Fitzsimmons, 1997). El sistema digestivo de la tilapia, se inicia en la boca, con dientes mandibulares continua en el esófago hasta el estomago. El intestino es de forma de tubo hueco y redondo que se adelgaza después del píloro, diferenciándose en dos partes, una inferior corta que corresponde al duodeno y una posterior y una posterior más grande de menor diámetro. El intestino es 7 veces más largo que la longitud total del cuerpo de pez, característica que predomina en las especies herbívoras (Egna 1997).

Evaluación de la eficiencia en la digestión enzimática de las proteínas en la tilapia *Oreochromis niloticus*

En los últimos años, un gran número de trabajos han sido enfocados a la caracterización del tipo y cantidad de enzimas presentes en el tracto digestivo en peces (Chan *et al.* 2004; Papoutsoglou y Lyndon 2005, Liu *et al.* 2008), así como su respuesta a cambios en la composición de los alimentos (Applebaum y Holt 2003, 2006a Papoutsoglou y Lyndon; Cara *et al.* 2007). Estos trabajos ofrecen información muy valiosa sobre las diferencias existentes de cada especie, entre las enzimas y su capacidad para hidrolizar sustratos específicos, este es en gran medida un factor clave para explicar las diferencias observadas en la digestibilidad de los principales nutrientes de alimentos. Sin embargo, el resultado neto de la función de la enzima depende de otros factores importantes, como su concentración relativa presente en el intestino del pez, así como el tiempo disponible para hidrólisis, siendo este último determinado por el tránsito de los alimentos. Se cree que la

mayor eficiencia en el proceso digestivo únicamente se logra cuando se produce una cantidad adecuada de enzima, y se presenta un tiempo suficiente para la terminación de la hidrólisis (Scocco *et al.*, 1997, Olsson y Holmgren 2001). Esto podría conducir a la determinación de lo que se ha llamado "eficiencia enzimática", este es un índice de la estimación de una determinada especie alimentada en condiciones normales, que para obtenerla, se requiere la cuantificación tanto de la cantidad total de la actividad enzimática producida en un momento determinado y la estimación del tiempo de tránsito intestinal de los alimentos (Chan *et al.*, 2004). A pesar de la importancia de este último parámetro en la evaluación de la función digestiva de los peces, pocos trabajos se han orientado a su estimación (Anderson 1991; Pääkkönen and Marjomäki 1997). El experimento se enfocó a medir la velocidad de tránsito intestinal y el total de las principales proteasas intestinales tripsina y quimotripsina producidas después de la ingestión de los alimentos.

Materiales y métodos

El tránsito de los alimentos en el tracto digestivo de los peces fue evaluada visualmente, este protocolo requirió el uso de alimentos con diferentes colores para poder detectarlos fácilmente después de la disección del intestino, los peces que se utilizaron en los muestreos secuenciales debían tener una talla muy similar y realizar un protocolo de alimentación en el cual todos los peces debían recibir la misma cantidad de alimentos.

Peces experimentales y alimentación

Se utilizaron juveniles de *O. niloticus* (sexos: mixtos), con un peso promedio ($n = 50$, $30 \pm 5,0$ g), se obtuvieron de una granja (VALAQUA; Valencia, España). Los peces fueron mantenidos en tanques de 50 L dentro de un sistema de recirculación que dispuso de agua libre de cloro a una temperatura entre 28-29 °C. El fotoperiodo fue 12L/12D. Cada grupo de peces que constituyeron una muestra ($n = 5$) se mantuvieron en compartimentos separados dentro de los tanques. Los grupos fueron formados por peces que presentaron la mayor similitud en peso. El agua utilizada se manejo con suministro de aireación continua,

y la concentración de oxígeno se mantuvo en $6.40 (\pm 0.28 \text{ mg/L})$. Un 10% del volumen total de agua fue reemplazado diariamente. Se formularon dos dietas semi-purificadas con una composición similar (Tabla 1), las cuales se tiñeron, una de color blanco y otra de color verde oscuro al incluir una pequeña cantidad de talco en la primera y mientras que en la segunda se le agregó óxido de cromo. Cada dieta fue preparada mezclando todos los ingredientes secos en una batidora industrial (Samimic, modelo BM-11, Azpeitia, España) y después se agregó el aceite de pescado a la mezcla. Posteriormente se añadió agua hasta formar una masa dura, la mezcla se pasó a través de un molino de carne (BRAHER Internacional, modelo P 22 a 82). Obteniendo pellets de 2 mm los cuales se secaron a temperatura ambiente (25°C), siendo entonces embasados en bolsas de plástico y refrigerados a 5°C hasta su uso.

Tabla 1. Composición de las dietas experimentales utilizadas para evaluar el tránsito de alimenticio en juveniles de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Ingredientes (g 100-g dieta)	Blanco	Verde
^a Caseína	35	35
^b Salvado de trigo	25	25
^c Aceite de pescado	10	10
^d Dextrina	17	17
^e Carboximetil celulosa	5	10
^f Alginato	2	2
^g Talco	6	0
^h Oxido de cromo	0	1

^aCaseína= EPSA, # Lote 270501703, fabricado en España

^bSalvado de trigo= Comercial, Almeria, España

^cAceite de pescado= AFANSA # ES.36.01.POL.-C3

^dDextrina= Especialidades puma # Lote 070237 fabricado en España

^eCarboximetil celulosa= Walocel C, fabricado en Alemania

^fAlginato-lisina HCl= EPSA, fabricado en España

^gTalco= Panreac quimica, Sau # catalogo 141733.1211

^hOxido de cromo= Jalmek # catalogo C5260-05

Protocolo de alimentación y medición de paso intestinal

Durante el período de aclimatación (10 días), los peces fueron alimentados con un pienso comercial dos veces al día. Antes del experimento, los peces se sometieron a un periodo de inanición durante 24 horas para asegurarse de que el tracto digestivo se encontraran vacíos, realizándose pruebas preliminares de disección en ese momento, encontrando que todos los peces muestreados en el tiempo 0 presentaron intestinos vacíos. Los peces recibieron una primera alimentación a base de dieta verde (punto 0), transcurridos 120 minutos después se suministró una segunda alimentación constituida por la dieta blanca, y 480 min después una tercera alimentación constituida por dieta verde. La dieta suministrada fue del 1% del peso vivo de cada pez; ensayos previos demostraron que esta cantidad de alimento era suficiente para satisfacer el consumo de los peces.

Uscanga-Martínez, A. *et al.* 2011. Aplicaciones a la mejora de la utilización nutritiva del alimento en cíclidos cultivados en México. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuicola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuicola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 46-104.

Se establecieron un total de 8 muestreos en diferentes momentos después de la alimentación, inicialmente a 30, 60 y 90 minutos y desde de este momento a diferentes intervalos. Los peces seleccionados en cada muestreo ($n = 5$) se sacrificaron con una sobredosis de anestésico MS 222 (metanosulfonato triclaína, Argent, Laboratories, Inc., Redmond, WA, USA) a una concentración de 1 g L^{-1} y fueron mantenidos en agua fría hasta su procesamiento. (Los procedimientos de manipulación de los peces cumplieron con los términos del Comité para el Uso Ético de los Animales Experimentales). El aparato digestivo fue extraído cuidadosamente por disección, sobre una mesa provista con una escala milimétrica y cada biometría fue registrada por medio de fotografías. Las imágenes fueron posteriormente procesadas digitalmente utilizando el software (Image-Pro Plus 5.1) para medir la longitud total del intestino (LI) y la diferencia en la distancia en mm entre las dos distintas dietas dentro del intestino en relación con el esfínter pilórico de cada pez.

La cuantificación de la producción de enzimas

Una vez fotografiado el intestino de cada pez se dividió en dos secciones iguales (intestino proximal y distal del intestino; IP y ID), se pesaron y se utilizaron para la preparación de los extractos enzimáticos. Los extractos fueron preparados por la homogenización de los tejidos a una proporción de 1:10 con agua destilada (peso/volumen) utilizando un disruptor de tejidos ultrasonicos (Misonix, modelo Microson Ultrasonico disruptor celular, NY) como se detalla en Moyano *et al.* (1996). Los sobrenadantes obtenidos tras la centrifugación a 16,000 g durante 30 minutos a 4 °C fueron almacenados a 20 °C hasta su uso para el análisis enzimático. La concentración de proteína soluble en los extractos se determinó por el Método de Bradford (Bradford1976) usando albúmina bovina a razón de 1 mg mL^{-1} .

La actividad de la tripsina se midió con 1 mM de N-benzoil-DL-Arg-p-nitroanilida (BAPNA, Sigma B4875) en 50 mM de Tris-HCl, a un pH 8, y 20 mM de CaCl_2 . BAPNA fue disuelto en DMSO de 1 ml y se aumentó a 100 ml con solución tampón 2 (50 mM Tris-

HCl, pH 8, 20 mM CaCl₂). Los cambios en la absorbancia a 410 nm se registraron durante 3 minutos (Erlanger et al. 1961). La actividad de la quimotripsina fue evaluado similar al anterior, con 100 mM de succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida (SAPNA, sigma S7388) en solución tampón como sustrato. La Absorbancia a 410 nm se midió con un espectrofotómetro Ex Multiskan (Thermolab Sistemas, Helsinki, Finlandia). Una unidad de actividad fue definida como un 1 μ mol de p-nitroanilina liberada por minuto de tripsina o quimotripsina según sus respectivos sustratos.

La actividad total por peso de tejido se calculó tomando en cuenta el peso de cada porción de intestino, mientras que la eficiencia enzimática (EE) en cada sección del intestino se calculó de la siguiente manera:

EE = Actividad enzimática (1 μ mol de p-nitroanilina X min⁻¹) X el tiempo de residencia de la digestión en determinada sección (en minutos)

Análisis estadístico

Los datos obtenidos sobre las diferencias en la actividad de la tripsina y quimotripsina (mU) en las diferentes secciones de intestino (IP e ID), fueron analizados con una ANOVA de una vía. Las diferencias entre las medias $p < 0.05$ se analizaron mediante la prueba de Tukey (Zar 1996). Empleando el Paquete de análisis Statistica versión 7.0 (software, Arizona, EE.UU.).

Resultados

Al momento de la disección todos los peces presentaron estómago lleno. Sin embargo, en los muestreos posteriores se observaron dos peces que presentaban un patrón anormal en la evacuación gástrica, los cuales se descartaron para los cálculos siguientes. El cálculo de la progresión de la digesta (en la parte delantera) a lo largo del intestino (LI) después de la alimentación en relación con el tiempo, se incluyó en una ecuación logarítmica (Figura 1).

El tiempo para realizar el paso intestinal se calculó mediante la sustitución de "Y" en la ecuación por la longitud media del aparato digestivo obtenido de todos los peces muestreados ($n = 50$, $620 \text{ mm} \pm 15$). El valor obtenido sobre el tiempo de progresión fue de 440 min (7.15 h). Además, el tiempo medio de paso de los alimentos a lo largo de cualquiera del IP o ID se estimó teniendo en cuenta su longitud media respectiva, siendo 320 y 250 minutos, respectivamente.

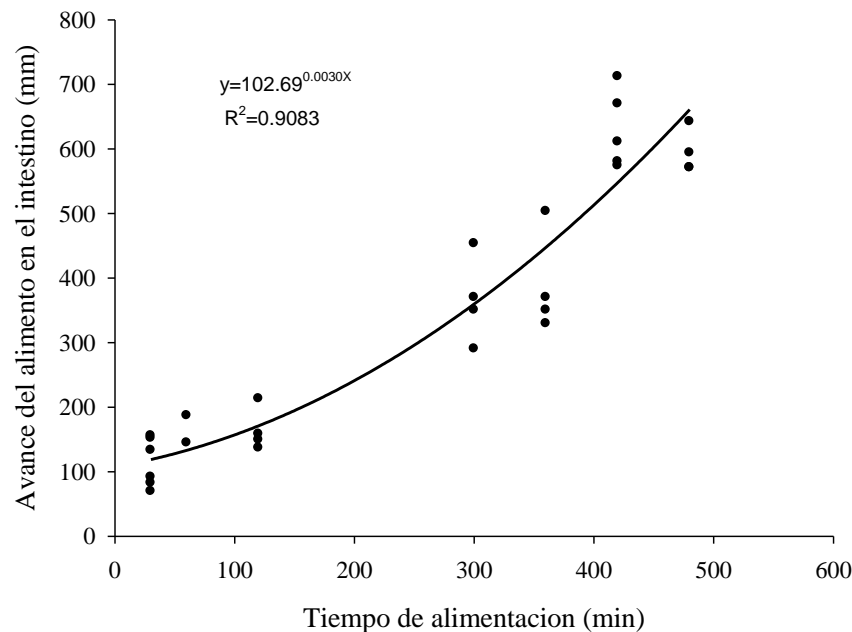


Figura 1. Progresión del alimento con el tiempo en el intestino de juveniles de tilapia

La actividad de las dos proteasas alcalinas, la tripsina y la quimotripsina, fueron medidas en diferentes momentos después de la ingestión de alimentos en las dos secciones del intestino (IP e ID), las cuales se presentan en la figura. 2.

A pesar de las grandes variaciones individuales, se observa un incremento claro y progresivo en la actividad de la tripsina con respecto al tiempo registrado en el IP con valores significativamente más altos ($p < 0.05$) a 360, 480 y 610 minutos en comparación con los tiempos iniciales. La Actividad máxima observada fue de casi 26 mU, alcanzando el máximo peso del tejido (TWT) 6 horas después a partir del tiempo 0 (estómago vacío). Esto

podría ser considerado la máxima producción de tripsina disponible para la digestión en el intestino de esta especie, aunque el valor medio calculado para todo el período fue de $15,9 \pm 3,6$ mU por TWT. La actividad de la tripsina medida en el ID fue mucho menor y se mantuvo relativamente constante durante todo el tiempo de observación ($2,39 \pm 1,00$ mU por TWT). En el caso de la quimotripsina, la actividad relacionada con el tiempo después de la ingestión de las dietas en el IP e ID no presentaron variaciones significativas. En contraste a la tripsina, los valores más altos de actividad de la quimotripsina fueron medidos incluso pocos minutos después de la ingestión de los alimentos ($24,41 \pm 1,26$ mU por TWT), presentándose una actividad mucho más baja en el intestino distal; ($4,90 \pm 1,28$ mU por TWT).

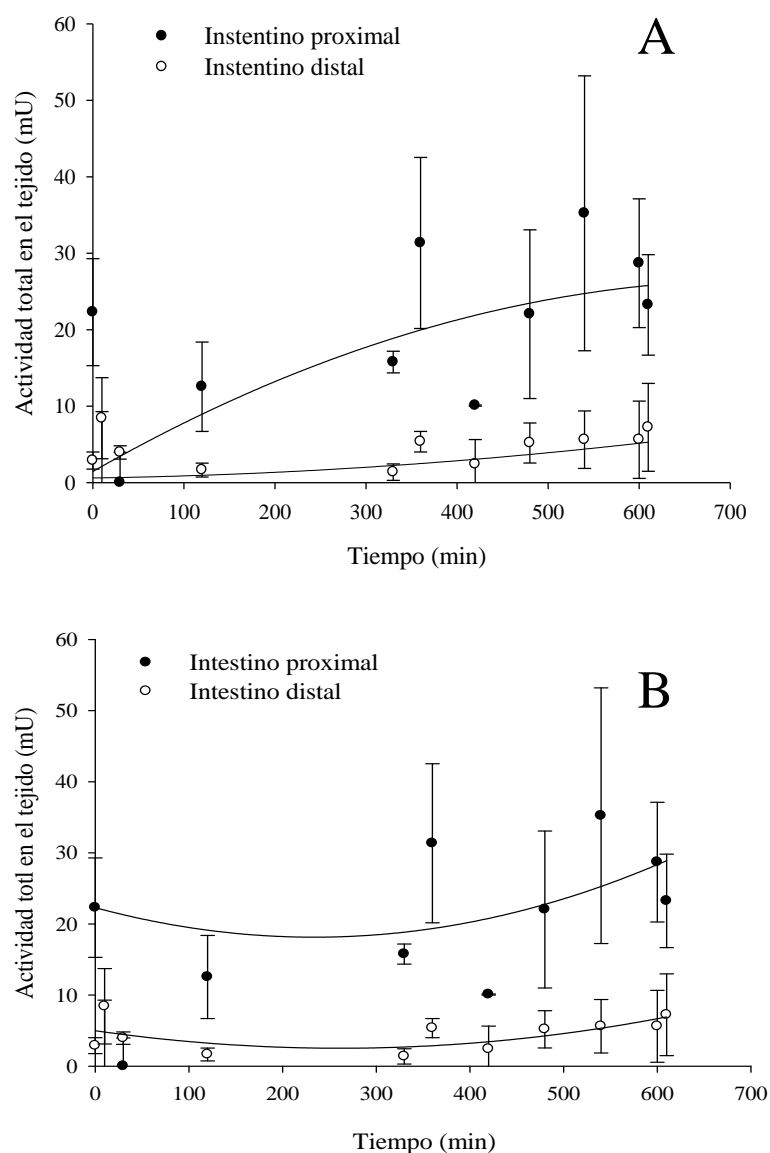


Fig. 2. Producción total de la tripsina (A) y quimotripsina (B) con respecto al tiempo después de la alimentación de los juveniles de tilapia.

Los valores de la eficiencia enzimática estimada para cada enzima y cada sección del intestino se concentraron en la Tabla 2. La combinación entre una concentración enzimática más alta y un mayor tiempo de residencia de la digesta en el IP dio como resultado valores mucho más altos (de seis a nueve veces más altos) en comparación con los obtenidos en el ID, los cálculos obtenidos de la estimación de la eficiencia enzimática obtenidos fueron de

5100 vs 597 μmol de la tripsina; 7811 vs 1225 μmol para quimotripsina, en el IP e ID respectivamente.

Tabla 2- Estimacion de la eficiencia enzimática en las dos secciones intestinales en juveniles de tilapia.

	Intestino proximal			Intestino distal		
	Promedio de produccion enzimatica (mU)	Tiempo de residencia (min)	Estimacion de la eficiencia enzimatica (mol)	Promedio de produccion enzimatica (mU)	Tiempo de residencia (min)	Estimacion de la eficiencia enzimatica (mol)
Tripsina	15,94 \pm 3.6	320	5,100	2,39 \pm 1.00	250	597
Quimotripsina	24,41 \pm 1.26	320	7,811	4,90 \pm 1.28	250	1,225

Eficiencia enzimatica (expresada en μmol de p-nitroanilina) = media de la actividad enzimática (mU) x tiempo de residencia en la sección del intestino (minutos). El tiempo de residencia en cada sección se ha calculado teniendo en cuenta su duración media en la ecuación de la progresión de la alimentación.

Discusión

A pesar del gran número de trabajos publicados enfocado a la determinación del tiempo de evacuación gástrica en diferentes especies de peces (Andersen 2001; Andersen y Beyer, 2005, 2007), muy pocos se han enfocado a la determinación del tiempo de tránsito intestinal (Storebakken *et al.* 1999). Esto puede deberse al hecho que en peces que poseen estómago, el tiempo de retención y el pre-procesamiento de los alimentos en este órgano es el punto clave que determina el curso subsecuente de la digestión en el intestino. En los peces herbívoros como la tilapia, el estómago es reducido y apenas funcional o ausente por completo, por lo cual la digestión de los alimentos se produce principalmente en la parte anterior, así como en todo el tránsito intestinal en la que el tiempo para realizar la digestión es de suma importancia. Por esta razón, el presente estudio se enfocó a la determinación de la velocidad de tránsito intestinal.

En el presente trabajo, el tiempo total requerido para la evacuación intestinal en juveniles de tilapia se estimó en 7.15 h. Este es un corto período de tiempo para la finalización del tránsito digestivo cuando se compara con algunas evaluaciones reportadas en especies carnívoras: 20-60 h como el observado en el merlán *Merlangus merlangus* (L.) (Andersen 1998), 5 a 17 h en lota *Lota lota* L. (Pääkkönen *et al.* 1999), o hasta 48 horas para el lucio del norte *Esox lucius* (Nilsson y el Brönmark 2000). Sin embargo, tales tiempos de tránsito concuerdan con el rango de 2 a 6 h en varios peces de estómago reducido como el pejerrey *Atherinops affinis* L. (Logothetis *et al.* 2001). El pez loro (*Scarus gibbus* L. & *Scarus jonesi* L.) (Smith y Paulson, 1974), o el blenio oxidado *Parablennius sanguinolentus* a una temperatura entre 20 y 30 °C (Horn y Gibson 1990). Sin embargo un tiempo de tránsito intestinal mas largo (12–20 h), fue reportado en el palometa *Odax pullus* de estomago pequeño a temperaturas entre 13 y 15 °C. (Clements y Rees 1998).

Un gran número de factores puede afectar el tiempo de tránsito de la digesta en el intestino de los peces. Algunos de ellos dependen de las características anatómicas del pez (talla del pez, presencia o ausencia de estómago, longitud total del intestino, etc), por otra parte existen factores externos, como la temperatura del agua (Singh-Renton y Bromley, 1996; Pääkkönen and Marjomäki 1997; Hurst, 2004), tamaño del alimento (Daan 1973; Bagge 1977; Andersen (1999) o la calidad del alimento (Klumpp y Nichols 1983; Targett y Targett 1990; Fris y Horn, 1993; Polunin *et al.* 1995). Este último parece influir en gran medida el tiempo de paso de los alimentos, para mantener un adecuado flujo de nutrientes, ya que el consumo continuo de alimentos de baja calidad, se traduce en un mayor tiempo de tránsito (Horn y Messer 1992). La temperatura del agua en la que los peces se mantuvieron (28.5 °C) combinado con el punto anterior podría explicar el corto tiempo de tránsito intestinal registrado en el presente estudio en juveniles de tilapia.

Un gran número de estudios se han orientado a la cuantificación de las proteasas digestivas en el intestino de diferentes peces (Drewe *et al.* 2004; Lundstedt *et al.* 2004; Chakrabarti *et al.* 2006; Jun-Sheng *et al.* 2006). La mayoría de estos estudios están enfocados a la generación de información a cerca de actividades específicas en relación a la evaluación de

proteínas solubles o tejidos. En el presente estudio, se evaluó la actividad enzimática tomando en cuenta tanto las unidades de actividad por gramo de tejido y la masa de tejido correspondiente, lo que se definió como "la capacidad" según Kuz'mina (1996). Sin embargo, se ha realizado un reducido número de estudios enfocados a la estimación de la producción de una enzima determinada como un conjunto en diferentes partes del intestino (Logothetis *et al.* 2001; Papoutsoglou y Lyndon 2006b). La realización de este tipo de estudios podría dar lugar a una mejor comprensión acerca de la capacidad que poseen las diferentes especies para hidrolizar substratos teniendo en cuenta las diferencias existentes en el tamaño del tracto digestivo de cada especie. En el presente estudio, claras diferencias en la actividad entre tripsina y quimotripsina fueron encontradas al comparar el IP e ID registrándose valores aproximadamente seis veces mas altos en el primero sobre el segundo. Esto podría explicarse tomando en cuenta que la porción duodenal del intestino es el lugar donde las enzimas pancreáticas son liberadas. Lo cual concuerda con los resultados obtenidos en diferentes estudios en los que se han comparado peces herbívoros, omnívoros y carnívoros, y cuyos resultados mencionan una mayor actividad de la tripsina en la región proximal del intestino (Hofer and Schiemer 1981; Bitterlich 1985; Chakrabarti *et al.* 1995; Einarsson *et al.* 1996.) La mayor actividad de la tripsina en el IP puede intensificar la hidrólisis de las proteínas para la absorción de aminoácidos, en particular para los omnívoros y herbívoros que se alimentan de una dieta baja en proteínas y nitrógeno (Hofer y Schiemer 1981; Bitterlich 1985). Estas diferencias entre el IP e ID son aún más evidentes cuando se observan los valores de la EE que se muestran en la Tabla 2, los cuales se calcularon tomando en cuenta el tiempo disponible para la hidrólisis durante la permanencia de los alimentos en una porción del intestino y la actividad promedio de la enzima durante dicho tiempo. En el presente estudio, la combinación entre una mayor actividad de ambas proteasas y un mayor tiempo de permanencia en el IP dieron como resultado valores claramente más alto de EE para esta sección intestinal. En este sentido, una EE similar puede ser alcanzada con una alta producción de enzimas combinada con un corto tiempo de permanencia de los alimentos en el intestino o con una actividad enzimática baja y un tiempo más largo de la permanencia de los alimentos en el intestino. El cálculo de la EE puede ser más precisa al comparar la función digestiva entre diferentes

especies de peces como ha sido evaluado por Chan *et al.* (2004). Estos autores encontraron que algunos peces herbívoros presentaron actividades de tripsina similares o superiores a las especies carnívoras, posiblemente para maximizar la eficiencia de las proteínas digestivas para compensar su dieta con una baja constitución proteica. Por otra parte, el largo tracto digestivo que poseen los herbívoros se traduce en un incremento en el tiempo de digestión o en una mayor superficie de absorción, esto para incrementar la eficiencia digestiva.

La actividad relativa de las principales proteasas alcalinas digestivas, como la tripsina y la quimotripsina, se han propuesto como un indicador del estado nutricional de los peces. Por lo tanto, una alta actividad tripsina: quimotripsina se ha correlacionado con la presencia de una dieta con una adecuada constitución proteica, mientras que un valor bajo se correlaciona con el factor hambre o la escasez de alimento (Hjelmeland *et al.* 1983; Pedersen *et al.* 1987; Ueberschar 1995; Blier *et al.* 2002). Sin embargo, los peces de *O. niloticus* del presente experimento a los cuales se les proporcionó una buena alimentación mostraron el doble de actividad de la quimotripsina en comparación con el presentado por la tripsina. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que todos los estudios antes mencionados se llevaron a cabo sobre las especies carnívoras (principalmente salmónidos), que se caracteriza por un patrón de alimentación muy diferente que la presentada por especies herbívoras, como el *O. niloticus*. Esto último, puede ser una estrategia fisiológica vinculada con la presencia continua de alimentos en el intestino, una mayor producción de enzimas y la excreción continua como consecuencia de la reducción del tiempo en el paso por el intestino. Por lo tanto, al no presentarse picos claros en la actividad de la tripsina puede darse una alta relación tripsina: quimotripsina, donde una importante producción de la quimotripsina puede actuar como la base para la hidrólisis proteica. Por lo tanto, al no presentarse picos claros de tripsina en la relación tripsina:quimotripsina una importante producción de la quimotripsina debe mantenerse para actuar como base para la hidrólisis proteica.

Digestibilidad *in vitro* de fuentes alternativas de proteínas en los piensos para peces.

El gran reto actual de la alimentación en especies acuáticas es encontrar un compromiso óptimo entre dos aspectos esenciales: 1) 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, 2) Mejorar el rendimiento económico, mediante el desarrollo de los alimentos óptimos desde una perspectiva tecnológica, considerando tanto el valor nutritivo como el costo, la disponibilidad y facilidad del procesamiento de las diferentes materias primas. La proteína es el ingrediente dietario más importante en la fabricación de alimentos para peces, siendo la harina de pescado la principal fuente proteica utilizada en mayor proporción (Córdova-Murueta 2002; New and Wijkström, 2002); por lo tanto la alimentación es el rubro que más gasto genera en la producción de peces (Ng *et al.*, 2003; Meyer y Machado, 2004; Cho *et al.*, 2005). Actualmente los estudios nutricionales están dirigidos a la búsqueda de ingredientes proteicos alternativos, tanto de origen animal como vegetal, con los que se pretende sustituir la harina de pescado y por lo consiguiente reducir costo de producción de esta manera asegurar el abastecimiento de alimentos de calidad. Sin embargo, el potencial de estos ingredientes depende de la digestibilidad, composición nutricional y disponibilidad.

El verdadero valor nutritivo de las distintas fuentes proteicas depende de la biodisponibilidad de sus nutrientes y no simplemente de su composición de esta forma se obtiene una mayor eficiencia en la absorción intestinal (Cho, 1992; Cruz-Suarez, 1996). La digestibilidad es uno de parámetros utilizados para evaluar la calidad nutricional de los distintos ingredientes e insumos destinados para la alimentación acuícola (Chong *et al.* 2002; Lee, 2002; Biswas *et al.*, 2007; Tonheim *et al.*, 2007; Smith *et al.* 2007; Reis *et al.*, 2008). Los métodos empleados para la determinación de la digestibilidad se basan en estudios *in vivo* (Alpers, 1994). Sin embargo, tales ensayos son caros, se emplean mucho tiempo y se requieren de grandes instalaciones, sin asumir la variabilidad de digestibilidad que se pueden obtener por este método a causa de la densidad de peces en los tanques

(Biswas *et al.*, 2007); diferentes formas de extracción o recolección de heces (Stone *et al.* 2008); variabilidad de marcadores en los piensos (Vandenberg and De La Noue, 2001). Por lo tanto, se han desarrollado varias metodologías *in vitro* que se utilizan como alternativas a los ensayos *in vivo* (Boisen and Eggum 1991; Savoie 1994; Bassompierre *et al.* 1997). Así mismo, el empleo de estas técnicas permite realizar un estudio detallado de la evolución de la hidrólisis de la proteína durante el proceso de digestión por cuantificación de los aminoácidos y péptidos liberados (Nugent *et al.* 1983; Alarcón *et al.* 2002). En este sentido la aplicación de técnicas *in vitro* proporciona una alternativa rápida, a bajo costo de fácil ejecución y rápida disponibilidad de los resultados. (Lazo, 1998; Moyano y Savoie, 2001; Vasiluk *et al.* 2008). En los métodos *in vitro* se realiza la simulación de las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal de los organismos, donde la digestión se realiza en dos fases: 1 fase ácida (organismos con estómagos funcionales); 2 fase intestinal del proceso digestivo (etapa alcalina). Para ello se utilizan mezclas de enzimas intestinales (extractos crudos/enzimas purificadas), como son tripsina, quimotripsina y peptidasas (Dimes, 1994; Rungruangsak-Torrissen *et al.* 2002). El objetivo del presente trabajo se enfoca en evaluar diferentes fuentes proteicas de origen animal y vegetal por medio de estudios *in vitro* simulando la digestión gástrica e intestinal para el diseño de alimentos especializados durante las diferentes fases del cultivo de los peces.

Materiales y métodos

Peces

El estudio se llevó a cabo con los sistemas digestivos de tilapias (*Oreochromis niloticus*) estas fueron obtenidas en las instalaciones de la empresa VALAQUA; Valencia, España y **ciclidos nativos tenguayaca** (*Petenia splendida*) y castarrica (*Cichlasoma urophthalmus*) estos organismos se obtuvieron del Laboratorio de Acuicultura Tropical de la UJAT-DACBIOL, México.

Condiciones de cultivo de los peces

Las unidades experimentales donde se mantuvieron los peces, consistio en un sistema cerrado de 10 tanques de 100 L c/u de capacidad, con sistema de recirculación continua y temperatura constante en promedio de 32 ± 1.06 °C, el nivel de oxígeno disuelto fue de 6.40 ± 0.28 mg/L, se determino usando un oxímetro marca YSI modelo 55 (precisión de 0.1°C y 0.01 mg/L respectivamente), Se realizaron recambios de volúmenes de agua del 10%. El sistema se le suministro aireación continua mediante un blower durante todo el tiempo del ensayo.

Harinas experimentales.

En el presente estudio se evaluaron seis fuentes de proteínas (tres de origen animal y tres de origen vegetal), estas harinas se obtuvieron de empresas locales en México y evaluados en el Laboratorio de Acuicultura Tropical, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México (DACBIOL-UJAT), y se muestran en la Tabla 3

Table 3. Fuentes de proteínas evaluadas en el sistema *in vitro*.

	Harinas	Proteína (mg)
	Subproducto de pollo ¹	65
Animal	Sangre de res ¹	82
	Pescado ¹	77
	Sorgo(<i>Sorghum bicolor</i> , Moench) ²	10.11
Vegetal	Gluten de trigo (<i>Triticum aestivum</i>) ³	75
	Salvado de trigo (<i>Triticum aestivum</i>) ²	15

1. Proteínas Marinas y Agropecuarias S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, México.

2. Galmex S.A. de C.V., Villahermosa, Tabasco, México.

3. Glútenes de México S.A. de C.V. Edomex, México.

Preparacion de los extractos enzimáticos

Los extractos de las diferentes especies de peces, utilizados en los experimentos se prepararon todas de la misma manera. Los peces se mantuvieron en ayunas durante 24 horas, se sacrificaron por una sobredosis de anestesia (1 g L^{-1}) MS-222 (Tricaine methanesulfonate, Argent, Chemical Laboratories, Inc., Redmond, WA, USA) y se mantuvieron en hielo hasta que fueron procesados. Para la realización del sacrificio de los peces se cumplió con los procedimientos de manipulación indicados por el Comité para el Uso Ético de los Animales Experimentales. Se disectaron los Peces sacando los tractos digestivos (estomago e Intestino) utilizados como fuentes de enzimas, se homogenizaron con agua tipo MilliQ a una relación 1:10 (peso/volumen), se homogenizaron utilizando un disruptor de tejidos ultrasonicos (Misonix, modelo Microson Ultrasonico disruptor celular, NY) como se detalla en Moyano *et al.* (1996). Los sobrenadantes obtenidos tras la centrifugación a $16,000 \text{ g}$ durante 30 minutos a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ fueron almacenados en tubos eppendorf y se conservaron en refrigeración a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso para el análisis enzimático. La concentración de proteína soluble en los extractos se determinó por el Método de Bradford (Bradford 1976) usando albúmina bovina a razón de 1 mg mL^{-1} .

Determinacion de la actividad proteasa

La actividad de las proteasas alcalinas en los extractos se midió con el método propuesto por Walter (1984), utilizando la caseína Hammerstein (5 g L^{-1}) como sustrato, en 50 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 9.0. Las mezclas se incubaron durante 60 min. a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, la reacción se detuvo mediante la adición de 0.5 mL tricloroacético (TCA) (120 g L^{-1}), y la absorbancia de los péptidos solubles en TCA se midió a 280 nm . La actividad proteasa ácida se evaluó según el método propuesto por Anson (1938) con 0.5 g L^{-1} de hemoglobina en 0.1 mol L^{-1} glicina-HCl (pH 2.0). Una unidad de actividad enzimática se definió como $1 \text{ } \mu\text{g}$ de tirosina liberada por minuto, utilizando el coeficiente de extinción de la tirosina ($0.005 \text{ mL}/\mu\text{g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Todas las mediciones se realizaron por triplicado. La concentración de proteína soluble

en extractos de larvas y de la proteína se determinó según Bradford (1976), utilizando un procedimiento estándar de microensayo.

Condiciones generales del sistema *in vitro*

La hidrólisis de las proteínas en todos los experimentos se determinó utilizando una célula o bioreactor de digestión descrita por Hamda (2009). La célula o bioreactor de digestión está conformado por una cámara de reacción interna que contiene la mezcla deseada de sustrato y extractos enzimáticos, separado de una cámara exterior por una membrana semi-permeable (SpectraPor 6, Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA. permite pasar partículas con un peso molecular de 1000). El extracto de la enzima y el sustrato se mezclan y se mantienen en agitación continua mediante un agitador magnético a una temperatura constante de 37 °C por medio de un baño termico.

La fase ácida se simuló agregando una determinada cantidad de sustrato deseado (500 kg⁻¹ g de proteína cruda) en HCl 1 mol L⁻¹ a pH 2.0 seguido por la adición del extracto crudo de estómago (1500 U ml⁻¹), y se incubó durante 30 min. Después de este tiempo, el pH se elevó a 9.0 por adición de 1 mol L⁻¹ NaOH y la mezcla se transfirió a la celda de la digestión, para la realización de la fase alcalina se añadió proteasa apartir de los extracto del intestino (2500 U ml⁻¹), la reacción se mantuvo durante un periodo de 180 minutos. Los productos de la digestión fueron recolectados y retirados a los distintos puntos de muestreo (0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos) se establecieron durante este tiempo para medir la liberación de la hidrólisis mediante la circulación del buffer borato 0,1 mol L⁻¹ a pH 9. La concentración total de aminoácidos en las muestras se determinó utilizando el método o-ftaldehído según lo detallado por la Iglesia *et al.*, (1983) se midió por fluorescencia (Fluoroskan, Thermolab, Finlandia). Los resultados fueron expresados como la cantidad total de los aminoácidos liberados en cada punto de muestreo o de los valores acumulados de los aminoácidos liberados hasta el momento de la toma de muestras. Todos los ensayos se realizaron por triplicado

Analisis estadísticos

Los resultados de los diferentes ensayos se han presentado siempre en dos formas diferentes. Por un lado, la cantidad total de los aminoácidos liberados durante los intervalos de tiempo de muestreo se trazó con el fin de representar las variaciones en su producción a lo largo del tiempo. Por otro lado, los valores acumulados fueron graficados contra el tiempo para calcular la tasa de producción de aminoácidos. Los valores fueron ajustados a las líneas rectas fueron evaluados mediante análisis de ANOVA. Los datos fueron sometidos a la prueba de Kruskal-Wallis (prueba independiente del grupo de comparación) (Zar, 1996). Todos los análisis se realizaron con Statistica V.7 y un valor de significación de 0.05

Resultados

La hidrólisis de las diferentes harinas por el extracto enzimático de los peces se detalla en la Figura 3 y Tabla 4. Donde se pudo comprobar la existencia de diferencias significativas en la cantidad de aminoácidos liberados al final de la hidrólisis.

En el caso de la hidrólisis con extracto enzimático de tilapia se observó claramente que la harina de pescado presente una hidrólisis mucho mayor que el resto de las harinas 39.5 ± 0.1 mg de aminoácidos liberados. Así mismo, cabe señalar que la digestibilidad de la proteína que se obtuvo con el extracto enzimático de las tilapias sobre la harina de pescado fue de 79.02 ± 0.19 , en el cual requiere de 1.99 h para realizar la hidrólisis del 50% de la proteína en la muestra (500 kg^{-1} g de proteína cruda), aun que se pudieron distinguir un grupo que no presenta diferencias significativas con la harina de pescado y exhiben un rango de hidrólisis que fluctúa de 28.3 ± 0.6 a 11.8 ± 0.7 (harina de sub-producto de pollo, sangre de res, sorgo, salvado de trigo y caseína) en su caso la harina que presentó el menor grado de hidrólisis de proteína durante el periodo de 180 min fue la harina de gluten de trigo manifestando un promedio de 8.8 ± 0.6 y una digestibilidad de 17.58 ± 1.12 .

En el caso del extracto enzimático de tenguayaca, la harina que presento mayor hidrólisis fue el gluten de trigo con 31.5 ± 0.7 , y una digestibilidad de la proteína de 63.08 ± 1.34 , mostrando diferencias significativa a la harina de salvado de trigo y sub-producto de pollo (23.3 ± 2.0 , 23.6 ± 1.3) respectivamente.

Lo que corresponde a la liberación de aminoácidos con extracto enzimático de castarrica no muestra diferencias significativas entre ninguna de las harinas.

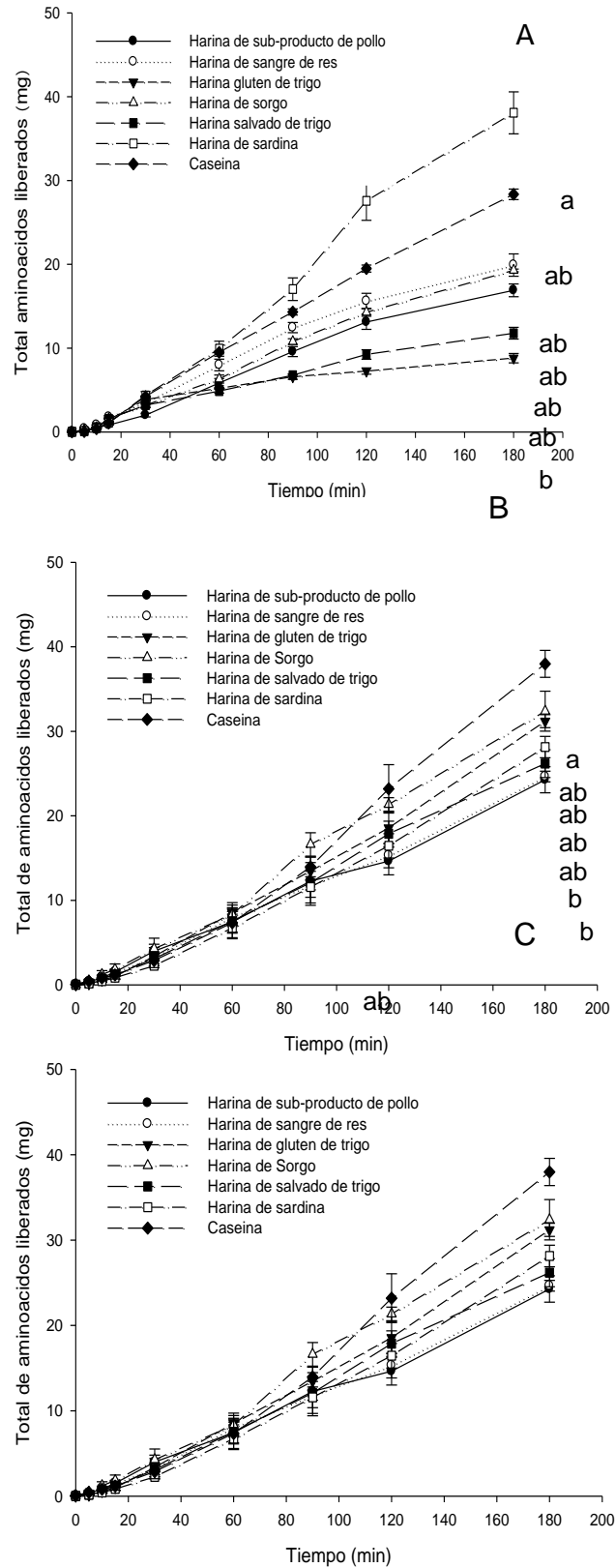


Figura. 3. Curvas de hidrólisis de protein con extracto de tilapia (A), con extracto de tenguyaca (B) y con extracto de castarrica (C).

Uscanga-Martínez, A. *et al.* 2011. Aplicaciones a la mejora de la utilización nutritiva del alimento en cíclidos cultivados en México. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuicola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuicola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 46-104.

Tabla 4. Ecuaciones de ajuste de la evolución en la liberación de aminoácidos para los diferentes piensos. Las ecuaciones se utilizaron para calcular las cantidades liberadas necesario para hidrolizar la mitad de la proteína presente en la muestra.

Harinas	Total amino			Linea de ajuste ^a	Tiempo para la realización del 50% de hidrolisis (h)
	ácidos	Amino ácidos			
	liberados	liberados (g	Digestibilidad de		
	durante 180	kg ⁻¹	la		
	min	proteína	proteína		
(mg)	inicial)	(%)			
<i>Oreochromis niloticus</i>					
Subproducto pollo	16.9 ± 0.8	1.97 ± 0.09	33.79 ± 1.52	y = 0.1021x - 0.3179	4.15
Sangre de res	19.9 ± 1.3	2.32 ± 0.16	39.83 ± 2.67	y = 0.1186x + 0.2308	3.48
Sardina	39.5 ± 0.1	4.60 ± 0.29	79.02 ± 0.19	y = 0.2222x - 1.6342	1.99
Sorgo	19.3 ± 0.2	2.25 ± 0.02	38.54 ± 0.33	y = 0.1126x - 0.1427	2.93
Gluten de trigo	8.8 ± 0.6	1.03 ± 0.07	17.58 ± 1.12	y = 0.0513x + 0.8437	7.84
Salvado de trigo	11.8 ± 0.7	1.37 ± 0.08	23.53 ± 1.39	y = 0.0683x + 0.3678	6.03
Caseína	28.3 ± 0.6	3.31 ± 0.07	56.70 ± 1.27	y = 0.1641x - 0.6974	2.61
<i>Petenia splendida</i>					
Subproducto pollo	23.6 ± 1.3	2.74 ± 0.15	47.11 ± 2.60	y = 0.1227x - 0.6803	3.48
Sangre de res	25.1 ± 0.4	2.91 ± 0.04	49.96 ± 0.71	y = 0.1351x - 0.9354	3.19
Sardina	28.7 ± 1.1	3.34 ± 0.13	57.41 ± 2.15	y = 0.1501x - 1.2741	2.91
Sorgo	29.6 ± 1.1	3.45 ± 0.13	59.16 ± 2.21	y = 0.1739x - 0.6193	2.45
Gluten de trigo	31.5 ± 0.7	3.68 ± 0.08	63.08 ± 1.34	y = 0.1663x - 1.0826	2.61
Salvado de trigo	23.3 ± 2.0	2.71 ± 0.23	46.58 ± 4.01	y = 0.1421x - 0.6697	3.01
Caseína	39.2 ± 0.7	4.57 ± 0.09	78.49 ± 1.49	y = 0.2265x - 2.6535	2.03
<i>Cichlasoma urophthalmus</i>					
Subproducto pollo	31.1 ± 3.2	3.63 ± 0.37	62.24 ± 6.41	y = 0.1758x - 1.3334	2.49
Sangre de res	30.9 ± 3.6	3.60 ± 0.42	61.82 ± 7.15	y = 0.1628x - 0.4046	2.60
Sardina	30.9 ± 1.7	3.60 ± 0.19	61.81 ± 3.32	y = 0.1703x - 0.7333	2.61
Sorgo	33.3 ± 2.3	3.88 ± 0.27	66.56 ± 4.56	y = 0.1774x - 0.2156	2.36
Gluten de trigo	24.7 ± 0.2	2.88 ± 0.02	49.48 ± 0.39	y = 0.1581x - 0.3739	3.11
Salvado de trigo	33.4 ± 0.1	3.34 ± 0.18	57.36 ± 3.15	y = 0.1504x - 1.1678	2.89
Caseína	33.6 ± 3.4	3.61 ± 2.28	67.16 ± 6.78	y = 0.1934x - 1.8625	2.31

Uscanga-Martínez, A. *et al.* 2011. Aplicaciones a la mejora de la utilización nutritiva del alimento en cíclidos cultivados en México. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuicola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuicola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 46-104.

Discusión

Las técnicas de digestibilidad *in vitro* pueden ser aplicadas no sólo para obtener información sobre la capacidad de cada especie para degradar diferentes tipos de proteína, sino también para realizar un seguimiento detallado de la hidrólisis de las distintas fracciones proteicas durante el proceso de digestión (Dimes *et al.* 1994; Oña *et al.* 2003), lo que permite generar conocimientos sobre la capacidad digestiva de los organismos, y crear formulaciones de alta digestión y asimilación, y optimizar los costos que ocasiona la adquisición de alimento durante la producción en el cultivo intensivo (Tacon 1993). Este último aspecto ha sido desarrollado por numerosos investigadores que han trabajado en sistemas *in vitro* con el objeto de simular la digestión de la proteína en diferentes animales terrestres (Savoie 1994) y acuáticos (Alarcon *et al.* 2002, Rungruangsak-Torrissen y Alarcon *et al.* 2001). No obstante, la mayoría de los estudios realizados en especies provistas de estómago evalúan la degradación de la proteína del alimento sin considerar el papel que tiene la etapa de digestión estomacal sobre la hidrólisis final de la proteína. En este sentido, algunos autores han comprobado la presencia de elevados niveles de actividad proteasa ácida en el estómago que llega incluso a representar hasta 10 veces la actividad alcalina determinada en el tramo intestinal (Alarcon *et al.* 1998 y Oña *et al.* 2003). Este hecho justifica la inclusión de una etapa ácida de digestión en este tipo de ensayos, cuando se trata de simular la digestión de una especie que posee estómago.

En este caso el sistema empleado de la celda o bioreactor de digestión semipermeable ha demostrado su capacidad para discriminar entre harinas de diferentes calidades. En la mayor parte de las harinas se ha obtenido una mayor liberación de aminoácidos en presencia de la enzima de los peces (tilapias, tenguayaca y castarrica) que cuando esta no se añade a la mezcla de reacción, es decir, que ha resultado evidente el efecto de la acción enzimática sobre las harinas en el ensayo. Sin embargo, cabe señalar que los extractos enzimáticos no realizaron el mismo efecto de hidrólisis en todas las harinas analizadas. Esto supone que el paquete enzimático que poseen los peces no es compatible con todas las proteínas, al describir que se utilizaron fuentes de proteínas de diferentes orígenes

(animales y vegetales) esto muestra como la naturaleza de las proteínas como pueden reducir de forma notable su capacidad de digestibilidad en los peces. Los valores de hidrólisis de la caseína están por arriba a los obtenidos para las otras materias primas. Este resultado es lógico dado que la caseína se utiliza como proteína estándar en los estudios de caracterización de proteasas intestinales (Oña *et al.* 2003). Cuando se consideró cada materia prima por separado, se pudo comprobar que los valores de hidrólisis mayores se obtuvieron para la harina de pescado, gluten de trigo, salvado de trigo y sorgo. La harina de pescado mostró un valor de autohidrólisis relativamente elevado en comparación con el resto de ingredientes, este fenómeno puede deberse a la solubilización progresiva de las proteínas de esta harina durante el ensayo de pH-stat en ausencia de proteasas estomacales, modificándose de este modo el pH de la reacción que es contrarrestado con la adición de HCl. Es conocido que durante el proceso de obtención de harinas de pescado, las materias primas sufren elevadas temperaturas que desnaturalizan a las proteínas y disminuyen su solubilidad. Precisamente, uno de los efectos de la fase ácida de la digestión es solubilizar a las proteínas precipitadas. Este comportamiento se ve reflejado de manera similar a lo reportado previamente en pruebas con especies como la dorada *Sparus aurata*, el pez disco *Symphysodum aequifasciata*, la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, el híbrido de *Dentex x Pagrus*, y el róbalo blanco *Centropomus undecimalis* (Alarcón *et al.* 2002; Chong *et al.* 2002; Álvarez-González 2003).

Por otra lado, cabe destacar que el comportamiento de digestibilidad de las diferentes fuentes de proteínas se relaciona con sus hábitos alimenticios de las respectivas especies en estudio, en el caso de la tenguaya se observó que las mayores digestibilidades se dieron en harinas de fuente animal a excepción del gluten de trigo, esto se debe a que es una especie carnívora como lo describen Resendez y Salvadores (1983), Caro *et al.* (1994), Santiago *et al.* (1997) y Valtierra (2000) donde establecen que la tenguayaca en su ambiente natural es un pez esencialmente ictiófago y en menor proporción herbívoro, y que en estadio juvenil son principalmente carnívoros. Chávez *et al.* (1989), mencionan que los hábitos alimenticios de las castarricas son omnívoros con tendencia carnívora pero que utiliza igualmente los recursos más abundantes del medio donde se encuentra y se comporta como

oportunista. Por que se explica que esta especie permite la formulación de alimentos con ingredientes tantos de origen animal como vegetal; en tilapias al ser un organismo herbívoro no posee un estomago definido y por ende la posibilidad de una hidrólisis proteica ácida es casi nula. Para compensarlo el intestino es mucho más largo, con una gran presencia de proteasas alcalinas y amilasas, con los que ayuda a la digestibilidad del alimento suministrado. Es importante señalar que los bajos valores de digestibilidad para los ingredientes proteínicos de origen vegetal se asocian a factores antinutricionales presentes en este tipo de ingredientes (inhibidores de tripsina) y que ocasiona inhibición del crecimiento al usarlo en cantidades superiores al 50% en dietas acuícolas (Moyano *et al.* 1998; Alarcón *et al.* 2001, 2002). Chong *et al.* (2002), reportan que al usar harina de soya y la harina de trigo en dietas para *S. aequifasciata* disminuyó la digestibilidad de las dietas, a pesar del alto contenido proteínico de los ingredientes, lo que se asocia a su contenido de inhibidores de tripsina y quimotripsina. Oña *et al.* (2005), reportan que el efecto de los inhibidores presentes en las harinas vegetales, sobre las proteasas digestivas fue mayor con respecto a la capacidad de digestibilidad para *D. dentex* y *P. pagrus*, donde la harina de soya afectó principalmente a las enzimas alcalinas al obtener valores bajos a pesar de que pueden tener un alto contenido de proteína, puede ser peligroso especialmente en peces con hábitos carnívoros, por lo cual deben de evaluarse no solo *in vitro*, sino también *in vivo* para asegurar su asimilación y efecto en el crecimiento de los peces.

Efecto de harinas de origen vegetal como inhibidores de proteasas en ciclidos

La acuicultura sigue creciendo más rápidamente que cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal, mientras que los volúmenes de captura por pesca dejaron de crecer; en este sentido la FAO 2009 estima que el 77% (110 millones de toneladas) se destinan al consumo humano y el 23% (33 millones de toneladas), se destinaron a la elaboración de harina y aceite de pescado; Por lo tanto la harina de pescado por ser la principal fuente de proteína empleada para la fabricación de piensos para peces (El-sayed 1990; El-Sayed and Tshima 1991); y aunado a la disminucion de este producto junto con la demanda creciente ha causado incrementos en los precios, en este caso la alternativa más

importante es el empleo de fuentes proteicas vegetales, que ofrecen un gran potencial para el avance de la producción acuícola. Sin embargo uno de los problemas que conlleva la utilización de estas harinas es el bajo contenido de proteína y ácidos grasos esenciales (Francis *et al.*, 2001). La otra limitación principal es la existencia de los factores antinutritivos que reducen la actividad y la cantidad de las enzimas proteolíticas y por lo tanto el crecimiento y la eficiencia de la alimentación reduciendo, por lo consiguiente la digestibilidad en los peces (Huisman & Tolman 1992; Moyano *et al.*, 1999; Sveier, *et al.*, 2001; Maitra & Ray 2003). En este caso para poder incluir las proteínas de las fuentes vegetales en la fabricación de los piensos se requieren de procesos tecnológicos como tratamiento termal con el fin de inactivar o reducir el efecto de los antinutrientes. (Alarcón *et al.*, 1999).

Hasta la fecha pocos estudios se han centrado en una evaluación de tallada sobre los efectos de los inhibidores de proteasas digestivas en ciclidos nativos, sin embargo Moyano *et al.*, (1999) y El-sayed *et al.*, (2000) han descrito que la tilapia *O. niloticus* presentan una respuesta de inhibición de proteasas al evaluar diferentes fuentes proteicas vegetales (salvado de trigo, gluten de maíz y soya). A condición de que las proteasas de los peces son altamente sensibles a los inhibidores es importante considerar que estas pueden diferir considerablemente por la diferencia de especies y hábitos alimenticios de estos. (Kroghahl & Holm 1983; Tacon 1997; Krogdahl *et al.*, 1994). El objetivo del presente estudio es evaluar el efecto de inhibidores de proteasas en diferentes fuentes proteicas de origen vegetal (Harina de soya, trigo, sorgo y salvado de trigo) sobre la actividad de las proteasas digestivas de *C. uruptalmus* y *O. niloticus*, las razones de evaluar estas harinas se debe a que son ampliamente utilizadas en la fabricación de piensos y la disponibilidad con la que se encuentran en la zona y de esta forma tener en cuenta las implicaciones que se pueden tener en formulaciones futuras para las especies en estudio.

Materiales y metodos

Organismos

Los ensayos se llevaron a cabo con digestivos liofilizados de *C. urophthalmus* y *O. niloticus* provenientes del Laboratorio de Acuicultura de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT-DACBIOL), Los peces fueron alimentados con pienso comercial de la marca Pedregal Silver Cup (45 % de proteína y 16 % de lípidos).

Preparacion de los extractos enzimáticos

Los peces se mantuvieron en ayuno por 24 hrs; fueron sacrificados por sobredosis del anestésico MS 222. Se disectaron los tractos digestivos completos, separando a continuación estomago e intestino realizando posteriormente un pool, se homogenizaron con agua milliq (1:10 peso/volumen) se utilizo un homogenizador de tejido marca Misonix (modelo Microson Ultrasonic Cell Disruptor, NY). Las muestras se centrifugaron a 16,000 g durante 30 min. a 4 °C, el sobrenadante se almaceno en tubos eppendorf y se conservaron en refrigeración a -20 °C. La determinación de la proteína soluble se realizó según el método propuesto por Bradford (1976).

Preparacion de los extractos de las harinas

Las harinas usadas en este estudio fueron obtenidas de (UJAT-DACBIOL), y del Departamento de biología aplicada, de la Universidad de Almería, donde fueron evaluadas las siguientes harinas: soja (*Glycine max*), sorgo (*Sorghum vulgare*), trigo (*Triticum aestivum*), y salvado de trigo. Los extractos de los inhibidores fueron obtenidos de acuerdo a García-Carreño *et al.* (1997). Las harinas fueron homogenizadas en agua milliq (100 mg/mL⁻¹) y posteriormente fueron encubadas durante un periodo de 180 minutos a 25 °C, el extracto obtenido se centrifugo a 16,000 g durante un periodo 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se conservo en tubos eppendorf a -20 °C.

Ensayo de la actividad proteasa

La actividad de las proteasas alcalinas se evaluó de acuerdo al método propuesto por Walter (1984), se agregaron 20 µl de extracto enzimático, 0.5 ml de caseína Hammerstein al 1%, tampón Tris-HCl 50 mM a pH 9.0, la mezcla se incubó durante 60 min. a una temperatura de 37 °C, la reacción se detuvo agregando 0.5 ml de TCA al 20%. Posteriormente se mantuvo la mezcla de reacción durante 10 min en refrigeración a 4 °C, se centrifugó a 16 000 g durante 30 min a 4 °C. La absorbencia de los péptidos solubles liberados por el TCA se midió a 280 nm en un espectrofotómetro UV/visible. Una unidad de actividad enzimática se definió como 1 µg de tirosina liberado en 1 min, usando el coeficiente de extinción molar de la tirosina ($0.005 \text{ ml}/\mu\text{g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), todas las medidas se hicieron por triplicado.

Inhibición de la actividad proteasas con los extractos de las harinas

El efecto inhibitor de las harinas fue evaluado midiendo la reducción de la actividad proteasa alcalina de acuerdo a lo propuesto por Garcia-carreño (1996). El ensayo consistió en agregar 20 µl del extracto de las harinas y 20 µl del extracto enzimático. Una segunda sección de tubos se utilizó únicamente como control de la actividad donde se incubó solamente con agua destilada, se agregó 0.5 ml de buffer (50 mM TRIS·HCl, pH 9.0) estas relaciones fueron incubadas durante 60 min. a 25 °C, la actividad residual de la proteasa fue evaluada usando 0.5 ml de caseína Hammerstein al 1% y incubando nuevamente durante 30 min. a 37 °C, la reacción se detuvo agregando 0.5 ml de TCA al 20%, posteriormente la mezcla de reacción se mantuvo durante 10 min en refrigeración a 4 °C, se centrifugó a 16 000 g durante 30 min a 4 °C. Cada sección de tubos contó con su respectivo control en el cual se les agregó 0.5 ml de TCA antes de agregar la caseína, de esta manera la absorbancia obtenida en los blancos fueron restados de los tratamientos, todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

El efecto de la inhibición de la proteasa fue determinada con respecto a la reducción de la actividad proteasa en relación con el de los controles el cual se expresa en porcentajes de

inhibición. Para observar la inhibición se utilizaron cantidades crecientes de extracto de harina vegetal (0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8 y 3.2 mg/ml). Los extractos de la enzima fueron ajustados para proporcionar 38 U.

La detección de los efectos de los inhibidores de las enzimas utilizando sustrato-SDS-PAGE

Se realizaron electroforesis de proteínas SDS-PAGE de las preparaciones enzimáticas de acuerdo a Laemmli (1970), usando geles de 8 x 10 x 0.075 cm y 12% de acrilamida. La preparación de las muestras y los zimogramas de las actividades proteasa de las distintas fracciones separadas por electroforesis se llevaron a cabo según García-Carreño y Cols. (1993). Previamente, las muestras fueron filtradas a través de una columna Sephadex G-25S (1/10, v/v). Se tomo 4.5 µl de los extractos enzimáticos (contenían 38 U), eran mezclado con 4.5 µl del extracto de las harinas, la mezcla fue encubada durante 60 min. a temperatura ambiente, para los controles fueron hechos usando 4.5 µl de agua destilada sustituyéndola por los extractos de las harinas. Las electroforesis se llevaron a cabo a voltaje constante de 100 V por gel durante 60 min a 5 °C. Posteriormente, los geles fueron lavados e incubados en caseína Hammerstein al 0,5%, pH 9, durante 30 min a 5 °C y después se transfirieron a la misma solución durante 90 min a 37 °C sin agitación. A continuación, fueron lavados y fijados con TCA al 12% previamente a su tinción con azul Coomassie (BBC R-250) al 0,1% en una solución metanol-ácido acético-agua (50:20:50). El desteñido se llevó a cabo en una solución metanol-ácido acético-agua (35:10:50).

Resultados

Las actividades proteolíticas totales y la proteína soluble que se determinaron en los extractos de los peces se muestran en la Tabla 5. Donde las medias de las actividades de las proteasas alcalinas muestran que la *C. uruptalmus* tienen mayor actividad enzimática con respecto a las otras especies en estudio, caso similar se determino en la proteína soluble. Estos resultados proporcionaron la base para el diseño de los experimentos de

inhibición, permitiendo preparar las mezclas de la incubación conteniendo las mismas unidades de actividad enzimática.

Tabla 5. Actividad de las proteasa alcalinas y proteína soluble de los extractos intestinales de la *Cichlasoma uruptalmus* y *Oreochromis niloticus*. (Valores promedio \pm desviación estándar).

Especie	Actividad proteasa	Proteína soluble
	U mg proteína ⁻¹	mg ml ⁻¹
<i>Cichlasoma uruptalmus</i>	2348 \pm 25.7	6.96 \pm 2.08
<i>Oreochromis niloticus</i>	813 \pm 6.54	5.71 \pm 1.33

Las curvas de inhibiciones con concentraciones crecientes de las harinas se muestran en figura 4. En el caso de la harina sorgo, se manifiesta que las especies presentan respuestas claras de inhibición de las proteasas desde concentraciones bajas del extracto vegetal, llegando a afectar la actividad enzimática de ambas especies conforme aumenta la concentración del extracto vegetal. Sin embargo, la inhibición de la actividad enzimática por acción del salvado de trigo muestra que la tilapia solamente inhibe la mitad de la actividad enzimática con respecto a la harina de sorgo, caso contrario sucede con las proteasas de la castarrica que muestra una mayor sensibilidad a los inhibidores presentes en esta harina. Los datos mostrados con la harina de soja demuestran la alta presencia de factores antinutritivos y lo sensible que suelen ser las proteasas a la presencia de estos. Para las tilapias las proteasas alcalinas se ven inhibidas en gran porcentaje en concentraciones muy bajas del extracto de esta harina de soja, llegando a ser muy similar para las proteasas de la castarrica, aun que no se llega a una inhibición al 100% en gran medida se aumente la concentración de las harinas se lograr obtener una total inhibición de las proteasas.

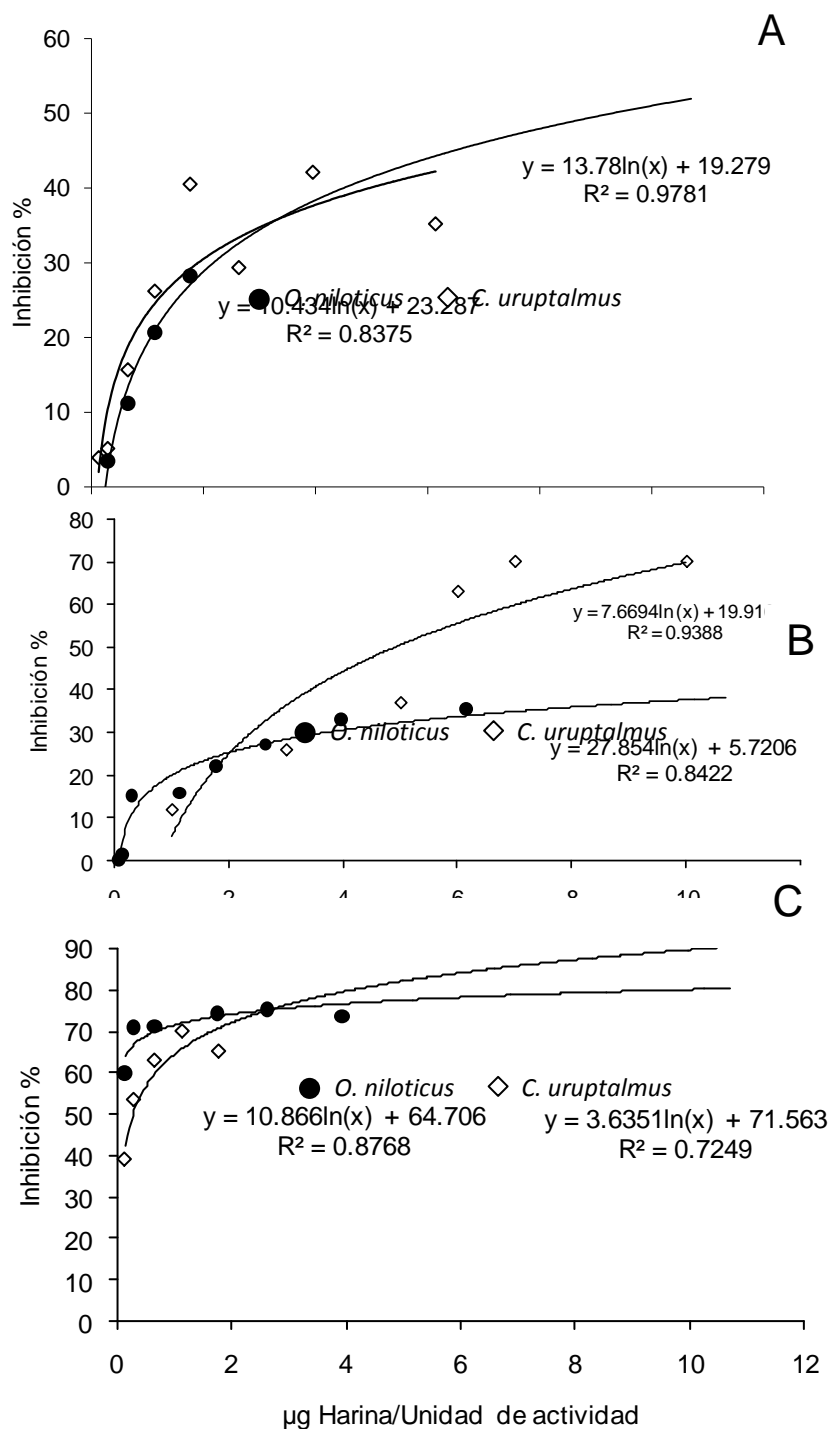


Figura 4. Curva de inhibición de la actividad proteasa alcalina obtenido después de 1 hora de incubación con extractos enzimáticos de los diferentes peces frente a incrementos de concentración de harina de sorgo (A), harina de salvado de trigo (B) y harina de soja (C)

Uscanga-Martínez, A. *et al.* 2011. Aplicaciones a la mejora de la utilización nutritiva del alimento en cíclidos cultivados en México. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 46-104.

Discusión

En el presente trabajo se pudo observar que si hubo un efecto inhibidor de las tres materias primas vegetales (harina de sorgo, salvado de trigo y soya) sobre la actividad de los extractos enzimáticos de los peces (*O. niloticus* y *C. uruptalmus*), cabe corroborar que existen numerosos trabajos que describen la presencia de factores antinutritivos en semillas de plantas y que afectan a la fisiología digestiva de los peces (Tacon y Jackson 1985, Krogdahl 1986, Tacon 1997). De estas sustancias las más relevantes son los inhibidores de proteasas, de origen proteico, que tienen la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de las enzimas del tracto gastrointestinal de los animales. Sin embargo, El efecto negativo de la utilización de inhibidores de proteasa en las dietas de crecimiento de los peces debe estar relacionada con diversos factores, tales como: el tipo de comida, el nivel de las harinas utilizado en la dieta, tiempo de alimentación con estas harinas; y la sensibilidad de una especie dada a los compuestos antinutricionales.

El extracto de la harina de soya fue la que presento una mayor actividad inhibidora en las proteasas de los peces en ambas especies, y lo que respecta al salvado de trigo fue la que presento menos inhibición; esto corresponde a que muchos estudios han determinado los antinutrientes son especialmente abundante en las semillas de leguminosas, pero también en cereales y productos derivados (Liener 1980), son en particular fuentes ricas en inhibidores de proteasas en los digestivo de los peces, este tipo de inhibidores tienden a acumularse en las estructuras de almacenamiento tales como tubérculos, frutas y las semillas de las plantas (Gildberg and Raa 1983). Es evidente que ni todos los inhibidores de la proteasa existente en la planta de alimentos son similares, ni se presentan en las mismas cantidades. Estos compuestos han sido identificados en una gran diversidad de especies vegetales (Liener 1980)

Aunque se han diseñado procesos tecnológicos específicos para asegurar la eliminación de inhibidores (tratamiento térmico de la soya para eliminar el inhibidor de la tripsina), los resultados no siempre han sido satisfactorios, y las dietas suministradas a los peces pueden

contener cantidades considerables de inhibidores de proteasas (Mitchell *et al.* 1993). En el caso de las semillas de leguminosa, como la soya, esto se puede explicar por la existencia de dos tipos de inhibidores: inhibidor tipo Kunitz, con una masa molecular entre 20.000-25.000, lábil al calor debido a la baja cantidad de puentes disulfuro y con unión específica a la tripsina, y el inhibidor tipo Bowman-Birk con una masa molecular de 6.000-10.000, más termoestable debido a la gran cantidad de puentes disulfuro, siendo capaz de inactivar a la tripsina y quimotripsina (Díaz y Alarcon 1998, Soottawat *et al.* 1999). Sin embargo, muchos de los extractos de semillas de leguminosas que se cultivan en México son inhibidores de tripsinas (García-Carreño *et al.* 1996).

Referencias bibliográficas

- Adler-Nissen, J. 1976. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J. Agric. Food Chem.*, 24: 1090-1093.
- Alarcón, F.J. 1997. Procesos digestivos en peces marinos: Caracterización y aplicaciones prácticas. Tesis de Doctorado, Universidad de Almería, España. 187 pp.
- Alarcón, F.J., M. Díaz, F.J. Moyano y E. Abellán. 1998. Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiol Biochem.* 19:257-267.
- Alarcón, F.J., Moyano, F.J. and Díaz, M. 1999. Effect of inhibitors present in protein sources on digestive proteases of juvenile sea bream (*Sparus aurata*). *Aquatic Living Res.* 12(4): 233-238.
- Alarcón FJ, Moyano FJ, Díaz M. 2001. Use of SDS-page in the assessment of protein hydrolysis by digestive enzymes. *Aquaculture International* 9:255-267.
- Alarcón JF, Moyano FJ, Díaz M. 2002. Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH-Stat system. *Journal Science of Food and Agriculture* 82:697-704
- Alpers, D.H. 1996. Digestion and absorption of carbohydrates and proteins. En: Johnson L.R. (ed). *Physiology of Gastrointestinal Tract*. 3rd ed. New York: Raven Press, 1994:1723-1749.
- Alliot, E., A. Pastoreaud y J. Trellu. 1977. Evolution des activités enzymatiques dans le tube digestif au cours de la vie larvaire du bar (*Dicentrarchus labrax*) variations des proteinogrammes et des zymogrammes. 3rd Meeting of the ICES Working group of Mariculture, Brest, France, May 10-13, Actes de Colloques du CNEXO, 4:85-91.
- Alvarez-González, C.A., Civera-Cerecedo, R., Ortiz-Galindo, J.L., Dumas, S., Moreno-Legorreta, M., Grayeb-Del Alamo, T., 2001b. Effect of dietary protein level on growth and body composition of juvenile spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*, fed practical diets. *Aquaculture* 194, 151-159.
- Andersen, N.G. (1998). The effect of meal size on gastric evacuation in whiting. *J Fish Biol* 52:743-755.
- Andersen, N.G. (1999). The effects of predator size, temperature, and prey characteristics on gastric evacuation in whiting. *J Fish Biol* 54:287-301.
- Andersen, N.G. (2001). A gastric evacuation model for three predatory gadoids and implications of using pooled field data of stomach contents to estimate food rations. *J Fish Biol* 59:1198-1217.
- Andersen, N.G. & Beyer, J.E. (2005). Mechanistic modelling of gastric evacuation in predatory gadoids applying the square root model to describe surface-dependent evacuation. *J Fish Biol* 67:1392-1412.
- Andersen, N.G. & Beyer, J.E. (2007). How are prey fishes of multiple meals evacuated from the stomach of a piscivorous fish?. *J Fish Biol* 71:219-234.
- Anderson, T.A. (1991). Mechanisms of digestion in the marine herbivore, the luderick, *Girella tricuspidata* (Quoy & Gaimard). *J Fish Biol* 39:535-547

- Anson, M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. gen. Physiol.*, 22: 79-89.
- 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* 42:1159–67.
- Archibal, A.L. 1987. Comparison of the serum amylases of farm animals. *Biochem. Physiol.*, 88B: 963-968.
- Ásgeirsson, B. y J.B. Bjarnasson. 1991. Structural and kinetic properties of chymotrypsin from atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with bovine chymotrypsin. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99B(2): 327-335.
- Bagge, O. (1977). Meal size and digestion in cod (*Gadus morhua* L.) and sea scorpion (*Myoxocephalus scorpius* L.). *Meddelelser fra Danmarks Fiskeri-og Havundersøgelser* 7:437–446.
- Barnabé, G. y A. Guissi. 1994. Adaptations of the feeding behaviour of larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), to an alternating live-food/compound-food feeding regime. *Aquacult. Fish. Manag.* 25:573-546.
- Bassompierre, M., Børessen, T., Sandfeld, P., Rønsholdt, B., Zimmermann, W., McLean, E. 1997. An evaluation of open and close systems for *in vitro* protein digestion of fish meal. *Aquaculture Nutrition* 3,153-159.
- Behal, F.J., B. Asserson, F. Dawson y J. Hardman. 1965. *Arch. Biochem. Biophys.*, 111: 335-344.
- Bergmeyer, H.V. 1974. *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol 2. Phosphatases. Academic Press.
- Biswas, K.A., Seoka, M., Takii, K., Kumai, H. 2007. Comparison of apparent digestibility coefficient among replicates and different stocking density in red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science* 73: 19–26
- Bitterlich, G. (1985). Digestive enzyme pattern of two stomachless filter feeders, silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* Val., and bighead carp, *Aristichthys nobilis* Rich. *J Fish Biol* 27:103–112.
- Blier, P.U., Lemieux, H., Devlin, R.H. (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
- 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.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
- Bryant, P.L. y A.J. Matty. 1981. Adaptation of carp (*Cyprinus carpio*) laevae to artificial diets: 1. Optimum feeding rate and adaptation age for a commercial diet. *Aquaculture* 23:275-286.
- Cahu, C.L. y J.L. Zambonino-Infante. 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A(2): 213-222.
- Cahu, C. 1996. Nutrition des larves de poisson; 1. Développement des enzymes digestives et modifications induites par l'aliment. *Journées INRA-IFREMER, Nutrition des Poissons* 21-22 fév. Saint-Pée-sur-Nivelle.
- Cahu, C. y J.L. Zambonino-Infante. 1997. Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding?. *Aquacult. Int.* 5:151-160.

- Cahu, C., J.L. Zambonino-Infante, A.-M. Escaffre, P. Bergot y S. Kaushik. 1998. Preliminary results on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing with compound diet from first feeding. Comparison with carp (*Cyprinus carpio*) larvae. *Aquaculture* 169:1-7.
- Cahu, C., J.L. Zambonino-Infante, P. Quazuguel y M.M Le Gall. 1999. Protein hydrolyzate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture* 171:109-119.
- Cañavate, J.P. y C. Fernández-Díaz. 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture* 174:255-263.
- Canioni, P., R. Julien, J. Rathelot y L. Sarda. 1977. Pancreatic and microbial lipases: a comparison of the interaction of pancreatic colipase with lipases of various origins. *Lipids*, 12: 393-397.
- Cara, B. Moyano, F. J., Zambonino, J. L., Fauvel, C. (2007). Trypsin and chymotrypsin as indicators of nutritional status of post-weaned sea bass larvae. *J Fish Biol* 70:1798-1808.
- Caro, C., Mendosa, A., Sánchez, M., 1994. Caracterización del medio ambiente de *Petenia splendida* en lagunas del sur de Quintana Roo. En memorias del II seminario sobre peces nativos, con uso potencial en acuicultura, del 23 al 26 de mayo de 1994, Cárdenas, Tabasco, México.
- Chakrabarti, I., Gani, A., Chaki, K.K., Sur, R., Misra, K.K. (1995). Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comp Biochem Physiol* 112A:167-177.
- Chakrabarti, I., Rathore, R.M., Kumar, S. (2006). Study of digestive enzyme activities and partial characterization of digestive proteases in a freshwater teleost, *Labeo rohita*, during early ontogeny. *Aquacul Nutr* 12:35-43
- Chan, A.S., Horn, M.H., Dickson K.A., Gawlicka, A. 2004. Digestive enzyme activities in carnivores and herbivores: comparisons among four closely related prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae) from a California rocky intertidal habitat. *J Fish Biol* 65:848-858.
- Cho, S.H., Lee, S.M., Lee, J.H., 2005. Effect of dietary and lipid levels on growth and body composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L) reared under optimum salinity and temperature conditions. *Aquaculture Nutrition* 11, 235-240.
- Cho, C.Y. & Slinger, S.J. (1979) Apparent digestibility measurement in feedstuffs for rainbow trout. In: *Fish Nutrition and Fishfeed Technology* (Halver, J.E. & Tiews, K. eds), Vol. 2, pp. 239-247. Heenemann-Verlagsgesellschaft, Berlin.
- Cho, C.Y. 1992. Feeding for rainbow trout and other salmonids. With reference to current estimates of energy and protein requirements. *Aquaculture*, 100, 107-123.
- Chong, A.S.C., Hashim, 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. *Aquaculture Nutrition* 8; 229-238.
- Choubert, G., de la Nouë, J. & Luquet, P. (1982) Digestibility in fish: Improved device for the automatic collection of feces. *Aquaculture*, 29, 185-189.

- Clements, K.D., Rees, D. (1998). Preservation of inherent contractility in isolated gut segments from herbivorous and carnivorous marine fish. *J Com Physiol* 168B:61–72.
- Contreras-García, M.J., 2003. Inversión sexual de mojarra nativas *Cichlasoma salvini* y *Petenia splendida*, mediante la administración oral de esteroides sintéticos, Tesis de Licenciatura, UJAT, México, 49 pp.
- Cousin, J. C. B., F. Baudin Laurencin y J. Gabaudan. 1987. Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus* L. *J. Fish Biol.* 30: 15 33.
- Cruz Suárez, L.E. 1996. Digestión en camarón y su relación con formulación y fabricación de alimentos balanceados. 207-232 pág. En: Cruz Suárez, L. E., Ricque Marie, D., Mendoza, R. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 11 al 13 de Noviembre del 1996. Monterrey, Nuevo León, México.
- Dabrowski, K., F. Takashima, C. Strüssmann y T. Yamazaki (1986). Rearing of coregonid larvae with live and artificial diets. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 52(1):23-30.
- Daan, N. (1973). A quantitative analysis of the food intake of the North Sea cod, *Gadus morhua*. *Neth J Sea Res* 8:27–48.
- Díaz, M., F.J. Moyano, L.F. García-Carreño, F.J. Alarcón y M.C. Sarasquete. 1997. Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. *Aquaculture International* 5:461-471.
- Dimes, L.E. y N.F. Haard. 1994. Estimation of protein digestibility: I. Development of an *in vitro* method for estimating protein digestibility in salmonids. *Comp. Biochem. Physiol.* 108A(2-3): 349-362.
- Dixon, M. y E. Webb. 1979. *Enzymes*. Academic Press 3th. New York.
- Drewe, K.E., Horn, M.H., Dickson, K.A., Gawlicka, A. (2004). Insectivore to frugivore: ontogenetic changes in gut morphology and digestive enzyme activity in the characid fish *Brycon guatemalensis* from Costa Rican rain forest streams. *J Fish Biol* 64:890–902.
- Dunn, B.M. 1989. Determination of protease mechanism. In *proteolytic Enzymes: A practical approach*, (R.J. Beynon y J.S. Bond, Eds.) I.R.L. Press, Oxford, England pp. 57-81.
- Dupuis, Y., S. Tardival, Z. Poremska y P. Fournier. 1991. Effect of some alkaline phosphatase inhibitors of intestinal calcium transfer. *Int. J. Biochem.*, 23: 175-180.
- Einarsson, S., Davies, P.S., Talbot, C. (1996). The effect of feeding on the secretion of pepsin, trypsin and chymotrypsin in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Fish Physiol Biochem* 15:439–446.
- Egna S. H. 1997. *Dynamics of pond aquaculture*. Crc press. boca raton New York
- Ehrlich, K.F., Catin M-C. y M.B. Rust. 1989. Growth and survival of larvae and postlarvae smallmouth bass fed a commercially prepared dry feed and/or *Artemia* nauplii. *J. World Aquacult. Soc.* 20:1-6.
- Eid, A.E. y A.J. Matty. 1989. A simple *in vitro* method for measuring protein digestibility. *Aquaculture*, 79: 111-119.
- El-Sayed, A.M. 1990. Long-term evaluation of cotton seed meal as a protein source for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linn.). *Aquaculture* 84, 315–320.

- El-Sayed, A.-F.M. and Teshima, S. 1991. Tilapia nutrition in aquaculture. *Reviews in Aquatic Sciences* 5, 247–265
- El-Sayed, A.M., Nmartinez, I., Moyano, F.J. 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., N. Kokowsky y W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95: 271–278.
- FAO. 2009. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2008. Dep. de Pesca y Acuicultura de la FAO, Roma. 196 pp.
- Fernández-Díaz, C., E. Pascual y M. Yúfera. 1994. Feeding behaviour and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live food. *Mar. Biol.* 118:323–328.
- Fitzsimmons k. 1997. Tilapia. Proceeding from the fourth international symposium. cooperative extension. *Aquaculture* vol. 2. november 9–12
- Francis, G., Makkar, H. P. S. & Becker, K. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199: 197–227.
- Fris, M.B. & Horn, M.H. (1993). Effects of diet of different protein content on food consumption, gut retention, protein conversion, and growth of *Cebidichthys violaceus* (Girard), an herbivorous fish of temperate zone marine waters. *J Exp Mar Biol Ecol* 166:183–202.
- García-Carreño, F.L., L.E. Dimes y N.F. Haard. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.*, 214: 65–69.
- García-Carreño, F.L., Navarrete del Toro, M.A., Díaz-López, M., Hernández-Cortés, M.P. and Ezquerro, J.M. 1996. Protease inhibition of fish muscle enzymes using legume seeds extracts. *J. Food Protection* 59: 312–318.
- García-Pérez, P.M., 2003. Determinación de la temperatura preferencial y metabolismo de la rutina de la tenguayaca (*Petenia splendida* Günther, 1862). Tesis de licenciatura, UJAT, Tabasco, México. 42 pp.
- Gawlicka, A., B. Parent, M.H. Horn, N. Ross, I. Opstad y O.J. Torrinsen. 2000. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture* 184:303–314.
- Gildberg A and Raa J. 1983. Purification and characterization of pepsins from the Arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). *Comp Biochem Physiol* 75A:337–342.
- Govoni, J.J. 1980. Morphological, histological and functional aspects of alimentary canal and associated organ development in larval *Leiostomus xanthurus*. *Rev. Can. Biol.*, 39: 69–80.
- Grabner, M. 1985. An *in vitro* method for measuring protein digestibility of fish feed components. *Aquaculture*. 48: 97–110.
- Harris, H. 1989. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin. Chim. Acta*, 186: 133–150.

- Hirikado, M., K. Hirata, Y. Uemarsu, Y. Hatooka y M. Kazama. 1994. Assay for activities of α -amylase and glucoamylase used in food processing. J. Food Hyg. Soc. Japan, 35(1): 28-33.
- 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 Rapportser 3:1-17.
- Hofer, R., & Schiemer, F. (1981). Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits. Oecologia 48:342-345.
- Horn, M.H., & Gibson, R.N. (1990). Effects of temperature on the food processing of three species of seaweed-eating fishes from European coastal waters. J Fish Biol 37:237-247.
- Horn, M.H. & Messer, K.S. (1992). Fish guts a chemical reactors: a model of the alimentary canals of marine herbivorous fishes. Mar Biol 113:527-535.
- Hsu, H.W., D.L. Vavak, L.D. Satterlee y G.A. Miller. 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. J. Food Sci. 42: 1269-1273.
- Huisman J, Tolman G.H. 1992. Antinutritional factors in the plant proteins of diets for non-ruminants. In: Garnsworthy, PC., Haresign, W., Cole, D.J.A. (Eds.) Recent Advances in Animal Nutrition. Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford. 3 - 31.
- Hummel, B. C. W. 1959. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin of chymotrypsin, trypsin and thrombin. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 1393-1399.
- Hurst, T.P. (2004). Temperature and state-dependence of feeding and gastric evacuation in juvenile Pacific halibut. J Fish Biol 65:157-169.
- Igbokwe, E.C. y A.E.R. Downe. 1978. Electrophoretic and histochemical comparison of three strains of *Aedes aegypti*. Comp. Biochem. Physiol., 60B: 131-136.
- Izquierdo, M.S. 1996. Essential fatty acid requirements of culture marine fish larvae. Aquaculture Nutrition 2:183-191.
- Jiménez-Pérez, C., 2004. Efecto de la temperatura en el crecimiento de crías de la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida* Günther, 1862), (Pisces: Cichlidae). Tesis de licenciatura, UJAT, Tabasco, México. 44 pp.
- Kanazawa, A., S. Koshio y S-I Teshima. 1989. Growth and survival of larvae red sea bream *Pagrus major* and japanise flounder *Paralichthys olivaceus* fed microbound diets. J. World Aquacult. Soc. 20:31-37.
- 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. y A. Tandler, 2000. The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. Aquaculture Nutrition 6:11-15.
- Kolkovski, S., A. Arieli y A. Tandler. 1997. Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in sea bream larvae. Acuacult. Int. 5:527-536.

- Kolkovski, S., A. Tandler, G.Wm. Kissil y A. Gertler. 1993. The effect of dietary exogenous enzymes on ingestion assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*. 12(3): 203-209.
- Krogdahl, A. and 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.* 74: 403-409.
- Krogdahl, A., Lea, T.B. and Olli, J.J. 1994. Soybean protease inhibitors affect intestinal trypsin activities and amino acids digestibilities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 107: 215-219.
- Krogdahl A. 1986. Antinutrients affecting digestive functions and performance in poultry. In *Proc. 7th Eur. Poultry conf.* 24-28 Aug. Paris Wids. M. Larbier (Ed.) pp. 239-248. Poultry Sci. Ass., Branche Francaise, Paris, France.
- Klumpp, D.W. & Nichols, P.D. (1983). Nutrition of the southern sea garfish *Hyporhamphus melanochir*: gut passage rate and daily consumption of two food types and assimilation of seagrass components. *Mar Ecol Prog Ser* 12:207-216.
- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *J. Gen. Physiol.* 30: 291-310.
- Kuz'mina, V.V. (1996). Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. *Aquaculture* 148:25-37
- Jun-sheng, L., Jian-lin, L., Ting-ting, W. (2006). Ontogeny of protease, amylase and lipase in the alimentary tract of hybrid Juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*). *Fish Physiol Biochem* 32:295-303.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lauff, M. y R. Hofer. 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture*. 37: 335-346.
- Lazo, J.P., Romaine, R.P., Reigh, R.C., 1998. Evaluation of three *in vitro* enzyme assays for estimating protein digestibility in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.* 29, 441-449.
- Lee, S.M., 2002. Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for juvenile and grower rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture* 207, 79-95.
- Liener IE. Toxic Constituents of Plant Foodstuffs. Sydney: Academic Press, 1980.
- Liu, Z.Y., Wang, Z., Xu, S.Y., Xu, L.N. (2008). Partial characterization and activity distribution of proteases along the intestine of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *Aquacul Nutr* 14:31-39.
- Logothetis, E.A., Horn, M.H., Dickson, K.A. (2001). Gut morphology and function in *Atherinops affinis* (Teleostei: Atherinopsidae), a stomachless omnivore feeding on macroalgae. *J Fish Biol* 59:1298-1312.
- Luczynski, M., J. Strzeżek y P. Brzuzan. 1987. Secretion of hatching enzyme and its proteolytic activity in coregoninae (*Coregonus albula* L and *C. lavaretus* L) embryos. *Fish Physiol. Biochem.* 4:57-62.

- Lundstedt, L.M., Bibiano, M.J.F., Moraes, G. (2004). Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comp Biochem Physiol* 137B:331–339.
- Maitra, S. & Ray, A.K. (2003) Inhibition of digestive enzymes in rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), fingerlings by tannin: an *in vitro* study. *Aquaculture Research*, 34, 93–95.
- Maraux, S., D. Louvard y J. Baratti. 1973. The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochim. Biophys. Acta* 321:282-295.
- March, B.E., C. Macmillan y F.W. Ming. 1985. Techniques for evaluation of dietary protein quality for the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 47:275-292.
- Martínez, D.M.I. y Alarcón, L.F.J. 1998. Efecto de los Inhibidores presentes en materias primas vegetales sobre las proteasas alcalinas de los peces. *Aquatic*
- Martínez-Mendoza, J.L., 2004. Desarrollo embrionario larval de la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*). Tesis de licenciatura, UJAT, Tabasco, México. 71 pp.
- Martínez-Palacios, C.A. y Ross, L.G. 1986. The effects of temperatura, body weight and hypoxia on the oxygen consumption of the mexican mojarra, *Cichlasoma urophthalmus* (Günter), *Aquaculture and Fisheries Management*, 17: 243-248.
- Martínez-Palacios, C. y Ross, L.G. 1992. The reproductive biology and growth of the Central American Cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Günter), *J. Appl. Ichtiol.* 8: 65-75.
- Mendoza, E.A., Páramo, S.D., Contreras, M.W., Márquez, C.G., 1993. Alternativas para el desarrollo piscícola para el manejo complementario de áreas inundadas de Tabasco, México. pp. 263-279. En: Tabasco realidad y perspectiva, Vol. II. Gobierno del Estado de Tabasco.
- Meyer, G., Machado, F.D. 2004. Protein requirement of jundia fingerlings *Rhamdia quelen*, at two dietary energy concentrations. *Aquaculture* 240, 331-343.
- Mitchell A.I., Dawson A. and Houlihan D.F. (1993) Trypsin inhibitors in commercial fish food. In *Fish Nutrition in Practice*. S.J. Kaushik and P. Luquet (Eds.) L. Colloques 61: 219-222. Biarritz, France.
- Mowry, R.D., 1963. The special value of methods that color both acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucins with revised directions for the colloidal iron stain, the use of Alcian blue G8X and their combinations with the periodic acid- Schiff reaction. *Ann. NY Acad. Sci.* 106, 402-423.
- Moyano, F.J., F.J. Alarcón y M. Díaz. 1998. Comparative biochemistry of fish digestive proteases applied to the development of *in vitro* digestibility assays. *Comp. Biochem. Physiol.* 5:135-143.
- Moyano, F.J., M. Díaz, F.J. Alarcón y M.C. Sarasquete. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* 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*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 122:327–332.

- Moyano, F.J., Savoie, L., 2001. Comparison of *in vitro* systems of protein digestion using either mammal or fish proteolytic enzymes. *Comp. Biochem. and Physiol.* 128A, 359-368.
- Morales D. A. 1991. La tilapia en México, biología, cultivo y pesquerías. AGT editorial, S.A.. México. 190 pag.
- New, M.B., Wijkström, U.N., 2002. Use of fishmeal and fish oil in aquafeeds: further thoughts on the fishmeal trap. *FAO Fisheries Circular No. 975, FIPP/C975.* Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 61 pp.
- Nilsson P.A. & Brönmark, C.B. (2000). The role of gastric evacuation rate in handling time of equal-mass rations of different prey sizes in northern. *J Fish Biol* 57:516–524.
- Ng, N.K., Lim, P.K., Boey, P.L., 2003. Dietary lipid and palm oil source affects growth, fatty acid composition and muscle a-tocopherol concentration of African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture* 215, 229-243.
- Nugent, J.H.A., Jones, W.T., Jordan, D.J., Mangan, J.L. 1983. Rates of proteolysis in the rumen of the soluble proteins casein, fraction I (18S) leaf protein, bovine serum albumin and bovine submaxillary mucoprotein. *British Journal of Nutrition* 50:357-368.
- Olsson, C. & Holmgren S. (2001). The control of gut motility. *Com Biochem Physiol* 128A:481–503.
- Oña CF, Alarcón J, Díaz M, Abellán E (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*. En: *Memorias del II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (CIVA)*, Univ. de Zaragoza, Zaragoza, España. pp. 540-549.
- Pääkkönen J.-P. J. & Marjomäki, T. J. (1997). Gastric evacuation rate of burbot fed single-fish meals at different temperaturas. *J Fish Biol* 50:555–563.
- Pääkkönen J.-P. J., Myyä, R., Marjomäki, T.J. (1999). The effect of meal size on the rate of gastric evacuation of burbot, *Lota lota* (L.). *Ecol Fresh Fish* 8:19–54.
- Papoutsoglou, E.S. & Lyndon, A.R. (2005). Effect of incubation temperature on carbohydrate digestion in important teleosts for aquaculture. *Aquacul Res* 36:1252–1264.
- Papoutsoglou, E.S. & Lyndon, A.R., (2006a). Digestive enzymes of *Anarhichas minor* and the effect of diet composition on their performance. *J Fish Biol* 69:446-460.
- Papoutsoglou, E.S., & Lyndon A.R. (2006b). Digestive enzymes along the alimentary tract of the parrotfish *Sparisoma cretense*. *J Fish Biol* 69:130–140
- Pedersen, B.H., Nilssen, E.M., Hjelmeland, K. (1987). Variation in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring *Clupea harengus* digesting copepod nauplii. *Mar Biol* 94:171–181.
- Pedersen, B. and Eggum, B. O. 1983. Prediction of protein digestibility by an *in vitro* enzymatic pH-stat procedure. *J. Anim. Physiol. & Anim. Nutr.* 49: 265-277.

- Person-Le Ruyet, J., B. Menu, M. Cadena-Roa y R. Métailler. 1983. Use of expanded pellets supplementes with attractive chemical substances for the wening of turbot (*Scophthalmus maximus*). J. World Maricul. Soc. 14:676-678.
- Pillay T.V.R. 1993. Acuaculture principles and practices. fishing news books. 575 pag.
- Polunin, N.V.C., Harmelin-Vivien, M., Galzin, R. (1995). Contrasts in algal food processing among five herbivorous coral-reef fishes. J Fish Biol 47:455-465.
- Real-Ehuan, G. 2003. Maculinización de crías de mojarra castarrica *Cichlasoma urophthalmus* mediante la administración de 17- α Metiltestosterona, Tesis de Licenciatura, UJAT-DACBIOL. 57 pp.
- Reis, A.P., Valente, M.P.L., Almeida, R.C.M. 2008. A fast and simple methodology for determination of yttrium as an inert marker in digestibility studies. Food Chemistry 108 1094-1098
- Resendes-Medina, A. y Salvadores, B.M.L., 1983. Contribución al conocimiento de la biología del pejelagarto *Lepisosteus tropicus* (Gill) y la mojarra tenguayaca *Petenia splendida* (Gunther), del estado de Tabasco. Biótica 8(4): 413-426.
- Ribeiro, L., J.L. Zambonino-Infante, C. Cahu. y M.T. Dinis. 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. Aquaculture 170:465-473.
- Robyt, J. F. y W.J. Whelan. 1968. In: Starch and its Derivates. Radley, J. A. (Ed.). Chapman and Hall, London.
- Rojas, C.P. y Mendoza, E.A., 2000. El cultivo de especies nativas en México. Instituto Nacional de la Pesca-SEMARNAP. Dirección General de Investigaciones en Acuacultura. Estado de Salud en la Acuacultura, Nov 2000. 42 pp.
- Rungruangsak-Torrissen, K., Rustad, A., Sunde J., Eiane, S.A., Jensen, H.B., Opstvedt, J. y C. 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.
- Rosenlaud, G., J. Stoss y C. Talbot. 1997. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. Aquaculture 155: 183-191.
- Sánchez-Concha, J. y Rodríguez-Pérez, J. 1993. Inversión sexual de larvas de *Cichlasoma urophthalmus* mediante la aplicación de andrógenos. Tesis de Licenciatura, UJAT-DACBIOL. 79 pp.
- Santiago, L.M., Jardón, O., Jaramillo, S.G., Reyes, A.J., Sánchez, V.A., 1997. Edad, crecimiento y hábitos alimenticios de *Cichlasoma salvini* (Günther), *Cichlasoma urophthalmus* (Günther), *Oreochromis niloticus* (Linneo) y *Petenia splendida* (Günther). Presa Miguel de la Madrid H. (Cerro de oro), Tuxtepec, Oaxaca. Resúmenes del V Congreso Nacional de Ictiología 3-5 de febrero de 1997, Mazatlán, Sinaloa, México. 38 pp.
- Sarbahi, D.S. 1951. Studies of the digestive tracts and the digestive enzymes of the goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus) and the largemouth black bass *Micropterus salmoides* (Lacépède). Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole 100:24-257.
- Satterlee, L.D., H.F. Marshall y J.M. Tennyson. 1979. Measuring protein quality. J.A.O.C.S., 56: 103-109.
- Uscanga-Martínez, A. et al. 2011. Aplicaciones a la mejora de la utilización nutritiva del alimento en cíclidos cultivados en México. En: Cruz-Suárez, L.E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuicola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuicola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 46-104.

- Saunders, R.M., M.A. Conner, A.N. Booth, E.M. Bickoff y G.O. Kohler. 1972. Measurement of digestibility of alfalfa concentrates by *in vivo* and *in vitro* methods. J. Ntr., 103: 530-535.
- Savoie, L. y S.F. Gauthier. 1986. Dialysis cell for the *in vitro* measurement of protein digestibility. J. Food Sci. 51: 494-498.
- Savoie, L. 1994. Digestion and absorption of food: usefulness and limitations of *in vitro* models. *Canadian Journal Physiology and Pharmacology* 72:407-414.
- 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* 17; 255-264.
- SEMARNAP, 2000. La acuicultura en México. <http://www.semarnap.gob.mx>.
- Shiau, S. y H. Liang. 1995 Carbohydrate utilization and digestibility by tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, are affected by chromic oxide inclusion in the diet. J. Nutr. 125(4): 976-982.
- Scocco, P., Menghi, G., Ceccarelli. (1997). Histochemical differentiation of glycoconjugates occurring in the tilapia intestine. J Fish Biol 51:848-857.
- Soottawat, B., Somkid, K., Angkana, S. 1999. Inhibitory effects of legume seed extracts on fish Proteinases. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79:1875 - 1881
- Singh-Renton, S. & Bromley, P.J. (1996). Effects of temperature, prey type and prey size on gastric evacuation in small cod and whiting. J Fish Biol 49:702-713.
- Smith, D.M., Tabrett, S.J., Glencross, B.D., Irvin S.J., Barclay, M.C. 2007. Digestibility of lupin kernel meals in feeds for the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 264 353-362
- Smith, R.L. & Paulson, A.C. (1974). Food transit times and gut pH in two Pacific parrotfishes. *Copeia* 1974:796-799.
- Stauffer, C. 1989. Enzyme Assays for Food Scientists. Van Nostand Reinhold/AVI, New York. 552 pp.
- Stone, A.J. D., Gibson, G.T., Johansen, A.K., Overturf, K., Sealey, M.W., Hardy, W.R. 2008. Evaluation of the effects of repeated fecal collection by manual stripping on the plasma cortisol levels, TNF- α gene expression, and digestibility and availability of nutrients from hydrolyzed poultry and egg meal by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture* 275 250-259
- Storebakken, T., Kvien, I.S., Shearer, K.D., Grisdale-Helland, B., and Helland, S.J. (1999). Estimation of gastrointestinal evacuation rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using inert markers and collection of faeces by sieving: evacuation of diets with fish meal, soybean meal or bacterial meal, *Aquaculture* 172:291-299.
- Strickland, J.D.H. y T.R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada. Ottawa. 309 pp.
- Stroud, R. 1975. A family of proteins-cutting proteins. *Sci. Am.*, 231(1): 74-89.
- Tacon, A.G.J. 1993. Feed ingredients for warmwater fish: fish meal and other processed feedstuffs. FAO Fisheries Circular, 845: 64 pp.

- Tacon, A.G.J. 1995. Application of nutrient requirement data under practical conditions: special problems of intensive and semi-intensive fish farming. *J. Applied Ichthyol.*, 11: 205-214.
- Tacon, A.G.J. 1997. Fish meal replacers: Review of antinutrients within oilseeds and pulses. A limiting factor for the aquafeed Green Revolution, *Cah. Opt. Médit.*, 22: 153–182.
- Tanaka, M., S. Kawai y S. Yamamoto. 1972. On the development of the system and changes in activities of digestive enzymes during larval and juvenil stage in ayu. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish*, 38:1143-1152.
- Targett, T. E. & Targett, N. M. (1990). Energetics of food selection by the herbivorous parrotfish *Sparisoma radians*: roles of assimilation efficiency, gut evacuation rate, and algal secondary metabolites. *Mar Ecol Prog Ser* 66:13–21.
- Tonheim, S.K., Nordgreen, A., Høgøy, I., Hamre, K., Rønnestad, I. 2007. *In vitro* digestibility of water-soluble and water-insoluble protein fractions of some common fish larval feeds and feed ingredients. *Aquaculture* 262 426–435.
- Tucker, J.W. 1998. Marine fish culture. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, U.S.A. 750 p.
- Ueberchär, B. 1993. Measurement of proteolytic anzyme activity: Significance and application in larval fish research. Part III. p. 233-239. In: Physiological and biochemical aspects of fish development. Walther, B.T. y Fyhn, H.J. (Eds.). Univ. of Bergen, Norway.
- Ueberschär, B. 1995. The use of tryptic enzyme activity mesurement as a nutritional condition index: laboratory calibration data and field application. *ICES- J Mar Sci* 201:119–129.
- Valtierra, V.M.T., Schmitter, S.J.J., 2000. Hábitos alimentarios de las mojaras (Perciformes: *Cichlidae*) de la laguna Caobas, Quintana Roo, México. *Rev. Biol. Trop.* 48, 2-3.
- Vandenberg, G.W., & De La Noue, J. 2001. Apparent digestibility comparison in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) assessed using three methods of faeces collection and three digestibility markers. *Aquaculture Nutrition* 7; 237-245.
- Vasiluk, L., Pinto, J.L., Tsang, W.S., Gobas, A.P.C.F., Eickhoff, C., Moore, M.M. 2008. The uptake and metabolism of benzo[a]pyrene from a sample food substrate in an *in vitro* model of digestion. *Food and Chemical Toxicology* 46 610–618.
- Velasco, R.C., 1976. Los peces de agua dulce del Estado de Chiapas. Ediciones del Gobierno del Estado de Chiapas, México. 154 pp.
- Verreth, J. y M. Van Tongeren. 1989. Weaning time in *Clarias gariepinus* (Burchell) larvae. *Acuaculture* 83:81-88.
- Versaw, W., Cuppett, S.L., Winters, D.D. and Williams, L.E. 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J. Food Sci.* 54 : 232-254.
- Versichelle, D., P. Léger, P. Lavens y P. Sorgeloos. 1989. L'utilisation d'artémia. In: *Aquaculture* (G. Barnabé, ed.). Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, pp. 241-259.

- Vidal-López, J.M., 2004. Masculinización de crías de la mojarra tenguayaca *Petenia splendida* Gunther 1862 mediante bioencapsulado del esteroide 17- α -metiltestosterona en nauplios de *Artemia salina*. Tesis de Licenciatura, UJAT. 53 pp.
- Vizcarra-Quiroz, J.J. 1986. Dosis letal de triclofon (Dipterex) en *Cichlasoma urophthalmus* (Cichlidae). Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico de Mar, Veracruz. 56 pp.
- Waldford, J. y T.J. Lam. 1993. Development of digestive tract and proteolytic anzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture* 109:187-205.
- Walter, H.E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. V, pp. 270-277. Edited by H.J. Bergmeyer. Verlag Chemie. Weinham.
- Weber, K. y M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244: 4406-4412.
- Welcomme, R., 1988. International introduction of inland aquatic species. *FAO Fisheries Technical Paper*. 318 pp.
- Zar, J.H. (1996). *Biostatistical Analysis*. Tercera Edición. Prentice Hall. N.J. USA. 718 pp.
- Zambonino-Infante J.L. y C. Cahu. 1994. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 12(5): 399-408.
- Zambonino-Infante, J.L. y C. Cahu. 1999. High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *J. Nutr.* 129:1195-1200.
- Zambonino-Infante, J.L., C. Cahu, A. Péres, P. Quazuguel y M.M. Le Gall. 1996. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed differen Artemia rations: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. *Aquaculture* 139:129-138.