

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA**

DIGESTIBILIDAD PROTEICA EN EL LENGUADO DE CALIFORNIA (*Paralichthys californicus*): ONTOGÉNESIS Y COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EVALUACIÓN *IN VITRO*.

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

EMMANUEL MARTÍNEZ MONTAÑO

Ensenada, Baja California, México, Abril del 2007.

RESUMEN de la tesis de **Emmanuel Martínez Montaña**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA. Ensenada, Baja California, México. Abril 2007.

Digestibilidad proteica en el lenguado de California (*Paralichthys californicus*): Ontogénesis y comparación de dos métodos de evaluación *in vitro*.

Resumen aprobado por:

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Director

El componente más importante de los alimentos empleados en la acuicultura tanto económica como fisiológicamente es la proteína, debido al alto costo de los ingredientes proteicos y al alto requerimiento por este nutriente en organismos acuáticos. Son diversos los indicadores biológicos y químicos empleados para evaluar la calidad proteica, de los cuales la digestibilidad es de los indicadores biológicos más importantes y críticos, dado que ésta es una medida de la disponibilidad del nutriente en un ingrediente o en una dieta. La digestibilidad proteica en alimentos ha sido extensamente estudiada *in vivo*; sin embargo tales experimentos requieren de largos periodos de tiempo, generalmente son caros y los resultados pueden verse afectados por diversos factores ambientales y metodológicos. Por lo que actualmente, se ha dado énfasis por desarrollar métodos de digestibilidad *in vitro* para una evaluación fácil, reproducible, confiable y que proporcione resultados rápidos de la calidad proteica. Como primer objetivo en este trabajo se evaluó la digestibilidad proteica *in vitro* de ingredientes dietarios potenciales durante la ontogenia del sistema digestivo en larvas de lenguado de California (*Paralichthys californicus*) e identificar fuentes proteicas adecuadas para cada etapa de desarrollo. Las larvas fueron cultivadas en un sistema marino de recirculación cerrada alimentadas con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y nauplios de *Artemia* previamente enriquecidos con ácidos grasos altamente insaturados (HUFA's). La digestibilidad proteica de las fuentes proteicas se evaluó usando la técnica del pH STAT. Las enzimas digestivas utilizadas en los ensayos *in vitro* fueron obtenidas de homogenizados de tractos intestinales disecados de las larvas cultivadas y colectadas en cinco etapas de desarrollo (9, 15, 26, 39 y 51 DDE). Diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) en la digestibilidad proteica fueron encontradas para algunos de los ingredientes entre las etapas de desarrollo evaluadas. Las harinas elaboradas con los alimentos vivos típicos (rotíferos y *Artemia*) resultaron en las digestibilidades proteicas más altas con una tendencia a disminuir conforme progresa el desarrollo larvario. Las harinas de krill y soya fueron pobremente digeridas, lo cual puede atribuírsele a la presencia de factores antinutricionales y/o a diferencias en la calidad proteica. Los resultados de este estudio confirman la importancia de evaluar la digestibilidad de las fuentes proteicas a través del

desarrollo larvario, lo que conlleva a la formulación de microdietas adecuadas (i.e., estadio-específicas) para destetes exitosos. Un segundo objetivo de este trabajo consistió en comparar los resultados de dos métodos de digestibilidad *in vitro*, con indicadores de desempeño obtenidos en un ensayo de crecimiento con juveniles de lenguado de California. La digestibilidad proteica de tres dietas experimentales fue estimada usando dos métodos de digestibilidad *in vitro*: un método basado en la cuantificación espectrofotométrica de los aminoácidos aromáticos liberados durante la reacción de hidrólisis y el método del pH STAT que cuantifica la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas. Tres dietas isoproteicas fueron formuladas para contener niveles crecientes de energía dietaria (19, 20 y 21 KJ/100g) y alimentar a juveniles de lenguados cultivados a dos diferentes temperaturas (20 y 25 °C) (diseño factorial 3×2). Las proteasas digestivas empleadas en los métodos *in vitro* fueron obtenidas de los juveniles alimentados con las dietas experimentales por 56 días. La digestibilidad proteica *in vitro* estimada por ambos métodos fue consistente, observándose una correlación positiva significativa ($p < 0.05$, $r^2 = 0.55$). Además, se observó un efecto altamente significativo de la temperatura ($p < 0.001$) sobre la digestibilidad *in vitro* usando ambos métodos. Una correlación significativa ($p < 0.05$) entre los estimados de la digestibilidad proteica *in vitro* y el peso final, el porcentaje de sobrevivencia y la tasa de eficiencia proteica (TEP) fue observada. Los métodos *in vitro* empleados resultaron ser una herramienta adecuada tanto para estimar la digestibilidad proteica como para evaluar el efecto de la temperatura de cultivo sobre la digestibilidad proteica y el aprovechamiento proteico. Con base en estos resultados, se recomienda el cultivo del lenguado de California a una temperatura cercana a 20°C para optimizar la digestión y la utilización de la proteína dietaria para el crecimiento.

Palabras claves: Digestibilidad proteica *in vitro*; pH STAT; *Paralichthys californicus*
Ingredientes dietarios; Larvas de peces marinos; Dietas estadio-específicas.

ABSTRACT of the thesis presented by Emmanuel Martínez Montaña as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree with orientation in AQUACULTURE. Ensenada, Baja California, México. April 2007.

Protein digestibility in California halibut (*Paralichthys californicus*): Ontogeny and evaluation of two *in vitro* methods to assess digestibility.

Abstract approved by:

Juan Pablo Lazo Corvera, Ph. D.
Director

Protein is the most important component of feeds used in aquaculture, due to its high cost and the high requirements for this nutrient in aquatic organisms. Several biological and chemical indexes are used to evaluate the protein quality of ingredients and diets. Protein digestibility of ingredients and feeds is essential to estimating the nutritive value of feeds for fish. *In vivo* protein digestibility of feeds has been widely used for this purpose, however techniques to assess nutrient *in vivo* digestibility are expensive, laborious and several extrinsic factors can affect results. Recently alternative methods have been developed to avoid some of these problems, where *in vitro* digestibility assays are easy, reproducible, and fast techniques to assess the quality of protein sources. Drastic changes in digestive capacity occur in marine fish larvae during development. Thus, the objectives of this study were first to assess the *in vitro* protein digestibility of potential dietary ingredients throughout ontogeny of the digestive system in larvae of California halibut (*Paralichthys californicus*) and identify adequate protein sources for each stage of development. Larvae were reared in a closed recirculating system and fed with highly unsaturated fatty acid (HUFA)-enriched rotifers and *Artemia* nauplii. Protein digestibility of potential protein sources was evaluated using the pH-STAT technique. Digestive enzymes utilized for the *in vitro* assays were obtained from homogenates of dissected guts of larvae sampled at five stages of development (9, 15, 26, 39 and 51 days post hatch). Highly significant differences ($p < 0.001$) in protein digestibility were found for some ingredients among the developmental stages evaluated. Meals elaborated with typical live feeds (rotifers and *Artemia*) showed the highest protein digestibility with a tendency to decrease as larval development progressed. Soybean and krill meals were digested poorly and could be attributed to the presence of antinutritional factors and/or differences in protein quality. Results from this part of the study warrant the importance of evaluating the digestibility of protein sources through larval development in order to formulate successful weaning diets (i.e., stage-specific diets). As a second objective, protein digestibility of three experimental diets was estimated using two *in vitro* methods: one based on the spectrophotometric quantification of aromatic amino acids released during the reaction of hydrolysis and the pH-STAT method, which

estimates digestibility from the hydrogen ions release during hydrolysis of the peptide bonds in proteins. Three isoproteic diets were formulated to contain increasing levels of dietary energy (19, 20 and 21 KJ/100 g) and fed to juvenile flounder cultured at two different temperatures (20 and 25°C) (i.e. 3X2 factorial design). Fish proteases for the *in vitro* methods were obtained from juveniles fed with experimental diets for 56 days. Estimates of protein digestibility in both *in vitro* methods were consistent. A significant positive correlation of estimates of protein digestibility between the methods was found ($p < 0.001$, $r^2 = 0.55$). In addition, a highly significant ($P < 0.001$) effect of temperature on protein digestibility was observed using both *in vitro* methods. Higher estimates of protein digestibility were obtained using fish proteases from juveniles cultured at 20°C compared to those cultured at 25°C, irrespective of dietary energy. A significant correlation ($p < 0.05$) between estimates of *in vitro* protein digestibility and final fish weight, percent survival and PER (protein efficiency ratio) was observed. Based on the results obtained from this study, it appears that both *in vitro* methods used were a suitable tool to estimate *in vitro* protein digestibility values and to evaluate the effect of culture temperature on protein digestibility and utilization of dietary protein. Thus, we recommend the culture of California halibut a temperature near 20°C, to efficiently digest and utilize dietary protein for growth.

Keywords: *In vitro* protein digestibility; pH STAT; *Paralichthys californicus*; marine fish larvae; stage-specific diets.

DEDICATORIA

A mi tan amada y añorada madre Doña María Bautista Méndez, quien me forjó con sus sabios consejos y ejemplos, que Dios le guarde... Su memoria es el principal motor de mi superación.

A mis tíos, Ricardo Montaña Bautista y Ana Luisa Pérez Herrera por todos los sacrificios que han realizado para brindarme su constante apoyo, sin el cual no me hubiese sido tan fácil este camino de mi formación profesional.

A mi madre Lucía Montaña Bautista y mis tíos Patricia Montaña Bautista y Pedro Carrasco Santos, por su gran ayuda y apoyo en cualquier momento que la eh requerido.

Les estoy eternamente agradecido...

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Pablo Lazo Corvera por su gran amistad, por compartir su amplio conocimiento científico, su calidez humana, pero sobre todo por su confianza, ayuda y comprensión en los momentos más difíciles de mi vida.

Al Dr. Benjamín Barón Sevilla por su gran amistad, por su constante apoyo y ayuda en todo momento y grandes enseñanzas.

Al Dr. Oscar Sosa por su tiempo brindado y sus recomendaciones para llevar a buen término este trabajo de tesis.

Al Dr. Fernando García Carreño, la Tec. María de los Ángeles Navarrete de Toro y demás integrantes de su laboratorio en el CIBNOR, La Paz B.C.S., por su hospitalidad, por capacitarme en el uso del pH STAT y sobre todo su tiempo, reactivos y equipos proporcionados.

A la Dra. María Teresa Viana y la Dra. Lus López Acuña, por facilitarme equipos, reactivos e instalaciones para la realización de los análisis proximales sin problema alguno.

Al M. en C. Mario A. Galaviz por proporcionar los tractos digestivos de juveniles de lenguados provenientes de su experimento y permitir el uso de algunos datos generados en dicho estudio.

Al CONACYT por otorgarme una beca para realizar mis estudios de maestría.

A los amigos de la maestría:

A Francisco López Rasgado, Marco Sánchez Anzueto y Luis Márquez Reyes por todos los excelentes, inolvidables e incluso penosos momentos que hemos compartido juntos. Gracias por su invaluable amistad.

A Ruth Montes, Getsemany Juárez, Marisol Simón y Jaime Gonzáles mi familia Ensenadense, por los gratos e inolvidables momentos que hemos vivido formando juntos un pequeño hogar en estos últimos meses.

A la Dra. Magali Zacarías Soto, la M. en C. Verónica Vizcaíno, la M. en C. Ivonne Santiago y el M. en C. Mario Galaviz por nuestra constante retroalimentación científica, pero sobre todo por su valiosa e invaluable amistad. Además de la gran ayuda prestada en cualquier momento de la maestría.

A mis compañeros de generación: Julieta García, Diego O. Vea Campa, Francisco Galicia y José Luis Esquer.

CONTENIDO	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
II.1. El cultivo de peces planos o lenguados.....	4
II.2. La alimentación en las etapas larvarias de peces marinos.....	6
II.3. Ontogenia enzimática digestiva del lenguado de California.....	7
II.4. El estudio de la digestibilidad proteica <i>in vitro</i> en peces.....	9
III. OBJETIVOS	15
IV. HIPÓTESIS	16
V. MATERIALES Y MÉTODOS	17
V.1. Digestibilidad proteica <i>in vitro</i> de ingredientes y alimentos vivos durante la ontogenia del lenguado de California (<i>Paralichthys californicus</i>).....	17
V.1.1. Crianza larvaria del Lenguado de California (<i>P. californicus</i>).....	17
V.1.2. Toma de muestras.....	19
V.1.3. Métodos analíticos.....	21
V.1.3.1. Extracción de enzimas digestivas.....	21
V.1.3.2. Actividad proteolítica.....	21
V.1.3.2.1. Selección del pH adecuado para la cuantificación de la actividad proteolítica alcalina y posteriores pruebas de digestibilidad <i>in vitro</i>	21
V.1.3.2.2. Cuantificación de la actividad proteolítica alcalina de los extractos enzimáticos.....	22
V.1.3.3. Cuantificación de la proteína soluble de los extractos enzimáticos.....	23

CONTENIDO (continuación)	<u>Pág.</u>
V.1.3.4. Evaluación de la digestibilidad <i>in vitro</i> proteica ontogénica de ingredientes con potencial para la elaboración de dietas para larvas de lenguado de California.....	24
V.1.3.4.1. Selección de los ingredientes evaluados.....	24
V.1.3.4.2. Análisis proximal y cuantificación de la proteína soluble de los ingredientes.....	25
V.1.3.4.3. Evaluación de la digestibilidad <i>in vitro</i> de los ingredientes.....	25
V.2. Comparación de la digestibilidad proteica <i>in vitro</i> de dietas experimentales con diferentes relaciones Energía:Proteína (E:P) en juveniles de lenguado de California (<i>P. californicus</i>) cultivados en diferentes temperaturas.....	28
V.2.1. Obtención de los sistemas digestivos de los juveniles de lenguado de California (<i>P. californicus</i>)	28
V.2.2. Métodos analíticos.....	30
V.2.2.1. Extracción y análisis de enzimas digestivas de juveniles de lenguado de California.....	30
V.2.2.2 Evaluación de la digestibilidad <i>in vitro</i> mediante una técnica espectrofotométrica.....	31
V.2.2.3. Evaluación de la digestibilidad <i>in vitro</i> mediante el pH-STAT.....	32
V.3. Análisis estadístico de los datos.....	32
VI. RESULTADOS	34
VI.1. Digestibilidad proteica <i>in vitro</i> de ingredientes durante la ontogenia digestiva del lenguado de California.....	34
VI.1.1. Crecimiento larvario del Lenguado de California (<i>P. californicus</i>).	34

CONTENIDO (continuación)	Pág.
VI.1.2. Actividad proteolítica alcalina durante el periodo larvario del lenguado de California.....	35
VI.1.2.1 Selección del pH adecuado para la cuantificación de la actividad proteolítica alcalina y posteriores pruebas de digestibilidad <i>in vitro</i>	35
VI.1.2.2. Actividad proteolítica alcalina medida durante la ontogenia del lenguado de California.....	36
VI.1.3. Análisis proximal de los ingredientes evaluados.....	38
VI.1.4. Digestibilidad proteica <i>in vitro</i> de ingredientes alimenticios evaluados durante la ontogenia digestiva del lenguado de California	41
VI.1.5. Valores de autohidrólisis o líneas base de los ingredientes evaluados.....	49
VI.2. Comparación de la digestibilidad proteica <i>in vitro</i> de dietas experimentales con diferentes relaciones E:P en juveniles de lenguado de California (<i>P. californicus</i>) cultivados en diferentes temperaturas.....	50
VI.2.1. Actividad proteolítica alcalina total de los juveniles de lenguado de California del experimento.....	50
VI.2.2. Digestibilidad <i>in vitro</i> de las dietas experimentales empleando una técnica espectrofotométrica y una técnica electroquímica.....	51
VI.2.2.1. Relación de la digestibilidad proteica <i>in vitro</i> de las dietas experimentales con los índices de rendimiento del experimento de crecimiento.....	54
VII. DISCUSIÓN	57
VII.1. Digestibilidad proteica <i>in vitro</i> de ingredientes durante la ontogenia digestiva del lenguado de California.....	57

CONTENIDO (continuación)	<u>Pág.</u>
VII.1.1. Actividad proteolítica alcalina durante el periodo larvario del lenguado de California.....	57
VII.1.2. Digestibilidad proteica <i>in vitro</i> de ingredientes alimenticios evaluados durante la ontogenia digestiva del lenguado de California.....	61
VII.2. Comparación de la digestibilidad proteica <i>in vitro</i> de dietas experimentales con diferentes relaciones E:P en juveniles de lenguado de California (<i>P. californicus</i>) cultivados en diferentes temperaturas.....	73
VIII. CONCLUSIONES.....	77
IX. LITERATURA CITADA.....	79

LISTA DE FIGURAS

<u>FIGURA</u>	Pág.	
1	<p>Protocolo de alimentación y toma de muestras durante el larvicultivo del lenguado de California (<i>Paralichthys californicus</i>). Se indican los principales eventos que tienen lugar durante el desarrollo del sistema digestivo. AA: Actividad proteasa alcalina. AB: Apertura bucal. MO: Migración ocular e inicio de la metamorfosis. EF: Estómago funcional. RE: Regionalización del estómago.</p>	20
2	<p>Crecimiento en longitud estándar (LE, en mm) del Lenguado de California (<i>Paralichthys californicus</i>) durante el periodo experimental. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n = 30).</p>	34
3	<p>Efecto del pH sobre la actividad relativa proteolítica alcalina (%) de los extractos de lenguado de California, en tres diferentes días de muestreo (9, 26 y 51 DDE).</p>	36
4	<p>Actividad proteolítica total durante los muestreos realizados en el cultivo de larvas de lenguado de California. a). Actividad total (U Larva⁻¹) en función de la edad; b). Actividad total en función del tamaño (Longitud estándar, LE); c). Actividad específica (U mg proteína⁻¹) en función de la edad. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n = 3).</p>	37
5	<p>Grado de hidrólisis (GH %) de los ingredientes evaluados empleando extractos enzimáticos digestivos de las larvas pertenecientes al (a). Primer día de muestreo (9 DDE, 4.59 mm LE); y, (b). Segundo día de muestreo (15 DDE, 6.37 mm LE). Tiempo de reacción de la hidrólisis: 90 minutos. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n = 3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a p<0.05.</p>	42

<u>FIG.</u>	LISTA DE FIGURAS (Continuación)	<u>Pág.</u>
6	Grado de hidrólisis (GH %) de los ingredientes evaluados empleando extractos enzimáticos digestivos de las larvas pertenecientes al (a). Tercer día de muestreo (26 DDE, LE = 6.92 mm); y, (b). Cuarto día de muestreo (39 DDE, LE = 10.5 mm). Tiempo de reacción de la hidrólisis: 90 minutos. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n = 3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p < 0.05$.	44
7	Grado de hidrólisis (GH %) de los ingredientes evaluados empleando extractos enzimáticos digestivos de las larvas pertenecientes al quinto día de muestreo (51 DDE, LE = 15.88 mm). Tiempo de reacción de la hidrólisis: 90 minutos. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n = 3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p < 0.05$.	45
8	Comparación individual de los grados de hidrólisis (GH%) de los ingredientes evaluados a través de la ontogenia del sistema digestivo del lenguado de California (<i>P. californicus</i>). DDE: Días después de la eclosión. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n = 3).	48
9	Actividad proteolítica total ($U \text{ organismo}^{-1}$) de los juveniles de los lenguados al final del experimento de crecimiento. Tres niveles de energía dietética 19, 20 y 21 KJ por cada 100 g de dieta (E19, E20 y E21, respectivamente) y dos diferentes temperaturas de cultivo a 20 y 25 °C (T20 y T25, respectivamente). Las líneas verticales representan la desviación estándar de la media (n = 14).	50

<u>FIG.</u>	LISTA DE FIGURAS (Continuación)	<u>Pág.</u>
10	Digestibilidad <i>in vitro</i> de las tres dietas experimentales con a). la técnica espectrofotométrica de Lan y Pan (1993) y b). La técnica electroquímica del pH STAT. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n = 3). Las columnas con diferentes letras indican diferencias significativas a $p < 0.05$.	52
11	Correlación entre las digestibilidades <i>in vitro</i> de las dietas experimentales estimadas a través de dos técnicas diferentes, la técnica del pH STAT expresada en grados de hidrólisis (GH) y la técnica espectrofotométrica expresada como digestibilidad proteica relativa (DPR %)	53

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		Página
I	Ingredientes y alimentos vivos seleccionados para el presente estudio y su origen.	24
II	Contenido de enlaces peptídicos para las fuentes proteicas empleadas en el presente estudio (Adler-Nissen, 1986).	28
III	Composición de ingredientes de las dietas experimentales (% del peso seco) evaluadas en el presente estudio y su análisis proximal (Bajo permiso de Galaviz-Espinoza, 2007).	29
IV	Composición proximal (% del peso total) de los ingredientes evaluados en los análisis de digestibilidad ontogénica <i>in vitro</i> . Extracto libre de nitrógeno (E.L.N.). Media de tres determinaciones \pm desviación estándar. Proteína soluble (PROT. SOL.). Media de tres determinaciones \pm desviación estándar.	40
V	Grados de hidrólisis (%) de los ingredientes evaluados a través de la ontogenia del sistema digestivo del lenguado de California (<i>Paralichthys californicus</i>) en los cinco días de muestreo: 9, 15, 26, 39 y 51 días después de la eclosión (DDE).	47
VI	Valores de autohidrólisis o líneas base de los ingredientes empleados en el presente estudio. Media de tres determinaciones \pm desviación estándar.	49

TABLA	ÍNDICE DE TABLAS (Continuación)	<u>Página</u>
VII	Indicadores de desempeño al final del experimento de crecimiento (Bajo permiso de Galaviz-Espinoza, 2007). TEP: Tasa de eficiencia proteica. CDA: Coeficiente de digestibilidad aparente. Media de tratamiento \pm desviación estándar.	55
VIII	Matriz de correlaciones entre la digestibilidad <i>in vitro</i> en términos de digestibilidad proteica relativa (DPR) y grados de hidrólisis (GH) con los indicadores de rendimiento al final del experimento de crecimiento.	56
IX	Diferencias de la digestibilidad proteica <i>in vitro</i> de los ingredientes y alimentos vivos evaluados empleando extractos enzimáticos digestivos de larvas de lenguado <i>P. californicus</i> . El símbolo (=) indica que no existen diferencias significativas a $P < 0.05$.	64

I. INTRODUCCIÓN

El éxito en el cultivo de peces marinos depende en gran parte del desarrollo de dietas elaboradas a partir de ingredientes de bajo costo y con altos valores nutritivos. Se ha estimado que el alimento, por sí solo, representa entre el 40 y 60 % de los gastos de producción totales (Anderson *et al.* 1993), siendo con esto el principal factor limitante de la producción intensiva de peces y otros organismos acuáticos de importancia comercial.

El componente más importante de los alimentos empleados en la acuicultura es la proteína, debido al alto costo económico de los ingredientes proteicos y al alto requerimiento por este nutriente en organismos acuáticos (García-Carreño *et al.* 1996). En los peces, la proteína es el principal elemento orgánico, constituyendo entre el 65 y 75% de su peso seco total corporal (Wilson, 2002). Si se compara con los animales terrestres, los requerimientos proteicos de los peces son elevados, oscilando entre el 35 y 58 % del peso seco de la dieta. Por este motivo es de suma importancia la evaluación de la calidad proteica presente en el alimento.

La calidad de la proteína alimenticia está determinada por distintos factores, entre los que destacan su perfil de aminoácidos, la digestibilidad, precio y disponibilidad en la zona o región (Dong *et al.* 1993). Son diversos los indicadores biológicos y químicos empleados para evaluar dicha calidad proteica. La digestibilidad es uno de los indicadores biológicos más importantes y críticos, dado que es una medida de su biodisponibilidad en un ingrediente o en una dieta (Ezquerro-Brauer, 1997; Lazo y Davis, 2000). Definiendo como biodisponibilidad proteica a la porción de esta que es absorbida por el tracto digestivo

de un organismo (tras un proceso previo de acción mecánica, química y/o enzimática) y usada para una o más funciones biológicas (Sugiura, 2000).

La digestibilidad proteínica en los alimentos ha sido extensamente estudiada *in vivo*; sin embargo estos experimentos requieren de largos periodos de tiempo, generalmente son caros, laboriosos y los resultados se pueden ver afectados por diversos factores ambientales y metodológicos (Ezquerro *et al.* 1997; García-Ortega, 1999; Biswas *et al.* 2005). Aunado a estas desventajas, evaluar la digestibilidad *in vivo* requiere la recolección de heces fecales, lo cual para ensayos con larvas de peces marinos resulta extremadamente difícil debido al tamaño de los organismos y sus heces fecales en esta etapa (Alarcón *et al.* 1999). Por lo que actualmente, se ha dado énfasis al desarrollo de métodos *in vitro* para una evaluación fácil, reproducible, confiable y que proporcione resultados rápidos de la calidad proteica (Lazo *et al.* 1998; Carter *et al.* 1999; Moyano y Savoie, 2001; Chong *et al.* 2002).

Se sabe que el estudio de la fisiología digestiva durante el desarrollo larvario de los peces marinos, es esencial para la formulación y diseño de microdietas compuestas adecuadas a la capacidad digestiva de los organismos en cada etapa de desarrollo o estadio (Walford y Lam, 1993; Kolkovski, 2001). A la fecha, son pocos los estudios que han puesto atención a los cambios en la capacidad digestiva que ocurren dentro de cada etapa específica del desarrollo larvario. Sin embargo, el conocimiento de los cambios digestivos ontogénicos en términos de tipos enzimáticos y actividad relativa puede ser utilizado para desarrollar ensayos de digestibilidad *in vitro* confiables que permitan la selección de ingredientes dietarios potenciales y alimentos formulados sin la necesidad de realizar ensayos de alimentación caros y laboriosos.

Mediante la determinación de la digestibilidad se pueden discriminar ingredientes o compuestos que al ser poco digeribles y excretados a través de las heces, decrementan la calidad del agua de los cultivos, afectando los niveles de carga de nitrógeno, fósforo y materia orgánica en los efluentes (Bassompierre *et al.* 1997; Chong *et al.* 2002). Los grandes costos de producción originados por la alimentación, pueden ser disminuidos al optimizar las tasas de conversión alimenticia, pero en particular, la eficiencia de la utilización de las proteínas (Sugiura, 2000), para mantener organismos cultivados en un estado adecuado de salud.

El presente estudio tiene como objetivos, (1) evaluar los probables cambios de la digestibilidad proteínica *in vitro* de ingredientes alimenticios durante la ontogenia del sistema digestivo en larvas de lenguado de California (*Paralichthys californicus*), empleando extractos enzimáticos larvarios. Este objetivo se plantea con la finalidad de generar conocimiento para la posible elaboración de dietas estadio-específicas en las cuales además de variar el tamaño de las partículas, varíe la proporción o inclusión de ingredientes de acuerdo a su digestibilidad dando como resultado rendimientos máximos al final del larvicultivo; y (2) comparar los resultados de dos métodos de digestibilidad *in vitro* con los indicadores de desempeño (supervivencia, peso final, tasa de eficiencia proteica) de juveniles de lenguado de California de un ensayo de crecimiento.

II. ANTECEDENTES

II.1. El cultivo de peces planos o lenguados

El interés por cultivar lenguados radica en la excelente calidad del sabor y textura de su carne, su demanda en el mercado a nivel mundial, su alto valor económico y su capacidad para crecer en aguas salobres y marinas (Daniels, 2000). Además, por sus hábitos bentónicos, poseen altas tasas de conversión alimenticia y sus necesidades de oxígeno disuelto son menores en comparación a otros peces marinos (Conklin *et al.* 2003).

Son diversas las especies de peces planos o lenguados que se han estudiado a la fecha, pero sólo algunas son de interés comercial y muy pocas las que se han cultivado exitosamente a niveles comerciales. En Europa, sólo los cultivos de Turbot europeo *Scophthalmus maximus* y de lenguado del Atlántico *Hippoglossus hippoglossus* están bien establecidos, en el año 2000 alcanzaron niveles de producción anuales de 5,000 y 500 toneladas métricas (TM), respectivamente (Brown, 2002). Otras especies de lenguados, como los soles Dover *Solea solea* y Senegalense *S. senegalensis*, parecen tener alto potencial para ser cultivados en ese continente. En Asia, el cultivo del lenguado japonés o Hirame *Paralichthys olivaceus*, ha tenido un alto grado de desarrollo, tal que su producción es totalmente dependiente de juveniles o semilla obtenida de reproductores en cautiverio. Esta especie se cultiva en áreas costeras de Japón, Corea y China, cuya producción anual estimada para el año 2000 en esta zona alcanzó las 28,000 TM (Seikai, 2002). En Sudamérica, sólo en Chile está bien establecida la producción comercial de lenguados. En este país, la actividad inició a partir de la introducción y adaptación de la tecnología de cultivo del turbot europeo *S. maximus* en el año de 1982 por parte de la Fundación Chile

(FCH). Su éxito fue tal que FCH en recientes fechas ha expandido sus programas para el desarrollo y transferencia de tecnologías para el cultivo del lenguado chileno *P. adpersus*, del Hirame *P. olivaceus* y del lenguado de Atlántico *H. hippoglossus* (Alvial y Manríquez, 1999). En Norteamérica, el lenguado de verano *P. dentatus*, el lenguado sureño *P. lethostigma* y el lenguado de invierno *Pleuronectes americanus*, son especies candidatas para su maricultura debido a su demanda recreativa y comercial en la costa atlántica Estadounidense (Burke *et al.* 1999; Daniels, 2000). En la región norte del Pacífico oriental, el lenguado de California *P. californicus*, es una de las especies de importancia comercial aprovechada por la pesca comercial y deportiva (Kucas y Hassler, 1986; Gadomski, 1990; Herzka *et al.* 2003).

El lenguado de California se distribuye desde la desembocadura del río Quillayute en Washington, EE. UU., hasta bahía Magdalena en Baja California Sur, México (Allen, 1975). Miembro de la familia Paralichthyidae, es la especie que alcanza la mayor talla, con ejemplares que han alcanzado pesos y longitudes superiores a los 32 Kg y 1.5 m (Frey, 1971).

El lenguado de California es la especie más importante de los peces planos capturados en Sonora y la península de Baja California, México. Es una especie apreciada por su tamaño y por la calidad de su carne. Sin embargo su captura implica una proporción alta de especies asociadas y las pesquerías de este grupo están siendo aprovechadas al máximo sustentable e incluso durante la década de los 1990, se observó una disminución en su captura de 3000 a 2000 TM anuales (CNP, 2000). Es por esto que en años recientes esta especie ha despertado un gran interés en la comunidad científica por elaborar un paquete tecnológico que haga posible su cultivo intensivo en cautiverio a escala comercial (Conklin

et al. 2003; Herzka *et al.* 2003). Sin embargo, al igual que en el cultivo de otras especies marinas, la obtención de organismos juveniles como pie de cría ha sido una de las principales limitantes.

II.2. La alimentación en las etapas larvarias de peces marinos

El cultivo larvario de peces marinos, tales como los lenguados, se basa en el empleo de alimento vivo, como el rotífero *Brachionus plicatilis* y el crustáceo *Artemia* spp. (Burke *et al.* 1999; Hamre *et al.* 2002; Evjemo *et al.* 2003). No obstante, se ha observado que los alimentos vivos tienen la desventaja de un alto costo de producción, frecuentes variaciones de su calidad nutricional, son naturalmente deficientes en macro o micronutrientes y no llegan a satisfacer los requerimientos nutricionales de algunas larvas de peces (García-Ortega, 2000; Harme *et al.* 2002; Takeuchi *et al.* 2003). Además, los tamaños corporales de las presas dejan de ser los adecuados para las larvas en las etapas tardías. A pesar de las desventajas que conlleva el uso de alimentos vivos para la alimentación larvaria de peces, a la fecha no se han podido reemplazar por alimentos compuestos y siguen siendo imprescindibles en las etapas tempranas del cultivo.

El empleo de alimentos formulados en la larvicultura de peces marinos se inicia mediante el reemplazo gradual del alimento vivo en un proceso conocido como destete. El destete tardío utilizando microdietas compuestas, es la estrategia que mejores resultados a generado en el cultivo larvario del lenguado de California, al sustituir gradualmente los nauplios de artemia, a partir del día 36 después de la eclosión, por alimento formulado (Lazo, 2000; Muguet, 2004).

El destete de los peces marinos es una etapa crítica del cultivo en la cual la dieta usada debe ser de óptima calidad (Hamre *et al.* 2003). Cahu y Zambonino-Infante (2001) y Civera-Cerecedo *et al.* (2004), proponen que para que una dieta sea adecuada para el cultivo larvario de peces marinos debe: (1) cubrir los requerimientos nutricionales de las larvas; (2) las partículas deben poseer tamaños adecuados que faciliten su detección e ingestión; (3) las partículas deben ser estables en el agua, palatables y con una apariencia adecuada; (4) las partículas alimenticias deben ser homogéneas, cada una debe contener la misma cantidad de nutrientes; y, (5) las partículas deben encontrarse en densidades adecuadas en la columna de agua. Pero sobre todo, (6) las dietas deben ser formuladas con ingredientes altamente digeribles y que respondan a las variaciones ontogénicas enzimáticas específicas en las etapas larvarias de peces marinos (Lazo *et al.* 2000a; Valverde-Chavarría, 2002).

El éxito limitado de las dietas formuladas se ha asociado a sus bajas tasas de ingestión y a su baja digestibilidad, derivando en bajos rendimientos al final del larvicultivo (Bengtson, 1993). Sin embargo, se ha encontrado que el empleo de ingredientes altamente digeribles en su elaboración incrementa las tasas de ingestión y la actividad enzimática, permitiendo una mayor digestión de los nutrientes, lo que promueve un mejor desarrollo y crecimiento larvario (Cahu *et al.* 1999; Oliva-Teles *et al.* 1999; Kolkovski y Tandler, 2000; Lazo, 2000).

II.3. Ontogenia enzimática digestiva del lenguado de California

El lenguado de California *P. californicus* es una especie que muestra grandes cambios morfológicos internos y externos durante la etapa larvaria hasta finalizar su

metamorfosis. Como en la mayoría de los peces marinos, al momento de la apertura bucal y anal, tras la casi completa reabsorción del saco vitelino (3 días después de la eclosión, DDE), el lenguado de California posee un sistema digestivo indiferenciado y rudimentario (Gisbert *et al.* 2003). En estas etapas tempranas, órganos tales como el hígado y el páncreas se encuentran bien diferenciados, este último es el principal responsable de la producción y secreción de enzimas digestivas (Zacarías-Soto *et al.* 2006). La diferenciación de las glándulas gástricas puede iniciar antes del día 30 después de la eclosión (DE), pero son completamente funcionales a partir del día 36 DE (Gisbert *et al.* 2003; Álvarez-González *et al.* 2006; Zacarías-Soto *et al.* 2006). Sin un estómago funcional, la digestión de las partículas alimenticias ingeridas toma lugar en el intestino anterior, donde el pH es alcalino y las enzimas presentes en el lumen intestinal, tales como la tripsina y la quimiotripsina, son las más importantes (Walford y Lam, 1993). Cabe resaltar que en las primeras etapas del desarrollo larval existe una digestión extracelular moderada en el intestino anterior, la cual es compensada por la micropinocitosis y la digestión que se da en el intestino posterior por parte de enzimas adheridas a la membrana del epitelio intestinal (aminopeptidasas y fosfatasas alcalinas) y enzimas intracelulares (catepsinas) (Kurokawa *et al.* 1996; Lazo, 2000; Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

Por otra parte, las glándulas gástricas en las larvas de lenguado de California se pueden observar completamente diferenciadas entre el día 27 y 30 después de la eclosión (Gisbert *et al.* 2003) y la aparición de actividad de proteasas ácidas (principalmente pepsina) se detecta a partir del día 36 DE (Muguet, 2004; Zacarías-Soto *et al.* 2006), aunque Álvarez-González *et al.* (2006) detectaron equivocadamente este tipo de actividad en edades mucho más tempranas (18 DDE). Este desfase entre la aparición de las glándulas

gástricas y la funcionalidad del estómago es común en los peces marinos (Alarcón, 1997). Las glándulas gástricas completamente diferenciadas y la regionalización de un estómago en tres partes (región cardiaca, fúndica y pilórica) es observable hasta el día 44 DE (Zacarias-Soto *et al.* 2006), fecha que coincide con el final del proceso de metamorfosis y el inicio de la etapa juvenil del lenguado. La aparición de un estómago funcional es un evento decisivo para implementar estrategias de destete, que conllevan el cambio de alimento vivo por microdietas compuestas (Muguet, 2004).

II.4. El estudio de la digestibilidad proteica *in vitro* en peces

Conocer la digestibilidad de la proteína en un ingrediente o dieta es crítico, ya que un alimento puede tener un perfil de aminoácidos balanceado, pero no generar respuestas de crecimiento adecuadas, debido a que los nutrientes, al ser poco digeribles para un organismo, son pobremente absorbidos y como consecuencia no pueden ser totalmente aprovechados.

La evaluación de la digestibilidad *in vivo* se basa en la medición de la porción de un nutriente en el alimento (p. ej. proteína) que no fue digerido y absorbido durante su tránsito por el tracto digestivo, y que finalmente es excretada como parte de la materia fecal (Bureau *et al.* 2002). Luego, la porción absorbida es calculada por la diferencia entre el nutriente ingerido y el excretado; esta porción del nutriente biodisponible se expresa como el Coeficiente de Digestibilidad Aparente (CDA). Sin embargo, en los peces, la recolección de heces fecales para la estimación del CDA es difícil y requiere de variadas técnicas que van desde la colecta de heces por presión manual del área rectal o “stripping” (Nose, 1960), succión anal o disección intestinal (Aguado *et al.* 2004), el empleo de cámaras metabólicas

(Smith, 1979), tanques de sedimentación (Allan *et al.* 1999), la simple recolección de las heces fecales, de los tanques de experimentación, con un sifón (Chong *et al.* 2002), entre muchas otras. Estas técnicas, si bien son la mejor forma para estudiar los procesos digestivos, su aplicación puede acarrear ciertas desventajas; por ejemplo, en la técnica de obtención de heces fecales por presión abdominal o “stripping”, una incorrecta metodología resulta en la contaminación de la materia fecal con fluidos fisiológicos y epitelio intestinal, lo que subestima los valores de CDA del nutriente evaluado al aumentar el contenido proteico en las heces (Bureau *et al.* 2002; Chong *et al.* 2002). Así mismo, al forzar la salida de las heces mediante presión abdominal, se pueden contaminar con bolo alimenticio que aún no ha sido completamente digerido y de esta forma, subestimar el CDA. Aunado a los problemas inherentes a las técnicas empleadas para la colecta de heces fecales, los ensayos para evaluar la digestibilidad proteica *in vivo*, por lo regular son experimentos en los que se requieren de largos periodos de tiempo, generalmente son caros, laboriosos y los resultados pueden verse afectados por diversos factores biológicos, ambientales y dietarios (Ezquerria *et al.* 1997; Sugiura, 2000; Biswas *et al.* 2005). Estos inconvenientes destacan la importancia de la evaluación de la digestibilidad proteica de ingredientes o dietas a través de métodos *in vitro*.

Existen distintas metodologías para evaluar la digestibilidad proteica *in vitro*, las cuales varían en el tipo de enzimas empleadas, las condiciones de hidrólisis y la forma de cuantificar los productos generados por la digestión (Ezquerria-Brauer, 1997). La mayoría tratan de reproducir el ambiente bioquímico y fisiológico (pH, temperatura, tiempo de residencia intestinal, secuencia enzimática) presente en el tracto gastrointestinal del organismo bajo estudio (Grabner, 1985; Bassompierre *et al.* 1997; Moyano y Savoie,

2001). Para evaluar si los resultados generados por los ensayos *in vitro* describen y predicen correctamente los procesos digestivos reales, comúnmente se correlacionan con los valores de CDA obtenidos de ensayos *in vivo*.

La digestibilidad proteínica *in vitro* puede ser determinada mediante distintos métodos analíticos que pueden ser englobados en dos sistemas principales: Los sistemas cerrados de digestión y los sistemas abiertos de digestión.

a). Sistemas cerrados de digestión

Este tipo de sistemas se basan en la detección temprana de protones liberados después de la ruptura de enlaces peptídicos y la liberación de nitrógeno libre (Moyano y Savoie, 2001). Entre los sistemas cerrados se encuentran los ensayos más simples, como el método del pH-Drop, en el cual, la caída del pH, como consecuencia de la producción de H^+ por el rompimiento de los enlaces peptídicos de las proteínas bajo la acción de enzimas proteolíticas, está positivamente relacionada con el grado de digestión proteínica (Lazo *et al.* 1998; Lazo y Davis, 2000). Sin embargo, el pH-Drop tiene distintas limitantes, la principal es que durante la reacción el pH no es constante, por lo que existe la posibilidad de que las enzimas digestivas comiencen a trabajar en un pH que no se encuentre dentro de su intervalo óptimo. Así mismo, el decaimiento del pH durante la reacción de digestión se ve afectado por la capacidad amortiguadora de las proteínas (Ezquerria-Brauer, 1997; Ezquerria *et al.* 1998). Distintos trabajos en salmónidos (Dong *et al.* 1993; Dimes y Haard, 1994), en peces disco *Symphysodon aequifasciata* (Chong *et al.* 2002) y camarones peneidos (Ezquerria-Brauer, 1997), han demostrado que este método sobreestima la

digestibilidad en algunas muestras proteicas con bajos CDA y subestima algunas que fueron altamente digeridas *in vivo*.

El método del pH STAT es otro sistema cerrado en el cual se monitorea el curso de una reacción química en la que cada enlace peptídico es hidrolizado por una o varias enzimas. Para la realización de este método se utiliza un autotitulado que cuantifica el progreso de la hidrólisis titulando los protones liberados con una solución alcalina que por lo general es hidróxido de sodio 0.1 N (Brocklehurst, 1992; Navarrete-del-Toro y García-Carreño, 2002). Las principales ventajas de este método son: (1) mantener a la enzima dentro de un pH óptimo, lo que también evita que la proteína se desnaturalice por cambios bruscos de pH; (2) es sensible a la presencia de inhibidores de proteasas digestivas en los ingredientes evaluados, principalmente inhibidores tripsínicos (García-Carreño *et al.* 1997; Lemos *et al.* 2000; Lemos *et al.* 2004) y otros factores antinutricionales como el ácido fítico (Barros *et al.* 2002), y (3) mide directamente el porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados durante la reacción y los expresa como grado de hidrólisis (GH) (Navarrete-del-Toro y García-Carreño, 2002).

Los valores de GH obtenidos mediante la técnica del pH STAT se han correlacionado alta y significativamente con valores de CDA proteica en trabajos con moluscos gasterópodos como el abulón sudafricano *Haliotis midae* (Shipton y Britz, 2002), camarones peneidos (Ezquerria *et al.* 1997, 1998; Lemos *et al.* 2000; Nieto-López *et al.* 2005), peces dulceacuícolas como la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* y otros salmónidos (Dong *et al.* 1993; Dimes *et al.* 1994; Dimes y Haard, 2004) y peces marinos como la dorada *Sparus aurata* y el dentón *Dentex dentex* (Alarcón, 1997).

Por lo general, el empleo de la técnica del pH STAT se realiza simulando únicamente la parte alcalina intestinal, empleando cócteles multienzimáticos de proteasas comerciales (Hsu *et al.* 1977; Saterlee *et al.* 1979; Lazo *et al.* 1998) o extractos enzimáticos intestinales o de los ciegos pilóricos de los organismos bajo estudio; sin embargo, en algunos casos se simula una etapa de predigestión ácida (p. ej. en juveniles) utilizando pepsina comercial o extractos enzimáticos estomacales (Moyano y Savoie, 2001), con lo que se puede incrementar el valor final del GH y en algunos casos se llegan a observar correlaciones mas altas y significativas con los valores de CDA (Alarcón *et al.* 2002).

La principal desventaja del pH STAT es que su aplicación está restringida a enzimas con actividad a pH alcalino, dado que a valores extremos de pH tales como 3.0 u 11.0, la capacidad amortiguadora de una proteína es alta, volviendo al método del pH STAT inoperable (Navarrete-del-Toro, 1999). Así, esta técnica es inadecuada para evaluar la hidrólisis proteica por enzimas con actividad a pH ácido, como la pepsina. No obstante, al evaluar la digestibilidad de fuentes proteicas con potencial para la elaboración de microdietas compuestas para larvas de peces marinos, esta desventaja no es un inconveniente, si consideramos que durante las etapas larvarias tempranas sus niveles de actividad proteolítica de tipo ácido son bajos y comúnmente nulos (Zacarías-Soto, *et al.* 2006). Otra desventaja del pH STAT es que no es un método adecuado para evaluar fuentes proteicas que hayan sido parcial o completamente hidrolizadas, ya que la presencia de aminoácidos libres y polipéptidos de cadenas cortas en estos ingredientes reducen los sustratos para algunas enzimas (principalmente endopeptidasas), esto es, hay menos enlaces peptídicos que hidrolizar (Córdova-Murueta, *et al.* 2002), lo que podría llegar a subestimar algunas dietas que por estar previamente hidrolizadas son altamente digeribles.

Otros métodos cerrados desarrollados para evaluar la digestibilidad *in vitro* de fuentes proteicas en peces y crustáceos, se basan en la medición de aminoácidos específicos tales como la D,L alanina (Bassompierre *et al.* 1997; Rungruangsak-Torrissen *et al.* 2002) y la leucina, (Divakaran *et al.* 2004) o aminoácidos totales liberados después de un proceso de digestión enzimática (Lindner *et al.* 1995); el peso de materia seca no digerible y su contenido de nitrógeno o proteína (Carter *et al.* 1999; García-Ortega *et al.* 2000; Chong *et al.* 2002); el porcentaje de nitrógeno en la fracción soluble después de la acción enzimática (Tonheim *et al.* 2007); y la absorbancia a 280 nm de la fracción soluble después de la precipitación con ácido tricloroacético (Lan y Pan, 1993).

b). Sistemas abiertos de digestión

Los sistemas abiertos de digestión son aquellos que analizan los productos de la digestión (nitrógeno soluble, aminoácidos libres y oligopéptidos) que constantemente son removidos empleando membranas de permeabilidad específica. Si bien, los sistemas de digestión cerrados tienen la ventaja de ser más baratos y generar resultados rápidamente, son poco discriminantes y sensibles y además las enzimas digestivas pueden ser inhibidas por los productos generados durante la digestión y que no son removidos (Moyano y Savoie, 2001). Las ventajas de los sistemas abiertos, además de extraer de las celdas de digestión los productos potencialmente inhibidores, evalúan la cinética de la digestión, simulan de manera adecuada los procesos de absorción que ocurren en el intestino de un pez y mantienen estable el pH, debido a la continua remoción y renovación del buffer en el sistema (Bassompierre *et al.* 1997).

III. OBJETIVOS

1. Evaluar la digestibilidad proteica *in vitro* de ingredientes dietarios potenciales empleando extractos enzimáticos digestivos de larvas del lenguado de California (*Paralichthys californicus*) de diferentes estadios de desarrollo e identificar las fuentes proteicas adecuadas para cada etapa de desarrollo.
2. Comparar la digestibilidad proteica *in vitro* de tres dietas experimentales con diferentes relaciones energía:proteína (E:P) empleando un método electroquímico (pH STAT) y uno espectrofotométrico, con los indicadores de desempeño obtenidos en un ensayo de crecimiento con juveniles de lenguado de California (*Paralichthys californicus*).

IV. HIPÓTESIS

1. La digestibilidad proteica *in vitro* de ingredientes alimenticios varía de manera significativa durante la ontogenia del sistema digestivo del lenguado de California (*P. californicus*), lo que conlleva a la posibilidad de elaborar dietas compuestas estadio-específicas.
2. La digestibilidad proteica *in vitro* empleando extractos enzimáticos predice significativamente los indicadores de desempeño de crecimiento *in vivo* en juveniles del lenguado de California (*P. californicus*).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Digestibilidad proteica *in vitro* de ingredientes y alimentos vivos durante la ontogenia del lenguado de California (*Paralichthys californicus*)

V.1.1. Crianza larvaria del Lenguado de California (*P. californicus*)

Se obtuvieron huevos fértiles de lenguado de California (*P. californicus*) provenientes de desoves de reproductores mantenidos en cautiverio en las instalaciones del Hubbs-Sea World Research Institute (San Diego, CA.). Los huevos fueron transferidos en agua de mar dentro de bolsas de plástico a 20 °C y sin aireación, a las instalaciones del Laboratorio Húmedo del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE; Ensenada, B.C.).

Los huevos viables fueron separados del resto, gracias a la flotabilidad positiva que los mantiene en la capa subsuperficial de la columna de agua y posteriormente se sembraron en recipientes de plástico con capacidad de 2 L a una densidad de 2000 huevos L⁻¹, en agua de mar a una temperatura promedio de 20 ± 1 °C, sin aireación.

Las larvas eclosionadas fueron liberadas en 18 tanques cilíndricos de fibra de vidrio con una capacidad de 275 L, en un sistema de recirculación semicerrada, se mantuvo una densidad aproximada de 20 larvas L⁻¹ en cada tanque.

La crianza larvaria del lenguado de California se realizó a una temperatura del agua de 19 ± 1 °C, una concentración de oxígeno disuelto de 7 mg L⁻¹ y a una salinidad de 35 ‰ (Gisbert *et al.* 2003). El agua de mar en el sistema de recirculación semicerrado fue tratada continuamente pasándola a través de un biofiltro expandible de partículas de plástico o “beads”, un filtro mecánico de 10 µm para eliminar partículas suspendidas en el agua, un

filtro de carbón activado y una lámpara de luz UV para eliminar toda clase de microorganismos que pudiesen llegar a ser patógenos para las larvas.

El fotoperíodo empleado durante los primeros 15 días después de la eclosión (DDE) fue de 24 horas de luz continua, esta estrategia da como resultado la aceleración del crecimiento larvario como consecuencia de la alimentación continua por parte de las larvas (Lazo-Corvera, comunicación personal). Después de esta fecha, el fotoperíodo fue de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad durante todo el periodo de cultivo larval.

Siguiendo el protocolo descrito por Zacarías-Soto *et al.* (2006), a partir de día 3 DE las larvas fueron alimentadas dos veces a día (10:00h y 14:00h) con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) mantenidos con pasta de microalgas *Nannochloropsis* sp. (Instant Algae™; Campbell, CA, USA) y previamente enriquecidos durante 12 horas con una emulsión de Algamac 3050™ (Aquafauna Bio-Marine Inc.). Para el enriquecimiento se utilizó una ración de 300 mg de Algamac 3050™ por cada millón de rotíferos. En los tanques de cultivo se mantuvo una concentración continua de 5 rotíferos mL⁻¹ durante los primeros días y posteriormente se incrementó la densidad hasta llegar a 7 rotíferos mL⁻¹ a los 17 DDE.

Entre los 15 y 42 DDE las larvas de lenguado fueron alimentadas con nauplios de *Artemia* sp. (Salt Creek, UT, USA) enriquecidos de igual manera con una emulsión de Algamac 3050™ con un protocolo de enriquecimiento similar al empleado con los rotíferos. En los tanques de cultivo se mantuvo una densidad de 5 artemias mL⁻¹. Entre los 15 y 18 DDE las larvas fueron coalimentadas con rotíferos y nauplios de *Artemia*.

Dado que los rotíferos y nauplios de *Artemia* son deficientes en ácidos grasos altamente insaturados (HUFA's, por sus siglas en inglés) de la serie ω -3, con respecto al

requerimiento de las larvas, se realizó el enriquecimiento con el protocolo desrito anteriormente.

El destete progresivo de las larvas se realizó a partir del 36 DDE (Muguet, 2004; Zacarías-Soto *et al.* 2006). Para esto se utilizó la dieta comercial Otohime™ (Reed Mariculture, Japón), cuyo tamaño de partícula dependió de la apertura bucal de la larva. El suministro de *Artemia* a los tanques de cultivo finalizó 41 DDE.

V.1.2. Toma de muestras

La toma de muestras se realizó a los 9, 15, 26, 39 y 51 DDE, el número de individuos recolectados estuvo relacionado con la longitud estándar (Figura 1). En cada uno de estos días se recolectaron larvas de al menos tres tanques diferentes del sistema de cultivo. Los días de muestreo indicados corresponden a las transiciones dietarias rotífero-artemia, artemia-dieta compuesta y durante el periodo en el cual se alimentó a las larvas con una sola dieta. Así mismo, se consideraron estos días del cultivo larvario con la finalidad de evaluar si los principales cambios morfológicos (diferenciación de las glándulas gástricas, regionalización del estómago e inicio y final de la metamorfosis) y enzimáticos (aparición de la actividad proteolítica ácida) que se observan durante la ontogenia del sistema digestivo (Gisbert *et al.* 2003; Muguet, 2004; Álvarez-González *et al.* 2006; Zacarías-Soto *et al.* 2006), tienen un efecto sobre la digestibilidad proteica *in vitro* de los ingredientes.

Una vez que las larvas fueron recolectadas de los tanques de cultivo, se mantuvieron durante una hora sin alimento con la finalidad de que asimilaran o defecaran las partículas alimenticias presentes en su tracto digestivo (Zacarías-Soto *et al.* 2006). Posteriormente, las

larvas fueron sedadas con una solución de metanosulfonato de tricaina (MS-222). Posteriormente fueron colocadas en viales de plástico, congeladas instantáneamente con hielo seco (CO₂ congelado) y almacenadas a una temperatura de -50 °C hasta su próximo análisis.

En cada muestreo, se registró la longitud estándar (LE) de 30 organismos en un microscopio estereoscópico equipado con una regilla micrométrica (Wild-Heerbrugg, Suiza) para posteriores comparaciones y se clasificó su estadio de desarrollo larvario de acuerdo a las descripciones de Gisbert *et al.* (2003).

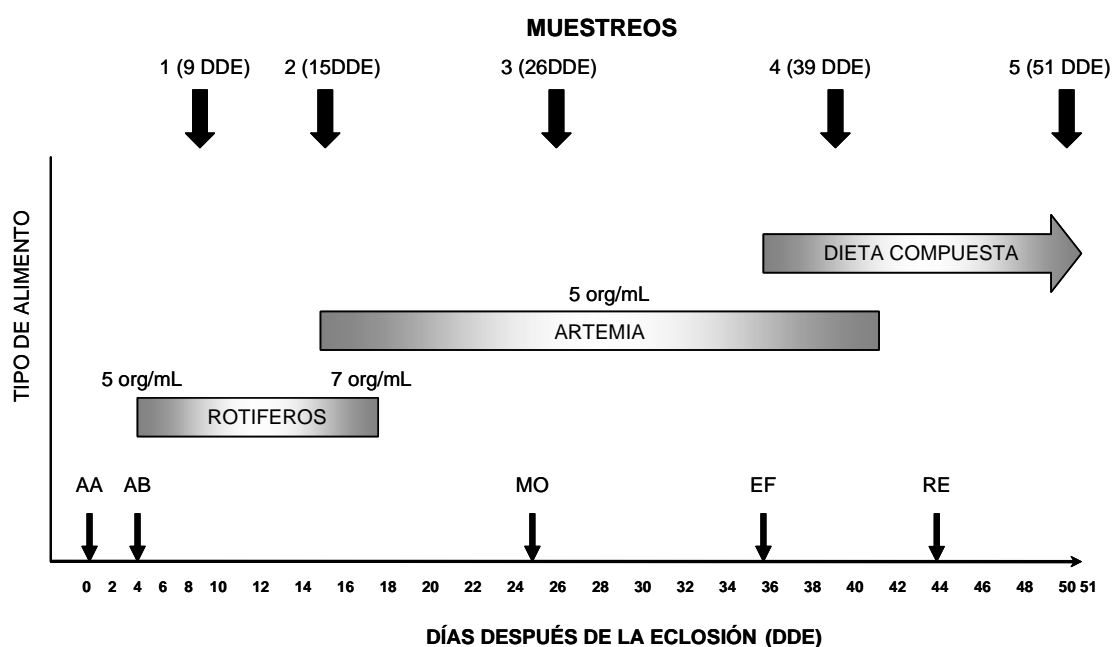


Figura 1. Protocolo de alimentación y toma de muestras durante el larvicultivo del lenguado de California (*Paralichthys californicus*). Se indican los principales eventos que tienen lugar durante el desarrollo del sistema digestivo. AA: Actividad proteasa alcalina. AB: Apertura bucal. MO: Migración ocular e inicio de la metamorfosis. EF: Estómago funcional. RE: Regionalización del estómago.

V.1. 3. Métodos analíticos

V.1.3.1. Extracción de enzimas digestivas

Las larvas de los muestreos 1 (9 DDE), 2 (15 DDE) y 3 (26 DDE), fueron homogenizadas completamente para la extracción enzimática dado a su pequeño tamaño y la gran cantidad larvas necesarias para los análisis enzimáticos. Para las larvas de los muestreos 4 (39 DDE) y 5 (51 DDE), los sistemas digestivos de las larvas fueron disecados, eliminando la mayor cantidad de tejido no digestivo para evitar subestimaciones o sobreestimaciones de la actividad proteolítica (Valverde-Chavarría, 2002). Toda extracción fue realizada a una temperatura no mayor a 4 °C.

Para la extracción de las enzimas digestivas se emplearon las técnicas descritas por Alarcón *et al.* (1999), Lazo (1999), Alarcón *et al.* (2002), Valverde-Chavarría (2002) y Zacarías-Soto *et al.* (2006). Los sistemas digestivos y en su caso las larvas completas, fueron homogenizadas en 1.5 mL de agua desionizada a una temperatura aproximada a 0 °C. Una vez homogenizados, los tractos digestivos, se centrifugaron a 16000 g a 4 °C por 30 minutos. El sobrenadante obtenido se almacenó a -50 °C hasta ser utilizado en los análisis enzimáticos.

V.1.3.2. Actividad proteolítica

V.1.3.2.1. Selección del pH adecuado para la cuantificación de la actividad proteolítica alcalina y posteriores pruebas de digestibilidad *in vitro*

El efecto del pH sobre la actividad proteolítica alcalina de las larvas se evaluó a una temperatura de 37 °C en cuatro diferentes pH's ligeramente alcalinos (7.12, 7.52, 7.91 y 8.7), empleando una solución amortiguadora de Trizma Base-HCl 50 mM. La actividad se

cuantificó de acuerdo a la metodología que se describe en el siguiente apartado. Pero reportándose como actividad relativa (%), que se calculó mediante la división de cada una de las actividades registradas entre aquella que obtuvo el mayor nivel y multiplicada por 100.

V.1.3.2.2. Cuantificación de la actividad proteolítica alcalina de los extractos enzimáticos

La actividad proteolítica alcalina total de los extractos enzimáticos obtenidos, fue cuantificada empleando caseína como sustrato de acuerdo al método de Kunitz (1947), modificado por Walter (1984) y empleado en peces marinos por Alarcón (1997). La reacción se inició añadiendo 500 μL de caseína al 0.5% en una solución amortiguadora 50 mM Trizma Base-HCl, 10mM CaCl_2 , pH 8.0 a 10 μL de extracto enzimático. La reacción se incubó durante 30 minutos a 37 °C y se detuvo mediante la adición de 250 μL de una solución de ácido tricloroacético al 20%. Después de reposar la mezcla por 30 minutos a 4 °C, se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos a 22 °C. Los sobrenadantes fueron separados y se registró su absorbancia a una longitud de onda (λ) de 280 nm con un espectrofotómetro UV/VIS (Jenway, UK). Para el uso de blancos como control, se añadió el ácido tricloroacético antes que el sustrato con la finalidad de inactivar la enzima. Estos análisis se realizaron por triplicado.

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μg de tirosina por minuto empleando un coeficiente de extinción molar de la tirosina de 0.005 $\text{mL } \mu\text{g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Alarcón *et al.* 2002). La actividad proteolítica

alcalina se presentó como actividad total (U / Larva) y como actividad específica (U / mg Proteína soluble), empleando las ecuaciones (1) y (2):

a). Actividad total:

$$U / Larva = \frac{[\Delta \text{ Abs}_{280 \text{ nm}} \times \text{Volumen final}_{\text{Reacción}} (\text{mL})]}{[\text{CEM}_{\text{Tirosina}} \times \text{Tiempo (min)} \times \text{Volumen del extracto (mL)}]} \quad (1)$$

Número de larvas homogenizadas / mL

En donde, $\Delta \text{ Abs}_{280 \text{ nm}}$ es el incremento de absorbancia a 280 nm; Volumen final Reacción , es el volumen final de la reacción (0.76 mL); y, $\text{CEM}_{\text{Tirosina}}$, es el coeficiente de extinción molar de la tirosina de $0.005 \text{ mL } \mu\text{g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Alarcón *et al.* 2002).

b). Actividad específica:

$$U / \text{mg Proteína soluble} = \frac{U / Larva}{\text{mg Proteína soluble} / Larva} \quad (2)$$

V.1.3.3. Cuantificación de la proteína soluble de los extractos enzimáticos

La proteína soluble de los extractos fue determinada empleando la técnica de Bradford (1976). A 20 μL del extracto enzimático se le añadió 1 mL de reactivo Bradford (Quick Start™ BIO RAD; Hércules, CA). Tras un periodo de incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se registró la absorbancia a 595 nm de la mezcla de reacción. Se empleo agua destilada en lugar del extracto enzimático como blanco.

La concentración de proteína soluble en los extractos enzimáticos se calculó ajustando la absorbancia corregida a una ecuación (3) realizada a partir de una recta de

calibración, en la que se emplearon diferentes diluciones de una solución estándar de albúmina sérica de bovino (BIO RAD; Hércules, CA) a una concentración de 1.41 mgmL⁻¹.

$$\text{Proteína soluble (mg mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Absorbancia corregida} - 0.036}{0.4212} \quad (r^2 = 0.9938) \quad (3)$$

V.1.3.4. Evaluación de la digestibilidad proteica *in vitro* ontogénica de ingredientes con potencial para la elaboración de dietas para larvas de lenguado de California

V.1.3.4.1. Selección de los ingredientes evaluados

Los principales aspectos que fueron considerados para seleccionar los ingredientes a evaluar fueron: (1) sus características nutricionales; (2) su fácil obtención en la región; y (3) su digestibilidad reportada con distintas especies marinas. Adicionalmente se evaluó la digestibilidad *in vitro* de alimentos vivos liofilizados, dado que el empleo de estos durante el larvicultivo genera buenos resultados en términos de supervivencia y crecimiento. En la Tabla I se detallan los ingredientes y alimentos vivos seleccionados para el presente estudio.

Tabla I. Ingredientes y alimentos vivos evaluados en el presente estudio y su origen.

FUENTE PROTEICA	ORIGEN
Caseína	Sigma-Aldrich Chemicals, St Louis, MO. USA.
Harina de pescado	Silver cup, USA.
Harina de pescado	Omega protein, USA.
Harina de calamar	Calamar liofilizado proveniente de pesquerías locales.
Harina de krill	Skretting, Vancouver, Canadá.
Harina de soya desgrasada ¹	PADSA, México.
Harina de gluten de trigo	Giusto's Vita-Grain. CA, USA.
Artemia liofilizada	Salt Creek, UT, USA.
Rotíferos liofilizados	Rotíferos cultivados en instalaciones de la UABC y enriquecidos

¹ Los lípidos fueron extraídos según el método de Bligh y Dyer (1959) empleando una solución de cloroformo:metanol (1:2).

V.1.3.4.2. Análisis proximal y cuantificación de la proteína soluble de los ingredientes

El contenido de proteína cruda de los ingredientes y alimentos vivos fue cuantificado utilizando el método Kjeldahl (1883) (factor de conversión de 6.25). El contenido de lípidos totales fue calculado empleando el método de Folch *et al.* (1957). La humedad presente en los ingredientes y alimentos vivos se cálculo registrando la pérdida de peso de las muestras tras un proceso de secado a una temperatura de 100 °C por 24 horas (AOAC, 1990). Las cenizas fueron cuantificadas después de la ignición a una temperatura de 480 °C por 6 horas (AOAC, 1990). El extracto libre de nitrógeno (E.L.N.) fue calculado por diferencia de acuerdo a la siguiente ecuación (4).

$$\text{E.L.N.} = 100\% - (\% \text{ Proteína cruda} + \% \text{ Lípidos} + \% \text{ Humedad} + \% \text{ Cenizas}) \quad (4)$$

Para cuantificar la proteína soluble presente en los ingredientes, las harinas fueron tamizadas a 120 μm y disueltas en agua destilada manteniendo una concentración de 8 mg de proteína cruda mL^{-1} en un pH de 8.0 a 37 °C. Una vez estabilizado el pH, se tomo una alícuota de 2mL de la solución y se centrifugó a 16000g por 15 minutos a una temperatura de 22 °C. Se colectó el sobrenadante y el precipitado fue desechado. La proteína soluble presente en los sobrenadantes fue determinada siguiendo la metodología descrita en la sección V.1.3.3.

V.1.3.4.3. Evaluación de la digestibilidad *in vitro* de los ingredientes

La digestibilidad proteica *in vitro* de los ingredientes se evaluó por el grado de hidrólisis (GH), empleando la técnica electroquímica del pH-STAT y usando enzimas

digestivas previamente extraídas de larvas, siguiendo las recomendaciones de Brocklehurst (1992) y Navarrete del Toro y García-Carreño (2002) y las experiencias de Dimes y Haard (1994) con salmónidos, Alarcón (1997) con larvas de peces marinos y Ezquerro-Brauer (1997) y Córdova-Murueta y García-Carreño (2002) con camarones peneidos.

El proceso de la reacción de hidrólisis fue cuantificada en un titulador automático pH STAT 718 Stat Titrino™ (Metrohm Ion Analysis, Suiza).

Los ingredientes evaluados fueron molidos y tamizados a menos de 120 μ m, y posteriormente homogeneizados con agua destilada. Se utilizaron 80 mg de proteína de cada ingrediente a evaluar y se ajustó la masa de agua utilizada para que la masa de reacción final fuese de 10 g, incluyendo el extracto enzimático (sustrato + agua + enzima = 10g). Siguiendo la metodología de Córdova-Murueta y García-Carreño (2002), el pH de la mezcla de reacción se ajustó a 7.9 con NaOH 0.1 N. El vaso de reacción fue colocado en el titulador automático, se mantuvo una agitación constante, sin introducir burbujas de aire para evitar sobreestimaciones a causa de la introducción de CO₂ atmosférico a la reacción. La temperatura se mantuvo constante a 37 °C. Para iniciar la reacción de digestión *in vitro*, el titulador llevó automáticamente el pH a 8.0 y se agregaron 30 unidades de actividad enzimática de los extractos digestivos de las larvas de lenguado.

El pH de la mezcla de reacción comenzó a descender debido a la liberación de protones (H⁺) como consecuencia del rompimiento de enlaces peptídicos. Una vez que el pH desciende, el titulador detecta el cambio e instantáneamente comienza a agregar NaOH 0.1 N con una microbureta para mantener el pH de la reacción en 8.0. El volumen de NaOH añadido fue cuantificado continuamente hasta los 90 minutos.

El porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados conocido como grado de hidrólisis proteico (GH) del sustrato se calculó a partir de la siguiente ecuación (Navarrete del Toro y García-Carreño, 2002):

$$GH = B \times N_B \times 1/\alpha \times 1/M_P \times 1/h_{tot} \times 100\% \quad (5)$$

En donde B es el volumen (mL) del NaOH usado para mantener el pH en 8.0 durante el tiempo de reacción determinado; N_B es la normalidad de la base que para el presente trabajo es de 0.1 N; α es el grado promedio de disociación de los grupos α -aminoácidos liberados durante la hidrólisis, determinado por la ecuación $\alpha = (10^{pH - pK}) / (1 + 10^{pH - pK})$ donde los valores de pK son dependientes de la temperatura y tamaño del péptido (Navarrete del Toro y García-Carreño, 2002). Por lo tanto, el valor de $1/\alpha$ es el factor de calibración de α para el pH STAT, que de acuerdo a Adler-Nissen (1986) a un pH de 8.0 y una temperatura de reacción cercana a 40 °C, $1/\alpha = 1.20$; M_P es la masa de proteína cruda en la mezcla de reacción, estimada al multiplicar la concentración de nitrógeno (N) obtenido por el método Kjeldahl (1883) por un factor de conversión adecuado (f_N); y h_{tot} es el contenido total de enlaces peptídicos en la proteína, el cual es expresado como equivalentes de enlaces peptídicos por kilogramo (o miliequivalente por gramo) (Tabla II). Cuando h_{tot} es desconocido, 8.0 meq/g es una buena aproximación (Adler-Nissen, 1986).

Para determinar los valores de autohidrólisis o líneas base en los ingredientes, se uso la metodología descrita previamente, únicamente los extractos enzimáticos digestivos larvarios fueron reemplazados por un volumen similar de agua destilada. Los valores de GH fueron expresados como un porcentaje de aquellos obtenidos al emplear los extractos enzimáticos digestivos (Alarcón *et al.* 2002).

Cada determinación fue realizada por triplicado para cada uno de los días de muestreo.

Tabla II. Contenido de enlaces peptídicos para algunas de las fuentes proteicas empleadas en el presente estudio (Adler-Nissen, 1986).

ORIGEN DE LA PROTEÍNA	h_{tot} en meq / g
Caseína	8.2
Pescado	8.6
Soya	7.8
Gluten de trigo	8.3

V.2. Comparación de la digestibilidad proteica *in vitro* de dietas experimentales con diferentes relaciones Energía:Proteína (E:P) en juveniles de lenguado de California (*P. californicus*) cultivados en diferentes temperaturas

V.2.1. Obtención de los sistemas digestivos de los juveniles de lenguado de California (*P. californicus*)

Los sistemas digestivos de los juveniles de lenguados de California (*P. californicus*) fueron obtenidos de un experimento de crecimiento que evaluó tres dietas con diferentes niveles de energía (19, 20 y 21 KJ por cada 100 g de dieta) en dos diferentes temperaturas de cultivo (20 y 25 °C), durante 56 días (Galaviz-Espinoza, 2007).

Para la evaluación biológica de las dietas se usaron 18 tanques de fibra de vidrio con capacidad de 180 L cada uno suministrados con agua de mar a 35 ‰. La mitad de los tanques se mantuvieron a una temperatura de $20 \pm 1.7^{\circ}\text{C}$ y la otra a $25 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$.

Durante el experimento, los juveniles de lenguado fueron alimentados tomando en consideración una ración alimenticia equivalente al 5% del peso húmedo corporal individual promedio de los organismos. Las tres dietas isoproteicas (Tabla III) se formularon usando harina de músculo de pescado como principal fuente de proteína.

Tabla III. Composición de ingredientes de las dietas experimentales (% del peso seco) evaluadas en el presente estudio y su análisis proximal (Bajo permiso de Galaviz-Espinoza, 2007).

INGREDIENTES	DIETA 1	DIETA 2	DIETA 3
Harina de músculo de pescado ¹	45	45	45
Harina de krill ²	7.9	7.9	7.9
Aceite de pescado	8.0	10	12.1
Almidón	9.0	10.5	11.5
Celulosa	13.8	10.3	7.2
Ensilaje ³	5.0	5.0	5.0
Gelatina	5.0	5.0	5.0
Minerales ⁴	3.0	3.0	3.0
Vitaminas ⁵	3.0	3.0	3.0
Colina	0.3	0.3	0.3
α - Tocoferol	0.01	0.01	0.01
Proteínas (%)	52.44	51.73	50.94
Lípidos (%)	14.98	17.36	19.01
Cenizas (%)	6.94	7.0	7.0
E.L.N. (%)	25.64	23.91	23.05
Energía (KJ)	19.0	20.0	21.0

¹; Harina de pescado elaborada con músculo de *Totoaba* de cultivo.

²; Harina de krill comercial proporcionada por Skretting, Vancouver, Canadá.

³; Ensilaje hecho a partir de vísceras de atún.

⁴; g/kg de mezcla de minerales: KH₂PO₄ (250); KI (0.2); Ca(H₂PO₄)₂(200); MgSO₄, H₂O(100); CuSO₄ 5H₂O (1); CoCl₂. H₂O (0.04); Al(OH)₃ (0.1), MnSO₄ (3); Fe₂(SO₄)₃ (6); ZnSO₄ (5); Na₂Se₂ (0.05) y tierra de diatomeas (432).

⁵; Mezcla de vitaminas proporcionada por Skretting, Vancouver, Canadá.

El experimento se realizó utilizando un diseño bifactorial con tres niveles de energía por dos niveles de temperatura con tres replicas por tratamiento.

A los 56 días de cultivo finalizó el experimento, se registraron los indicadores de rendimiento del cultivo, tales como el porcentaje de supervivencia, el peso final de los organismos, la tasa de eficiencia proteica y la digestibilidad *in vivo* al final del experimento.

V.2.2. Métodos analíticos

V.2.2.1. Extracción y análisis de enzimas digestivas de juveniles de lenguado de California

Los sistemas digestivos de 14 organismos por cada replica (42 sistemas digestivos por cada tratamiento) fueron disecados a una temperatura no mayor de 4 °C, empleando una cama de hielo y mantenidos en congelación hasta su análisis (- 50°C aproximadamente).

La extracción de enzimas digestivas se realizó siguiendo la metodología descrita por Alarcón *et al.* (1999, 2002) y Valverde-Chavarría (2002).

Los sistemas digestivos disecados fueron homogenizados con agua desionizada a 4 °C empleándose una relación de peso-volumen de agua (w:v) de 1:6, esto es, por cada gramo de sistema digestivo se emplearon 6 mL de agua destilada. Los sistemas digestivos homogenizados fueron centrifugados a 16000 g por 30 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes fueron recuperados y almacenados en viales a -50 °C.

La cuantificación de la actividad proteolítica alcalina y la cantidad de proteína soluble en los extractos enzimáticos de los juveniles de lenguado de California se realizó siguiendo la metodología descrita en las secciones V.1.3.2.2. y V.1.3.3., respectivamente.

V.2.2.2. Evaluación de la digestibilidad *in vitro* mediante una técnica espectrofotométrica

La evaluación de la digestibilidad proteica *in vitro* de las dietas experimentales se realizó modificando la metodología propuesta por Lan y Pan (1993).

Las dietas experimentales (Tabla III) molidas y tamizadas a 120 μ m, fueron homogeneizadas con una solución amortiguadora Trizma Base-HCl 50 mM, CaCl₂ 10mM y pH 8.0. Se ajustó la masa de la solución amortiguadora y 80 mg de proteína de cada dieta para que la masa de reacción final fuese de 10 g (con una concentración proteica de 8mg de proteína mL⁻¹), en la que se incluía la enzima (dieta + solución amortiguadora + enzima = 10g).

La reacción se inició añadiendo a los sustratos proteicos (dietas experimentales disueltas en solución amortiguadora), 95 unidades de actividad proteolítica alcalina total de los lenguados de cada uno de los seis tratamientos, tomando en consideración una relación sustrato:enzima (S/E) de 839.7 μ g de proteína U⁻¹ de actividad proteolítica alcalina total. Esta relación S/E fue calculada estimando que para un lenguado de 14.3 g (peso promedio total de los lenguados del presente experimento) se empleó una tasa de alimentación del 4% del peso corporal, con dietas que poseen alrededor del 50% de proteína y tomando en cuenta además, el promedio total de la actividad enzimática de los lenguados del presente estudio.

La reacción se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Para finalizar la reacción, se tomaron 200 μ L de la solución proteica bajo hidrólisis y se colocaron en un vial con 300 μ L de ácido tricloroacético al 10%. Después de reposar la mezcla por 30 minutos a 4 °C, se centrifugó a 19000 g por 5 minutos a 22 °C. Los sobrenadantes fueron separados y se

registró su absorbancia a 280 nm. Para el uso de blancos como control, la enzima fue previamente inactivada con ácido tricloroacético al 10%.

Los análisis se realizaron por triplicado.

De acuerdo a esta metodología, la digestibilidad *in vitro* de las dietas, se reportó como digestibilidad proteica relativa (DPR %), la cual es el resultado de la división de cada una de las unidades de absorbancia registradas entre aquella que obtuvo la absorbancia más alta y multiplicada por 100.

V.2.2.3. Evaluación de la digestibilidad *in vitro* mediante el pH-STAT

La digestibilidad *in vitro* de las dietas experimentales se determinó evaluando el grado de hidrólisis (DH), empleando la técnica electroquímica del pH-STAT y usando enzimas digestivas de los juveniles de lenguados de cada tratamiento, como se describe en la sección V.1.3.4.3, pero iniciando la reacción con 95 unidades de actividad proteolítica alcalina total de los lenguados de cada uno de los seis tratamientos.

V.3. Análisis estadístico de los datos

Se realizó un análisis de regresión lineal para describir la relación existente entre la edad y la longitud estándar de las larvas de lenguado de California y calcular el valor de la tasa de crecimiento específico.

Las posibles diferencias estadísticamente significativas en los datos de los análisis proximales de los ingredientes y actividades enzimáticas de los extractos digestivos de juveniles de lenguados, fueron examinadas por un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía. En el primer experimento, para analizar las posibles diferencias estadísticas de la

digestibilidad proteica *in vitro* durante la ontogenia larvaria se empleó un ANOVA de dos vías bifactorial, teniendo como factores a los ingredientes (9 niveles) y a los días de muestreo (5 niveles). En el segundo experimento, también se empleó una ANOVA de dos vías bifactorial, teniendo como factores a la temperatura de cultivo (2 niveles) y el nivel energético dietario (3 niveles). Previamente a la realización de los ANOVAS, todos aquellos valores expresados como porcentajes fueron transformados con la función arcoseno ($x^{1/2}$), y se realizó la prueba Kolmogorov-Smirnov para evaluar la distribución normal y la prueba de Levene (Bartlett) que evalúa la homogeneidad de varianzas. En aquellos casos en los que se observaron diferencias estadísticamente significativas, se realizó una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey (Zar, 1984).

Por último, se realizó una correlación de Pearson entre los resultados de digestibilidad proteica *in vitro* de las dietas experimentales empleando dos técnicas diferentes y los índices de rendimiento al final del experimento de crecimiento con juveniles de Lenguado de California.

Para todos los casos el nivel de significancia nominal fue de $P < 0.05$. El análisis estadístico se realizó utilizando el software estadístico STATISTICA 6.1™ (StatSoft, Inc. USA).

VI. RESULTADOS

VI.1. Digestibilidad proteica *in vitro* de ingredientes durante la ontogenia digestiva del lenguado de California

VI.1.1. Crecimiento larvario del Lenguado de California (*P. californicus*)

Las larvas crecieron exponencialmente ($r^2 = 0.968$) a partir del 9 DDE, con una longitud estándar (LE) de 4.59 ± 0.27 mm, hasta alcanzar los 15.88 ± 2.94 mm al día 51 DE, con una tasa de crecimiento específico de 0.028 mm d^{-1} (Figura 2). Se realizaron cuatro muestreos durante el periodo larvario y un quinto cuando la mayoría de los organismos se consideraron juveniles tempranos, cuya característica principal es poseer la morfología corporal de un lenguado adulto.

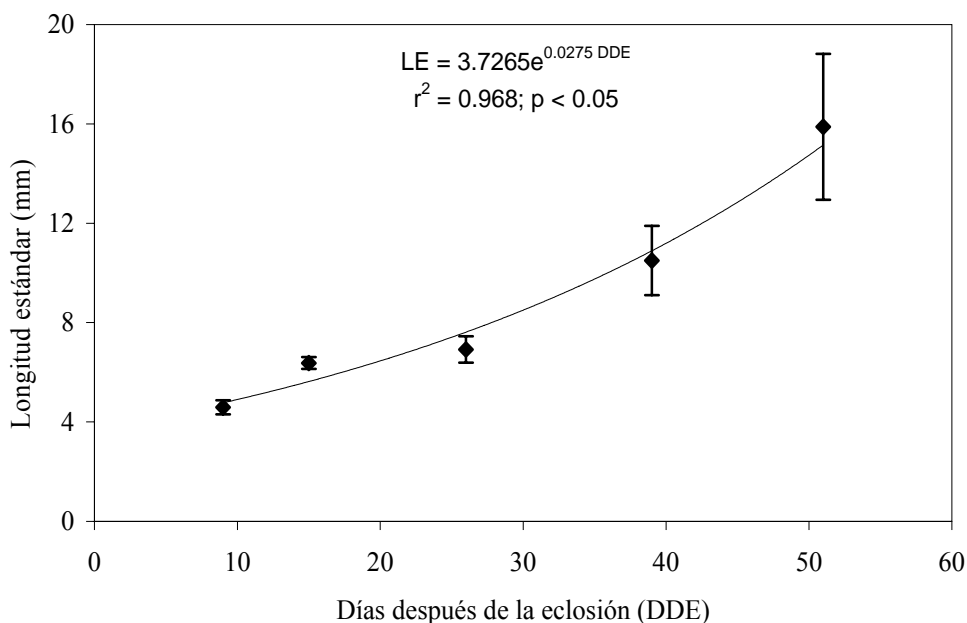


Figura 2. Crecimiento en longitud estándar (LE, en mm) del Lenguado de California (*Paralichthys californicus*) durante el periodo experimental. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ($n = 30$).

La comparación del grado de hidrólisis de los ingredientes a evaluar durante la ontogenia del sistema digestivo del Lenguado de California, se realizó en función tanto de la edad de los organismos como de su estadio larvario (Gisbert *et al.*, 2003) y de su longitud estándar.

VI.1.2. Actividad proteolítica alcalina durante el periodo larvario del lenguado de California

VI.1.2.1 Selección del pH adecuado para la cuantificación de la actividad proteolítica alcalina y posteriores pruebas de digestibilidad *in vitro*

El efecto del pH sobre la actividad proteolítica alcalina total se evaluó dentro de un pH ligera y moderadamente alcalino (7.12, 7.52, 7.91 y 8.7) en tres diferentes días dentro del periodo larvario del lenguado de California: 9 DDE (4.59 ± 0.27 mm LE), 26 DDE (6.92 ± 0.53 mm LE) y 51 DDE (15.88 ± 2.94 mm LE).

La actividad proteolítica alcalina total relativa de las larvas de 9 DDE, tuvo su punto máximo a un pH de 8.0 con una tendencia decreciente conforme el pH se incrementó. En las larvas de 26 DDE, se observó la máxima actividad relativa a un pH cercano al neutro, con una evidente tendencia a disminuir (cerca de un 30% de la actividad alcalina relativa) conforme la alcalinidad se incrementaba. Un efecto inverso se observó al emplear extractos enzimáticos pertenecientes a larvas de 51 DDE; ya que se registró un aumento relativamente lineal conforme se incrementó el pH hasta casi 9.0 (Figura 3).

Tomando en cuenta estos resultados, se consideró emplear un pH de 8.0 para realizar la evaluación de la actividad proteolítica alcalina y para los análisis de digestibilidad proteica *in vitro* de los ingredientes.

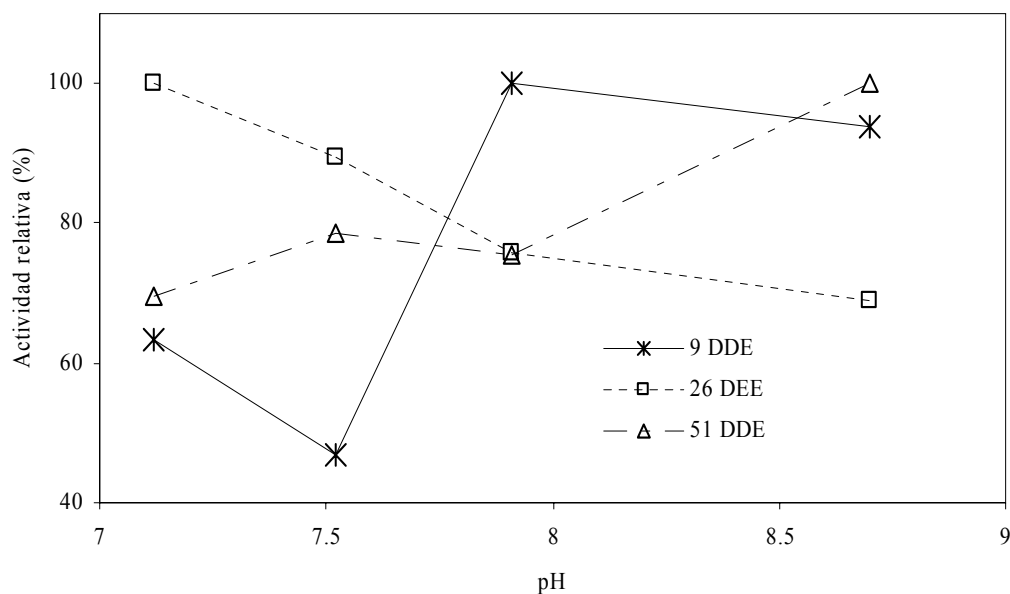


Figura 3. Efecto del pH sobre la actividad relativa proteolítica alcalina (%) de los extractos de lenguado de California, en tres diferentes días de muestreo (9, 26 y 51 DDE).

VI.1.2.2. Actividad proteolítica alcalina medida durante la ontogenia del lenguado de California

La actividad proteolítica alcalina total (U Larva^{-1}) y la actividad específica ($\text{U mg proteína}^{-1}$) de los extractos enzimáticos larvarios empleados en el presente estudio se relacionaron gráficamente con la edad (Figura 4). Adicionalmente, la actividad proteolítica alcalina total se relacionó con la longitud estándar. Se encontró una mayor correlación significativa con el tamaño ($r^2 = 0.9814$, $p < 0.05$) que con la edad de las larvas ($r^2 = 0.9705$, $p < 0.05$).

La actividad proteolítica alcalina total cuantificada los primeros tres días de muestreo se mantuvo relativamente baja y con una tendencia al aumento; con valores de $0.263 \text{ U Larva}^{-1}$ (9 DDE), $0.441 \text{ U Larva}^{-1}$ (15 DDE) y $1.025 \text{ U Larva}^{-1}$ (26 DDE). Pero a los 39 y 51 DDE, esta actividad se elevó drásticamente hasta alcanzar 8.19 y $12.41 \text{ U Larva}^{-1}$ (Figura 4).

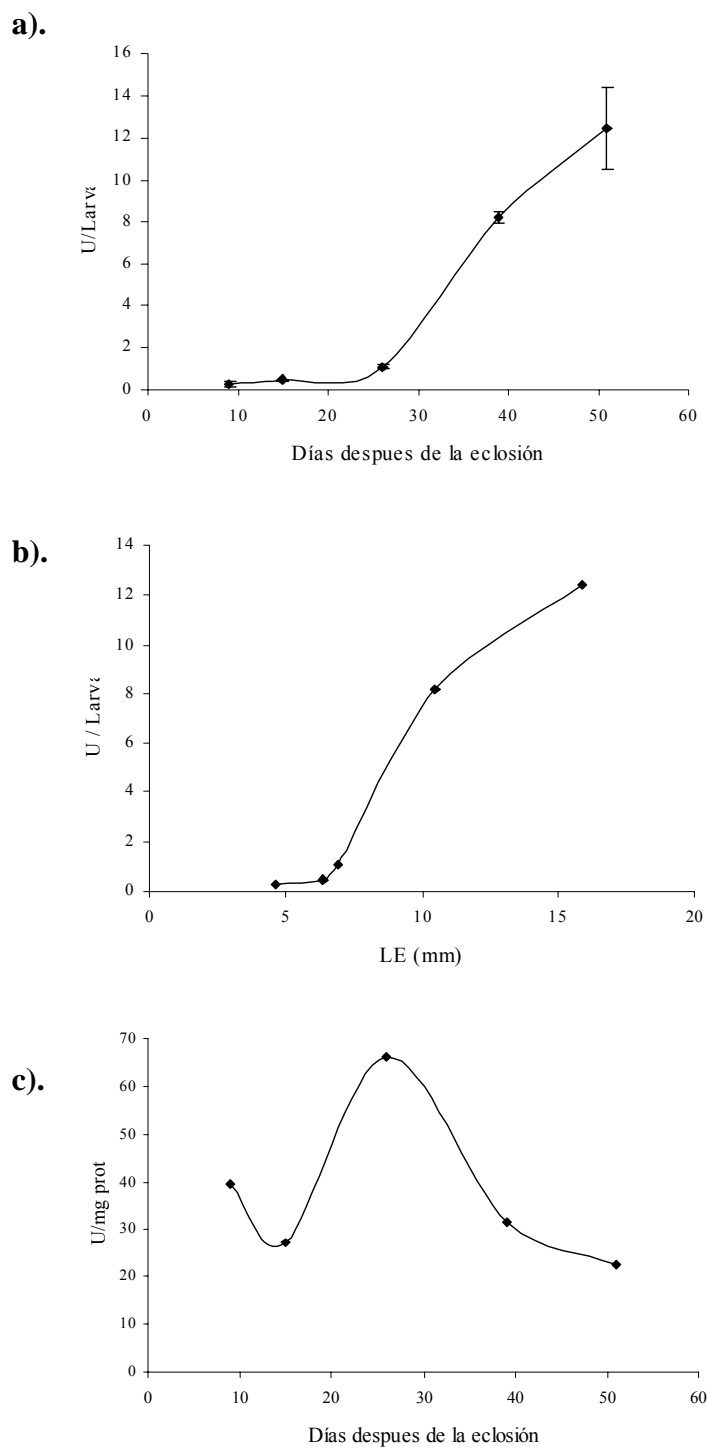


Figura 4. Actividad proteolítica total de larvas de lenguado de California durante los muestreos realizados en el cultivo. a). Actividad total ($U \text{ Larva}^{-1}$) en función de la edad; b). Actividad total en función de la longitud estándar, (LE, mm); c). Actividad específica ($U \text{ mg proteína}^{-1}$) en función de la edad. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ($n = 3$).

VI.1.3. Análisis proximal de los ingredientes evaluados

La Tabla IV presenta el análisis proximal de los ingredientes seleccionados para evaluar en el presente estudio su digestibilidad proteica *in vitro* y así, conocer su potencialidad para la formulación y elaboración de dietas estadio-específicas para el larvicultivo del lenguado de California.

Los niveles proteicos de los ingredientes evaluados variaron de $50.79 \pm 1.42\%$ a 92.70% y se encontraron diferencias altamente significativas entre algunos de los ingredientes ($F = 263.3$; $p < 0.001$). La caseína, una fuente proteica comercial de alta pureza fue la que mayor contenido proteico (92.70%); en cambio los valores proteicos mínimos registrados se obtuvieron con los rotíferos liofilizados y la harina de soya (51.83% y 50.79%), los cuales no fueron significativamente diferentes entre sí (Tabla IV).

Los niveles lipídicos fluctuaron de $5.10 \pm 0.59\%$ a $16.11 \pm 0.85\%$ del peso total de los ingredientes evaluados, existiendo diferencias altamente significativas entre algunos de los ingredientes ($F = 78.23$; $p < 0.001$). El nivel mínimo de lípidos se obtuvo con la harina del gluten de trigo, con un contenido medio de 5.10% que no fue significativamente diferente a la harina de soya (5.88%); mientras que la harina de krill tuvo el valor más alto de contenido lipídico (16.11%) que fue estadísticamente similar a la harina elaborada a partir de rotíferos liofilizados (15.32%). El bajo contenido lipídico registrado en la harina de soya, se debió a que dicha harina fue previamente desgrasada para elevar su contenido proteico.

Los contenidos de cenizas en los ingredientes variaron de $0.49 \pm 0.12\%$ a $18.87 \pm 0.11\%$ del peso seco total, observándose diferencias altamente significativas entre algunos de los ingredientes ($F = 265$; $p < 0.001$). Los niveles más altos de cenizas se cuantificaron

en la harina de pescado Silver cup™ y la harina de rotíferos. El alto contenido de cenizas en la harina de pescado se debió probablemente a la presencia de estructuras óseas y escamas. Mientras que en la harina de rotíferos, el alto contenido de cenizas se debió a las sales marinas residuales, producto de un lavado inadecuado previo al proceso de liofilización (Tabla IV).

Los niveles de humedad en los ingredientes fueron relativamente bajos, variando de $2.37 \pm 0.23\%$ a $6.99 \pm 0.15 \%$ de peso seco total, observándose diferencias altamente significativas entre algunos de los ingredientes ($F = 90.53$; $p < 0.001$).

Los niveles de los extractos libres de nitrógeno (E.L.N.) de los ingredientes evaluados fueron calculados indirectamente por diferencia, siendo nulos para ingredientes de origen animal tales como las harinas de pescado (Silver cup™ y Omega protein™) y la caseína (proteína animal altamente purificada). En cambio, las harinas vegetales (harina de gluten de trigo y la harina de soya) tuvieron los niveles más elevados.

La proteína soluble de los ingredientes, resultante de la disolución de 8 mg de proteína cruda mL^{-1} en agua destilada a un pH de 8.0 a 37°C , mostró una gran variación, fluctuando de 0.010 a 5.459 mg de proteína soluble mL^{-1} , se observaron diferencias altamente significativas entre algunos de los ingredientes ($F = 1432.95$; $p < 0.001$). La caseína fue el ingrediente que mostró la solubilidad más alta ($5.459 \pm 0.22 \text{ mg mL}^{-1}$), significativamente diferente al resto de los ingredientes. En cambio, las harinas de origen animal, como las harinas de pescado (Silver cup™ y Omega protein™), krill y rotíferos liofilizados mostraron las solubilidades más bajas, no se observaron diferencias significativas entre tales ingredientes (Tabla IV).

Tabla IV. Composición proximal (% del peso total) de los ingredientes evaluados en los análisis de digestibilidad ontogénica *in vitro*. Y proteína soluble (mg mL⁻¹) de las fuentes proteicas evaluadas al disolver 8 mg de proteína cruda mL⁻¹ en agua destilada. Extracto libre de nitrógeno (E.L.N.). Proteína soluble (PROT. SOL.). Promedio de tres mediciones ± desviación estándar.

INGREDIENTE	PROTEÍNA (%)	LÍPIDOS (%)	CENIZAS (%)	HUMEDAD (%)	E.L.N. (%)	PROT. SOL. (mg mL ⁻¹) 1)
Caseína	92.7 ^a	–	3.37 ± 1.32 ^f	4.02 ± 0.09 ^d	–	5.459 ± 0.22 ^a
Harina Silver cup TM	76.41 ± 1.14 ^b	9.65 ± 0.62 ^b	11.36 ± 0.31 ^d	5.86 ± 0.29 ^b	–	0.010 ± 0.00 ^e
Harina Omega protein TM	64.97 ± 1.02 ^d	11.32 ± 1.01 ^b	17.75 ± 0.34 ^{a,b}	6.99 ± 0.15 ^a	–	0.005 ± 0.00 ^e
Harina de calamar	76.01 ± 1.02 ^b	9.74 ± 0.28 ^b	5.00 ± 0.34 ^e	2.78 ± 0.44 ^{e,f}	6.47	1.352 ± 0.07 ^c
Harina de krill	65.50 ± 0.09 ^d	16.11 ± 0.85 ^a	12.64 ± 0.01 ^{c,d}	4.93 ± 0.13 ^c	0.82	0.007 ± 0.00 ^e
Artemia liofilizada	61.02 ± 1.21 ^e	11.16 ± 0.86 ^b	15.19 ± 0.23 ^{b,c}	3.88 ± 0.12 ^d	8.75	0.286 ± 0.01 ^d
Rotíferos liofilizados	51.83 ± 0.43 ^f	15.32 ± 1.34 ^a	18.87 ± 0.11 ^a	2.37 ± 0.23 ^f	11.61	0.015 ± 0.01 ^e
Harina de soya	50.79 ± 1.42 ^f	5.88 ± 0.44 ^c	4.57 ± 0.19 ^{e,f}	3.18 ± 0.30 ^e	35.58	1.637 ± 0.04 ^b
Gluten de trigo	72.19 ± 0.92 ^e	5.10 ± 0.59 ^c	0.49 ± 0.12 ^g	4.18 ± 0.19 ^{c,d}	18.04	0.408 ± 0.07 ^d

Valores en la misma columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes a $p < 0.001$.

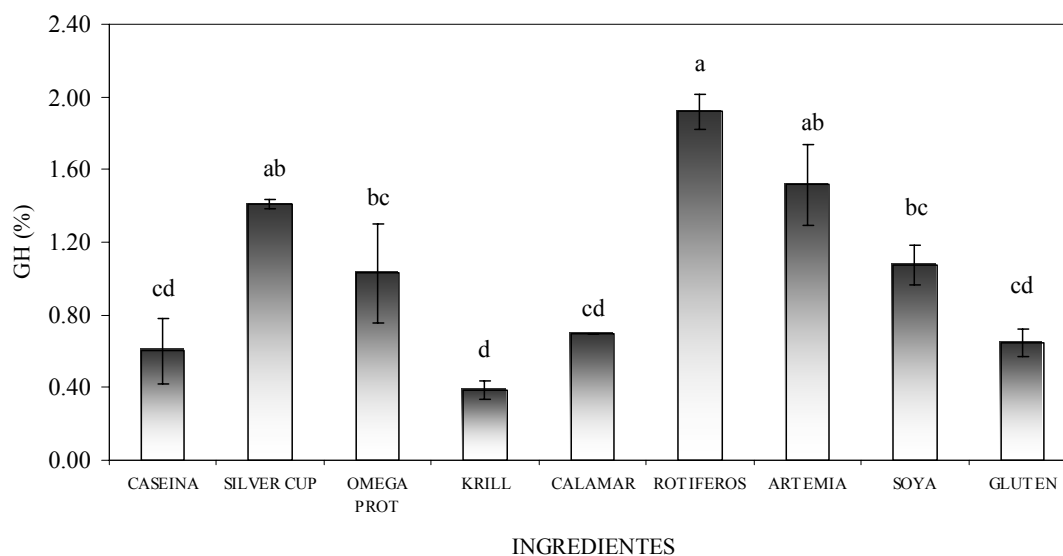
VI.1.4. Digestibilidad proteica *in vitro* de ingredientes alimenticios evaluados durante la ontogenia digestiva del lenguado de California

La digestibilidad proteica *in vitro* de los ingredientes evaluados, calculada en términos de grados de hidrólisis (GH), fue determinada en cinco distintas fechas durante la fase larvaria del lenguado de California.

El GH de los ingredientes evaluados empleando extractos enzimáticos digestivos de las larvas del primer muestreo (9 DDE, estadio C, 4.59 ± 0.27 mm LE) varió de un GH de 0.38% a 1.92%. Se observaron diferencias altamente significativas ($F = 12.76$; $p < 0.001$) entre algunos de los ingredientes en este día (Figura 5, a). El GH más bajo fue el de la harina de krill, cuyo GH no fue estadísticamente diferente a los obtenidos con las harinas de caseína, calamar y gluten de trigo. En cambio, los GH más altos registrados fueron los obtenidos con las harinas de rotíferos liofilizados, la harina de pescado Silver cup TM, la harina de nauplios de artemia liofilizada y la harina de soya.

Así también, se observaron diferencias altamente significativas ($F = 7.17$; $p < 0.001$) en los GH de algunos de los ingredientes evaluados al emplear extractos enzimáticos digestivos provenientes de las larvas del segundo muestreo (15 DDE, estadio D+, 6.37 ± 0.24 mm LE) (Figura 5, b). Los GH para esta edad, variaron de 0.36% a 1.64%. Las harinas elaboradas con rotíferos y nauplios de artemia liofilizados presentaron los GH más altos (1.64% y 1.12%, respectivamente); en cambio, la harina elaborada con krill nuevamente generó el GH más bajo de los ingredientes (0.36%), aunque no fue significativamente diferente al resto de los ingredientes, a excepción de la harina de rotíferos y nauplios de artemia.

a).



b).

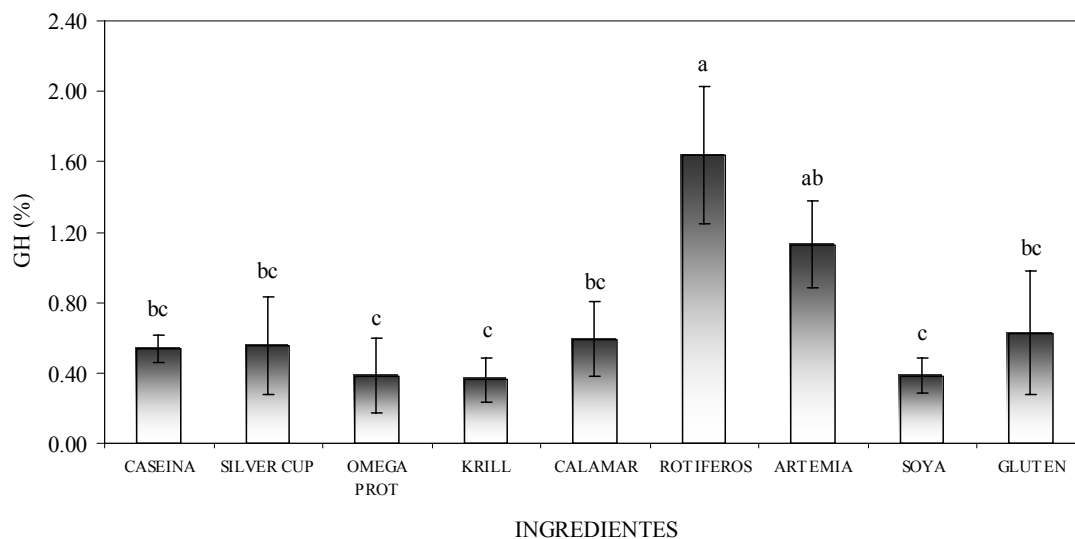
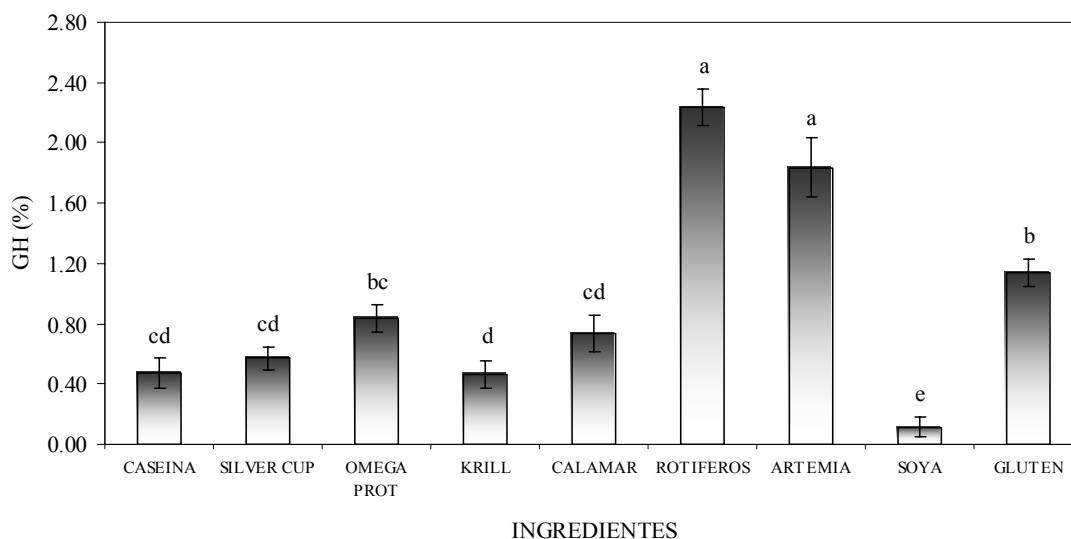


Figura 5. Grado de hidrólisis (GH %) de los ingredientes evaluados empleando extractos enzimáticos digestivos de las larvas pertenecientes al (a). Primer día de muestreo (9 DDE, LE = 4.59 mm); y, (b). Segundo día de muestreo (15 DDE, LE = 6.37 mm). Tiempo de reacción de la hidrólisis: 90 minutos. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n = 3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p < 0.05$.

El GH de los ingredientes evaluados empleando extractos enzimáticos de las larvas del tercer muestreo (26 DDE, estadio G, 6.92 ± 0.53 mm LE) varió de 0.12% a 2.23%; presentándose diferencias altamente significativas entre los GH de algunos de los ingredientes ($F = 83.351$; $p < 0.001$) (Figura 6, a). El grado de hidrólisis para la harina de soya fue el más bajo ($0.115\% \pm 0.067$) y resultó estadísticamente diferente al resto de los ingredientes. En contraste, los grados de hidrólisis obtenidos al emplear como sustratos proteicos a las harinas de nauplios de artemia y rotíferos, fueron los más elevados (1.837% y 2.233%, respectivamente), no hubo diferencias significativas entre dichos ingredientes. El resto de los ingredientes tuvieron grados de hidrólisis intermedios que variaron de 0.47% (harina de krill) a 1.14% (harina de gluten de trigo).

La tendencia de los GH en el cuarto muestreo del periodo larvario (39DDE, estadio I, 10.5 ± 1.39 mm LE) cambió drásticamente en comparación a la tendencia de los muestreos realizados en etapas más tempranas, dado que los GH de los ingredientes tales como las harinas de pescado, krill y caseína, fueron similares o incluso mayores a los registrados al emplear harinas de alimentos vivos (rotíferos y artemia) como sustrato proteico. El GH de los ingredientes evaluados empleando extractos enzimáticos provenientes de las larvas de este cuarto muestreo varió de 0.1% a 1.64%; presentándose diferencias altamente significativas entre los GH de los ingredientes ($F = 56.748$; $p < 0.001$). Nuevamente, el GH obtenido con la harina de soya ($0.103\% \pm 0.08$) fue el más bajo y significativamente diferente al resto de los ingredientes (Figura 6, b).

a).



b).

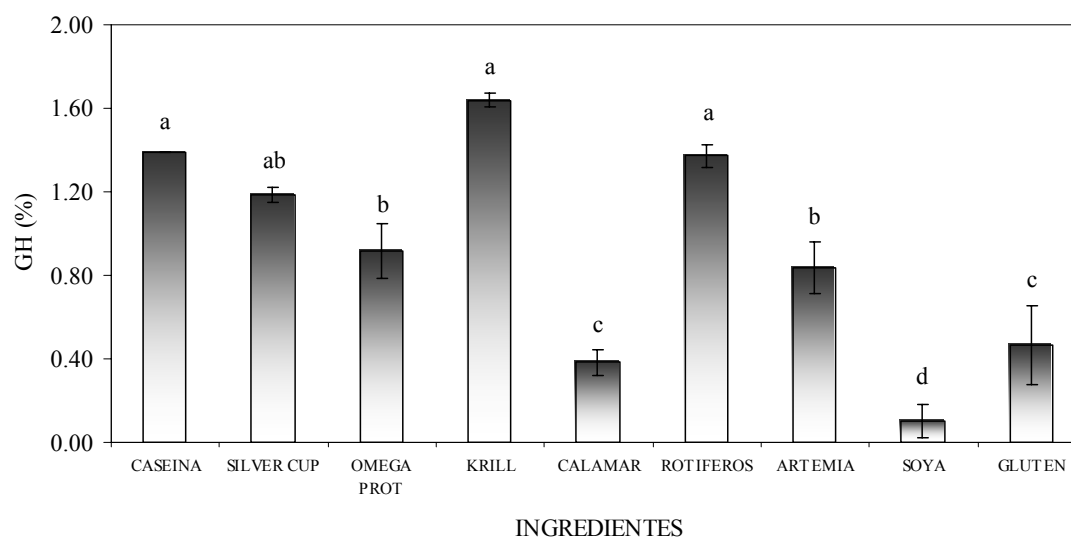


Figura 6. Grado de hidrólisis (GH %) de los ingredientes evaluados empleando extractos enzimáticos digestivos de las larvas pertenecientes al (a). Tercer día de muestreo (26 DDE, LE = 6.92 mm); y, (b). Cuarto día de muestreo (39 DDE, LE = 10.5 mm). Tiempo de reacción de la hidrólisis: 90 minutos. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n = 3). Las columnas con diferentes letras indican diferencias significativas (p<0.05).

En el quinto muestreo de periodo larvario (51 DDE, juveniles tempranos, 15.88 ± 2.94 mm LE) se observaron diferencias altamente significativas ($F = 23.69$; $p < 0.001$) entre algunos de los GH de los distintos ingredientes evaluados (Figura 7). El GH más bajo se registró al evaluar la harina de krill como sustrato proteico ($0.302\% \pm 0.073$) y no fue significativamente diferente del GH de la harina de soya; en cambio el GH más alto fue registrado al emplear la caseína ($1.524\% \pm 0.056$) que no fue significativamente diferente al GH obtenido con la harina de pescado Silver Cup™ y las harinas elaboradas a partir rotíferos y artemias liofilizadas. En el resto de los ingredientes no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

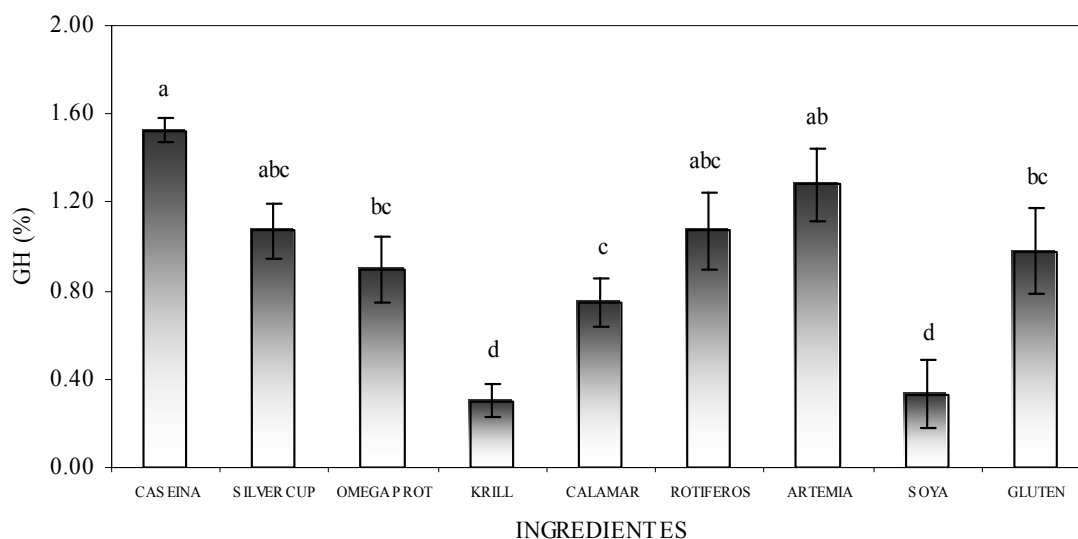


Figura 7. Grado de hidrólisis (GH %) de los ingredientes evaluados empleando extractos enzimáticos digestivos de las larvas pertenecientes al quinto día de muestreo (51 DDE, LE = 15.88 mm). Tiempo de reacción de la hidrólisis: 90 minutos. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ($n = 3$). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p < 0.05$.

La Tabla V y la Figura 8 muestran los cambios en los grados de hidrólisis de cada uno de los ingredientes evaluados a través de la ontogenia del sistema digestivo del lenguado de California (*P. californicus*) y compara la digestibilidad *in vitro* de distintos ingredientes en un solo día del muestreo. En cada día de los cinco muestreos se emplearon 30 U de actividad proteolítica alcalina total para iniciar la reacción de hidrólisis proteica bajo condiciones fisicoquímicas homogéneas (pH = 8.0, 37°C).

En algunos ingredientes tales como las harinas de pescado Omega protein™, harina de krill y calamar, no se observaron cambios estadísticamente significativos ($p < 0.05$) durante la ontogenia digestiva en al menos cuatro de los cinco días de muestreo. En cambio, algunos ingredientes tales como la caseína y el gluten de trigo, muestran una tendencia al incremento en los valores de los GH conforme transcurre la ontogenia del sistema digestivo. Y en contraste, en harinas elaboradas a partir de artemia y rotíferos liofilizados y harina de soya deslipidizada, se observó una clara tendencia a la disminución de su digestibilidad en términos de grados de hidrólisis, conforme transcurre la ontogenia del sistema digestivo. Al emplear harina de pescado Silver Cup™ como sustrato proteico no se observó una tendencia en el cambio de la digestibilidad proteica en el transcurso de la ontogenia digestiva.

Tabla V. Grados de hidrólisis (%) de los ingredientes evaluados a través de la ontogenia del sistema digestivo del lenguado de California (*Paralichthys californicus*) en los cinco días de muestreo: 9, 15, 26, 39 y 51 días después de la eclosión (DDE).

INGREDIENTES	9 DDE	15 DDE	26 DDE	39 DDE	51 DDE
Caseína	0.603 ± 0.181 ^{cd,B}	0.536 ± 0.076 ^{c,B}	0.475 ± 0.103 ^{de,B}	1.390 ± 0.000 ^{ab,A}	1.524 ± 0.056 ^{a,A}
Harina Silver cup TM	1.413 ± 0.025 ^{ab,A}	0.558 ± 0.277 ^{c,C}	0.570 ± 0.073 ^{cde,BC}	1.186 ± 0.035 ^{ab,A}	1.070 ± 0.123 ^{ab,ABC}
Harina Omega protein TM	1.029 ± 0.271 ^{abcd,A}	0.384 ± 0.212 ^{c,B}	0.837 ± 0.092 ^{bcde,A}	0.919 ± 0.132 ^{bc,A}	0.895 ± 0.145 ^{ab,A}
Harina de krill	0.384 ± 0.049 ^{d,B}	0.361 ± 0.123 ^{c,B}	0.465 ± 0.088 ^{e,B}	1.640 ± 0.035 ^{a,A}	0.302 ± 0.073 ^{c,B}
Harina de calamar	0.698 ± 0.000 ^{bcd,A}	0.593 ± 0.212 ^{bc,A}	0.733 ± 0.121 ^{cde,A}	0.384 ± 0.060 ^{de,B}	0.744 ± 0.112 ^{b,A}
Rotíferos liofilizados	1.919 ± 0.099 ^{a,AB}	1.639 ± 0.388 ^{a,ABC}	2.233 ± 0.121 ^{a,A}	1.372 ± 0.053 ^{ab,BC}	1.070 ± 0.172 ^{ab,C}
Artemia liofilizada	1.517 ± 0.222 ^{a,AB}	1.128 ± 0.248 ^{ab,ABC}	1.837 ± 0.198 ^{a,A}	0.837 ± 0.126 ^{bcd,BC}	1.279 ± 0.161 ^{ab,ABC}
Harina de soya	1.077 ± 0.109 ^{abc,A}	0.385 ± 0.102 ^{c,BCD}	0.115 ± 0.067 ^{f,D}	0.103 ± 0.080 ^{e,D}	0.333 ± 0.155 ^{c,CD}
Gluten de trigo	0.645 ± 0.074 ^{cd,AB}	0.628 ± 0.354 ^{bc,AB}	1.140 ± 0.088 ^{bc,A}	0.465 ± 0.192 ^{cd,B}	0.977 ± 0.194 ^{ab,A}

Valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes a $p < 0.05$. Las letras minúsculas están relacionadas a las columnas (comparación de la digestibilidad *in vitro* de los ingredientes por cada día de muestreo), las letras mayúsculas están relacionadas a las filas (comparación de la digestibilidad *in vitro* de un ingrediente durante la ontogenia del sistema digestivo).

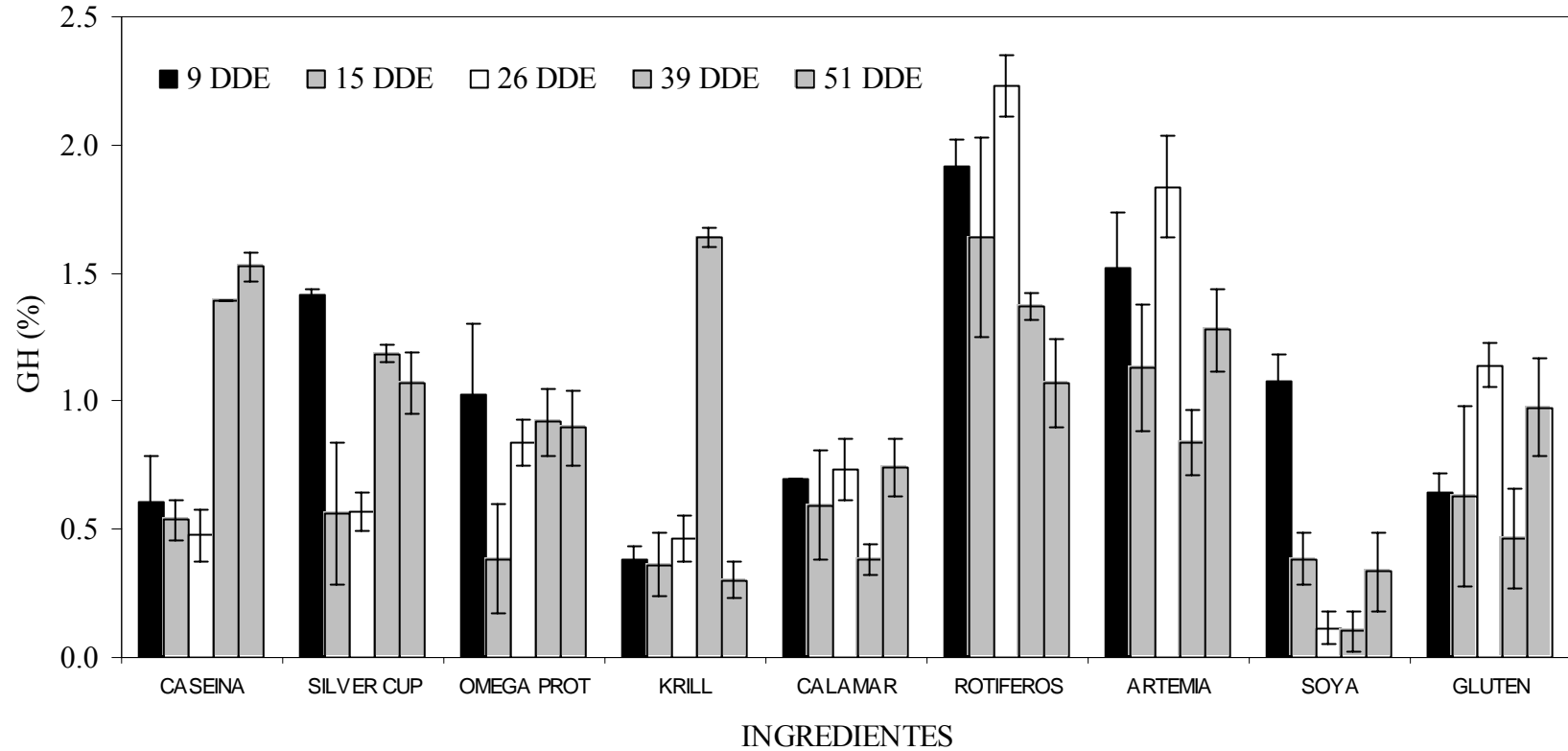


Figura 8. Comparación individual de los grados de hidrólisis (GH%) de los ingredientes evaluados a través de la ontogenia del sistema digestivo del lenguado de California (*P. californicus*). DDE: Días después de la eclosión. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n = 3).

VI.2. Comparación de la digestibilidad proteica *in vitro* de dietas experimentales con diferentes relaciones E:P en juveniles de lenguado de California (*P. californicus*) cultivados en diferentes temperaturas

VI.2.1. Actividad proteolítica alcalina total de los juveniles de lenguado de California del experimento

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad proteolítica alcalina total de los lenguados de los seis tratamientos provenientes del experimento de crecimiento. Sin embargo, aunque si bien no hubo diferencias significativas, se logró apreciar cierto efecto de la temperatura del agua sobre la actividad proteolítica, dado que la actividad proteolítica total de los lenguados cultivados a 20°C fue superior a la actividad proteolítica alcalina registrada en los lenguados cultivados a una temperatura del agua de 25°C (Figura 9).

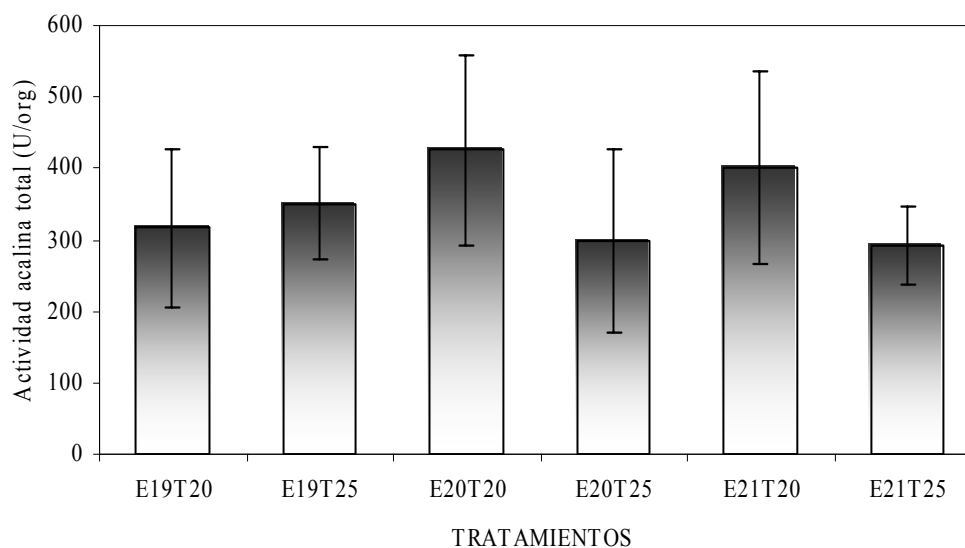


Figura 9. Actividad proteolítica total (U organismo^{-1}) de los juveniles de los lenguados al final del experimento de crecimiento. Tres niveles de energía dietética 19, 20 y 21 KJ por cada 100 g de dieta (E19, E20 y E21, respectivamente) y dos diferentes temperaturas de cultivo a 20 y 25 °C (T20 y T25, respectivamente). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ($n = 14$).

VI.2.2. Digestibilidad *in vitro* de las dietas experimentales empleando una técnica espectrofotométrica y una técnica electroquímica

Los resultados de la digestibilidad *in vitro* de las dietas experimentales donde se emplearon los extractos enzimáticos de los juveniles de lenguado de California (*P. californicus*), provenientes del experimento de crecimiento, se muestran en la Figura 10.

La digestibilidad *in vitro* de las dietas experimentales, cuantificada siguiendo la técnica descrita por Lan y Pan (1993) y reportada como digestibilidad proteica relativa (DPR %) se muestra en la Figura 10,a. Se observó un efecto altamente significativo del nivel energético dietario ($F = 9.161$; $p < 0.001$) y un efecto altamente significativo de la temperatura de cultivo ($F = 178.237$; $p < 0.001$) sobre la digestibilidad proteica *in vitro* al emplear esta técnica; no se encontró una interacción estadísticamente significativa entre el nivel energético dietario y la temperatura de cultivo ($F=1.789$; $p = 0.185$). La DPR de los tratamientos cuyas temperaturas de cultivo fueron de 25°C, sin importar el contenido energético dietario, resultaron las más bajas con valores que variaron de 16.02 ± 19.92 % a 26.96 ± 9.93 %, no existiendo diferencias significativas entre sí. En cambio, las DPR de los tratamientos de aquellos peces alimentados con dietas que poseían 20 y 21 KJ por cada 100 g de dieta y que fueron mantenidos a 20°C resultaron ser las más altas (84.152 ± 9.716 % y 90.823 ± 5.611 %, respectivamente), y mostraron diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos pero fueron estadísticamente similares.

Al emplear la técnica electroquímica del pH STAT para medir la digestibilidad proteica *in vitro* pero en términos de grados de hidrólisis (GH), sólo se encontró que la temperatura de cultivo tuvo un efecto altamente significativo ($F = 54.385$; $p < 0.001$) sobre el grado de hidrólisis de las dietas (Figura 10,b).

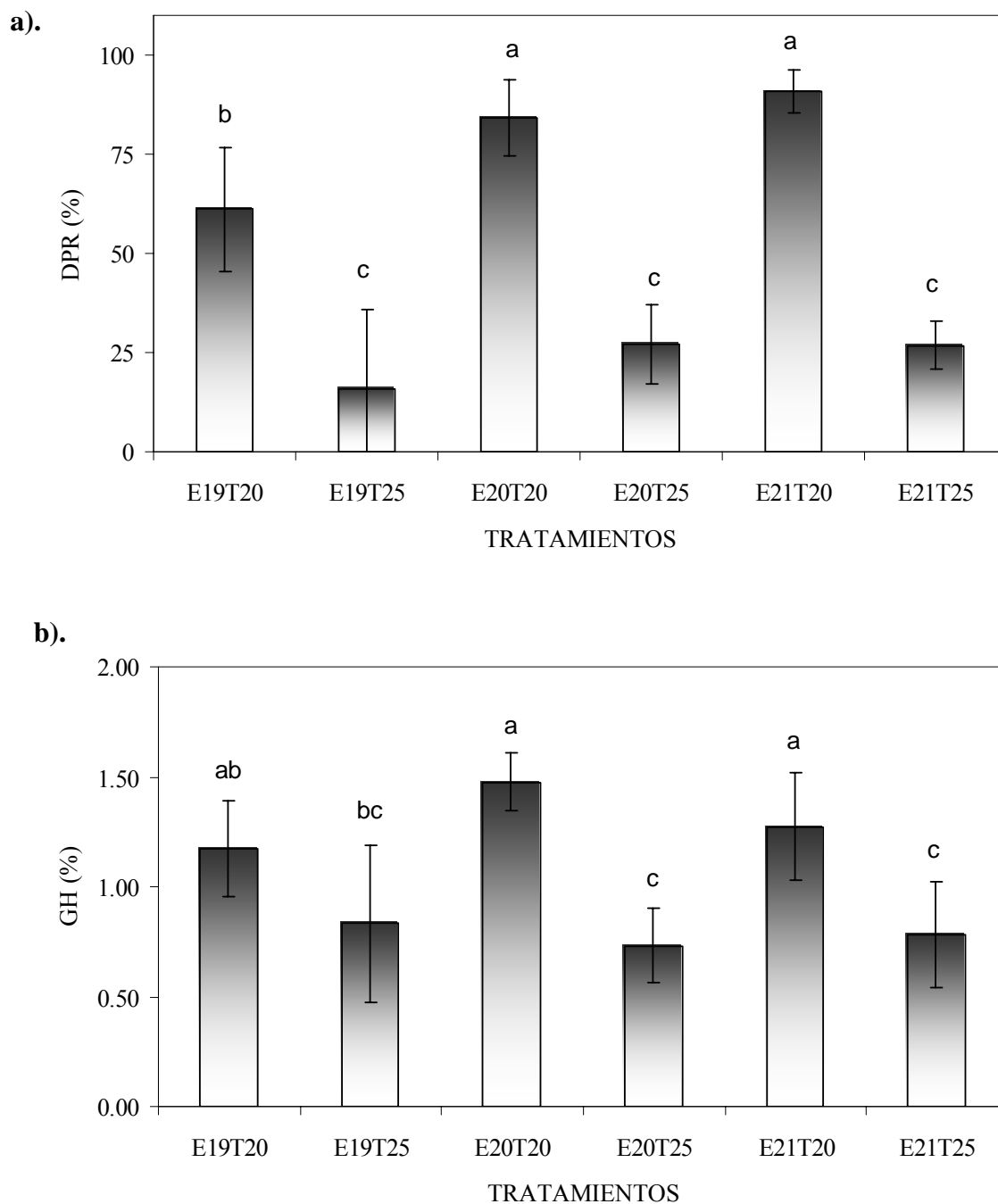


Figura 10. Digestibilidad *in vitro* de las tres dietas experimentales con a). la técnica espectrofotométrica de Lan y Pan (1993) reportada como digestibilidad proteica relativa (DPR) y b). La técnica electroquímica del pH STAT reportada en términos de grados de hidrólisis (GH). Las líneas verticales representan la desviación estándar de la media (n = 3). Las columnas con diferentes letras indican diferencias significativas a $p < 0.05$.

A diferencia de los resultados obtenidos al emplear la técnica espectrofotométrica, no se observó alguna interacción estadísticamente significativa entre el nivel energético dietario y la temperatura de cultivo con los grados de hidrólisis de las dietas. Los valores más bajos de digestibilidad proteica *in vitro* en términos de GH, se observaron en los tratamientos pertenecientes a las dietas que poseían contenidos energéticos de 20 y 21 KJ por cada 100 g de dieta y mantenidos a una temperatura de cultivo de 25°C (0.733 ± 0.169 % y 0.785 ± 0.240 %, respectivamente). Los valores más altos de digestibilidad *in vitro* en términos de GH, los obtuvieron las dietas que fueron hidrolizadas empleando proteasas provenientes de lenguados alimentados con dietas cuyos contenidos calóricos eran de 20 y 21 KJ por cada 100 g de dieta y cuya temperatura del agua de cultivo fue de 20°C (1.477 ± 0.129 % y 1.273 ± 0.245 %, respectivamente).

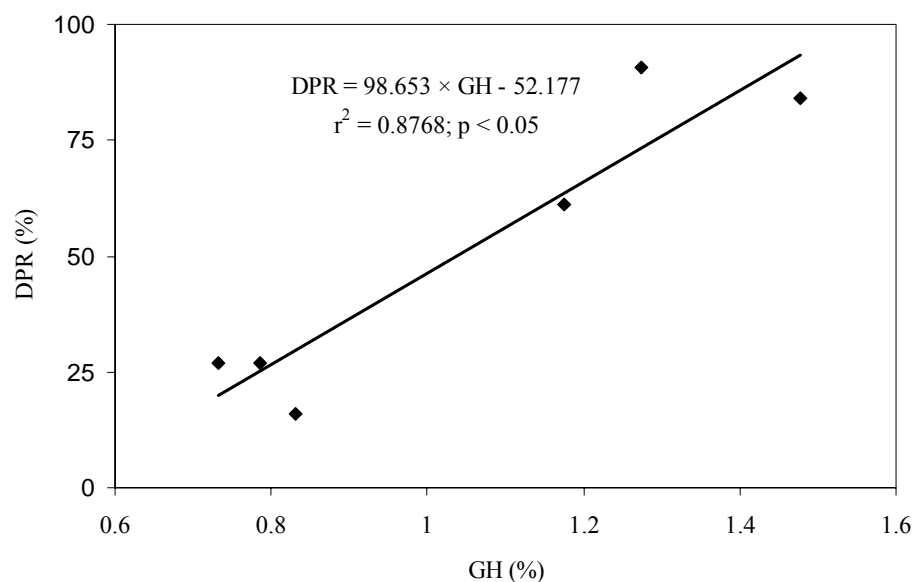


Figura 11. Correlación entre las digestibilidades *in vitro* de las dietas experimentales estimadas a través de dos técnicas diferentes, la técnica del pH STAT expresada en grados de hidrólisis (GH) y la técnica espectrofotométrica expresada como digestibilidad proteica relativa (DPR %).

La digestibilidad *in vitro* de las dietas experimentales estimada con ambos métodos fue consistente. Encontrándose una correlación positiva significativa positiva ($r^2 = 0.877$; $p < 0.05$), entre la digestibilidad *in vitro* calculada empleando la técnica espectrofotométrica descrita por Lan y Pan (1993) y la técnica electroquímica del pH STAT (Figura 11).

VI.2.2.1. Relación de la digestibilidad proteica *in vitro* de las dietas experimentales con los índices de rendimiento del experimento de crecimiento

La Tabla VII muestra algunos de los indicadores de rendimiento obtenidos al final del experimento de crecimiento (Bajo permiso de Galaviz-Espinoza, 2007) tales como el porcentaje de supervivencia, el peso final de los organismos por tratamiento, la tasa de eficiencia proteica (TEP) y los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) de la materia total.

La supervivencia en los tratamientos del experimento de crecimiento varió de 88.3 ± 8.2 % a 100 %, encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos. Se observaron supervivencias mayores en los tratamientos en los cuales los organismos fueron mantenidos a una temperatura de 20°C, sin importar el contenido calórico de la dieta con que fueron alimentados.

En lo que respecta al peso corporal de los lenguados al final del experimento, solo el peso de los organismos alimentados con una dieta que poseía un contenido calórico de 21 KJ por cada 100 g de dieta y mantenidos a una temperatura de 25°C fue significativamente menor y diferente al resto de los tratamientos. En el resto de los tratamientos no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Tabla VII).

Tabla VII. Indicadores de desempeño al final del experimento de crecimiento (Bajo permiso de Galaviz-Espinoza, 2007). TEP: Tasa de eficiencia proteica. CDA: Coeficiente de digestibilidad aparente. Media de tratamiento \pm desviación estándar.

TRATAMIENTOS	Supervivencia (%)	Peso final (g)	TEP	CDA (%)
E19T20	100 ^a	15.0 \pm 0.38 ^a	1.3 \pm 0.04 ^a	66.4 \pm 0.7 ^a
E19T25	92.5 \pm 2.5 ^e	14.7 \pm 0.2 ^a	1.2 \pm 0.05 ^b	67.1 \pm 1.19 ^a
E20T20	98.3 \pm 0.8 ^{a,b,c}	14.7 \pm 0.58 ^a	1.28 \pm 0.08 ^a	60.2 \pm 2.02 ^{e,d}
E20T25	88.3 \pm 8.2 ^f	14.2 \pm 0.7 ^a	1.1 \pm 0.14 ^c	64.7 \pm 1.56 ^{a,b}
E21T20	99.2 \pm 0.8 ^a	15.1 \pm 0.5 ^a	1.32 \pm 0.05 ^a	62.44 \pm 0.36 ^c
E21T25	95.0 \pm 1.4 ^{a,b,c,d}	12.7 ^b	1.01 \pm 0.07 ^c	63.09 \pm 3.10 ^{a,b,c}

Valores en la misma columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

Las tasas de eficiencia proteica al final del experimento de crecimiento variaron de 1.01 ± 0.07 a 1.32 ± 0.05 , de las cuales los tratamientos en los que los organismos se mantuvieron a una temperatura de 20°C, tuvieron tasas de eficiencia proteica significativamente mayores y diferentes al resto de los tratamientos, sin importar el contenido calórico de las dietas.

Como se observó en la Figura 10, en ambos análisis *in vitro* la digestibilidad proteica ya sea en términos de digestibilidad proteica relativa o de grados de hidrólisis, fue mayor empleando proteasas de peces cultivados a 20°C que empleando proteasas de aquellos cultivados a 25°C. Estos resultados apoyan y refuerzan los encontrados en el experimento de crecimiento en donde los peces cultivados a 20°C presentaron las mejores respuestas en cuanto a supervivencia, crecimiento en peso y eficiencia proteica (Tabla VII).

La correlación existente entre la digestibilidad *in vitro* empleando el método espectrofotométrico y la supervivencia ($r^2 = 0.547$), el peso final ($r^2 = 0.268$) y la TEP ($r^2 = 0.501$) fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$). De la misma manera, la relación

existente entre la digestibilidad *in vitro* en términos de grados de hidrólisis (GH) obtenidos por pH STAT y los índices de supervivencia, peso final y TEP fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$), con valores de correlación de $r^2 = 0.417$, $r^2 = 0.221$ y $r^2 = 0.407$, respectivamente (Tabla VIII).

Se observó una baja correlación entre la digestibilidad proteica *in vitro* y los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA), al emplear ambos métodos.

Tabla VIII. Matriz de correlaciones entre la digestibilidad *in vitro* en términos de digestibilidad proteica relativa (DPR) y grados de hidrólisis (GH) con los indicadores de rendimiento al final del experimento de crecimiento.

	Supervivencia (%)	Peso final (g)	TEP	CDA
DPR (%)	$r^2 = 0.5468$	$r^2 = 0.2683$	$r^2 = 0.5010$	$r^2 = 0.3600$
GH (%)	$r^2 = 0.4177$	$r^2 = 0.2205$	$r^2 = 0.4072$	$r^2 = 0.2116$

VII. DISCUSIÓN

VII.1. Digestibilidad proteica *in vitro* de ingredientes durante la ontogenia digestiva del lenguado de California

VII.1.1. Actividad proteolítica alcalina durante el periodo larvario del lenguado de California

Las larvas de lenguado de California *P. californicus*, mostraron un crecimiento exponencial en su longitud estándar (LE) en función de la edad, con una tasa de crecimiento de $0.028 \text{ mm día}^{-1}$. Un crecimiento similar fue reportado por Muguet (2004), cuyas larvas cultivadas en condiciones similares presentaron una tasa de crecimiento de $0.0326 \text{ mm día}^{-1}$; sin embargo, Gisbert *et al.* (2002) y Zacarías-Soto *et al.* (2006), reportaron un crecimiento lineal de la LE en relación a la edad para esta misma especie. Las diferencias de las tendencias del crecimiento con respecto a la edad, pudieron deberse al periodo de tiempo considerado para realizar el ajuste a la ecuación de crecimiento, pues en el presente estudio, si consideramos sólo el periodo comprendido entre los días 9 al 39 DDE, la tendencia del crecimiento es lineal ($r^2 = 0.9335$).

La LE, el estadio de desarrollo morfológico (Gisbert *et al.* 2002) y la edad de las larvas, fueron los índices ontogénicos empleados para comparar los resultados obtenidos en los análisis de actividad proteolítica alcalina y de digestibilidad proteica *in vitro*, dado que dichos índices son buenos predictores del desarrollo del sistema digestivo de las larvas de peces (Lazo *et al.*, 2000; Valverde-Chavarría, 2002).

El sistema digestivo de las larvas de *P. californicus*, como la mayoría de las larvas de peces marinos y de lenguados es inmaduro en las etapas tempranas, no posee un

estómago funcional al momento de la apertura bucal y anal, su sistema digestivo está compuesto sólo por un intestino relativamente corto, indiferenciado y rudimentario, al igual que otras glándulas accesorias de gran importancia, como son el hígado y el páncreas (Gisbert *et al.* 2003; Zacarías-Soto *et al.* 2006). Sin un estómago funcional, durante las etapas tempranas, la digestión de las partículas alimenticias ingeridas se realiza en el intestino anterior, donde las enzimas pancreáticas como la tripsina y la quimiotripsina, digieren los sustratos proteicos de manera óptima a pH's alcalinos (Walford y Lam, 1993; Rønnestad *et al.* 2000; Cahu y Zambonino-Infante, 2001). Es por esto, que al evaluar el pH óptimo para los extractos enzimáticos digestivos larvarios sólo se consideró un intervalo entre 7.0 y 9.0, en donde las actividades proteolíticas alcalinas relativas más altas se encontraron en el intervalo de pH de 8.0 a 8.5.

La importancia de la búsqueda de las condiciones de temperatura y pH óptimos en el cual las enzimas proteolíticas alcanzan su máxima actividad, radica en aumentar la sensibilidad de los ensayos y minimizar el consumo del extracto enzimático (García-Carreño *et al.* 1996), lo cual, en estudios con larvas de peces marinos es crítico. Además, es bien sabido que el pH influye en la estabilidad enzimática al variar su conformación estructural, por eso, en aquellos casos en donde las enzimas se llegan a encontrar en soluciones ácidas o alcalinas que se encuentren fuera de su rango óptimo, pueden sufrir desnaturalizaciones irreversibles (Alarcón, 1997).

En los últimos años, se han realizado numerosos trabajos que evaluaron el desarrollo de la capacidad digestiva durante la ontogenia del sistema digestivo en las fases larvarias de peces marinos (Bengtson *et al.* 1993; Walford y Lam, 1993; Díaz *et al.* 1997; Lazo, 1999; Lazo *et al.* 2000; Applebaum *et al.* 2001; Zambonino-Infante y Cahu, 2001;

Valverde-Chavarría, 2002; Cara *et al.* 2003; Muguet, 2004; Álvarez-González *et al.* 2006; Bolasina *et al.* 2006; Zacarías-Soto *et al.* 2006; Lazo *et al.* 2007). Uno de los principales objetivos de estos trabajos, fue la evaluación y descripción de la presencia y el nivel de la actividad de ciertas enzimas digestivas, dado que esto se emplea como un buen indicador de la condición nutricional en las etapas larvarias tempranas y de la madurez funcional del sistema digestivo (Applebaum *et al.* 2001; Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Cara *et al.* 2003). Además que, a través de la comprensión de la fisiología nutricional de las larvas, se puede lograr establecer protocolos de alimentación y estrategias de destete adecuadas (Valverde-Chavarría, 2002; Muguet, 2004).

La actividad proteolítica alcalina en el lenguado de California se ha registrado desde días previos a la apertura de la boca y al inicio de la alimentación exógena (Zacarías-Soto *et al.* 2006). Dicha actividad enzimática aumenta en forma considerable tras la primera alimentación, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio. Se ha asumido que este incremento en la actividad, al igual que el comportamiento de otras enzimas durante la ontogenia digestiva, no es inducido por el alimento sino que está genéticamente programado (Zambonino-Infante y Cahu, 1994).

Los niveles de actividad específica de las proteasas alcalinas en el presente estudio, fueron relativamente elevados durante la primera semana de vida del lenguado de California, sin embargo, estos niveles sufrieron un decremento significativo conforme transcurrió el periodo larvario (Muguet, 2004; Zacarías-Soto *et al.* 2006). Este decline no se debió a una disminución en la síntesis de enzimas, sino es resultado de un incremento de las proteínas estructurales en los peces (Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Valverde-Chavarría, 2002).

Si bien, el sistema digestivo de los lenguados es inmaduro en las etapas larvarias tempranas, se ha encontrado que en las etapas previas al inicio de la alimentación exógena, cuentan con una capacidad enzimática adecuada, al observarse la síntesis de precursores y actividad de las principales enzimas digestivas tales como la tripsina, la quimiotripsina, elastasas, carboxipeptidasas A y B y lipasas (Srivastava *et al.* 2002; Álvarez-González *et al.* 2006; Bolasina *et al.* 2006; Zacarías-Soto *et al.* 2006). Considerando esta premisa y las buenas supervivencias registradas al final de la metamorfosis, tras el uso de alimento vivo, cuyo aporte enzimático exógeno a la actividad enzimática total larvaria es mínimo (Díaz *et al.* 1997; Lazo *et al.* 2000), se ha llegado a plantear la hipótesis que una estrategia de destete temprano utilizando microdietas compuestas puede llegar a ser exitosa, si se emplean ingredientes que cubran los requerimientos nutricionales, que estimulen la secreción enzimática, que sean altamente digeribles y, por lo tanto, posean un alto grado de biodisponibilidad nutritiva (Cahu y Zambonino, 1997; Lazo, 2000).

La evaluación de la actividad de otras enzimas digestivas durante la ontogenia, como las proteasas ácidas totales, pepsinas, lipasas y amilasas, no fue realizada en el presente trabajo, debido a que no fueron contempladas dentro de los objetivos de trabajo. Sin embargo, se han estudiado ampliamente por otros autores en las larvas del lenguado de California *P. californicus* (Muguet, 2004; Álvarez-González *et al.* 2006; Zacarías-Soto *et al.* 2006).

VII.1.2. Digestibilidad proteica *in vitro* de ingredientes alimenticios evaluados durante la ontogenia digestiva del lenguado de California

Los trabajos realizados sobre digestibilidad proteica de ingredientes y alimentos con larvas de peces marinos son escasos (Alarcón, 1997; Alarcón *et al.* 1999; García-Ortega *et al.* 2000; Rønnestad *et al.* 2000, 2001; Lazo *et al.* 2007; Valverde-Chavarría, 2002; Tonheim *et al.* 2004, 2005, 2007; Nankervis y Southgate, 2006), la mayoría de estas evaluaciones se realizaron en ensayos *in vitro*. La evaluación de la digestibilidad proteica *in vivo* en las larvas de peces marinos, es bastante difícil de realizar debido sus tamaños extremadamente pequeños, a las dificultades técnicas que conciernen a la cuantificación de la ingestión del alimento y la posterior colección de heces fecales (Tonheim *et al.*, 2007). No obstante, se han realizado estudios de digestibilidad proteica *in vivo* en larvas de lenguados Japonés *P. olivaceus* (Rønnestad *et al.* 2000, 2001), en larvas de lenguado del Atlántico *Hippoglossus hippoglossus* (Tonheim *et al.* 2004, 2005) y en larvas de Walleye *Stizostedion vitreum* (Rust *et al.* 1993) empleando técnicas de alimentación forzada por microinyección de soluciones proteicas, polipeptídicas y/o de aminoácidos libres que poseían isótopos radioactivos en sus estructuras. Dichos ensayos poseen la ventaja de evaluar el desarrollo de la digestión ácida, miden las tasas de absorción de ciertos nutrientes y la eficiencia de utilización proteica, sin embargo, esta técnica requiere del empleo de equipo y reactivos caros y poco disponibles. La solución a estos problemas puede ser la aplicabilidad de ensayos de digestión *in vitro*.

El método del pH STAT, que emplea extractos enzimáticos digestivos del organismo bajo estudio, ha generado excelentes resultados en trabajos que evaluaron la digestibilidad proteica *in vitro* en etapas larvarias (Alarcón, 1997; Alarcón *et al.* 1999;

Nankervis y Southgate, 2006). A pesar de que estos estudios aun son escasos, el uso de este método para estas etapas es bastante prometedor, dada la versatilidad del método, ya que el pH STAT puede trabajar con una variedad de relaciones de Sustrato (proteína):Enzima (relación S/E) y distintas temperaturas y tiempos de reacción, sin que exista una desnaturalización enzimática debida a cambios bruscos o repentinos del pH. Pero además, el método del pH STAT se fundamenta en que a un pH de 8.0, existe una relación proporcional entre equivalentes de enlaces peptídicos hidrolizados y base consumida (Navarrete del Toro, 1999); y también, es el pH alrededor del cual las enzimas pancreáticas tales como la tripsina y la quimiotripsina, principales proteasas larvarias, presentan su mayor actividad (Walford y Lam, 1993; Rønnestad *et al.* 2000; Cahu y Zambonino-Infante, 2001).

En el presente trabajo se empleó el método del pH STAT para evaluar la digestibilidad proteica *in vitro* de siete ingredientes empleados comúnmente en la elaboración de alimentos para peces marinos, de los cuales, cuatro son de origen animal (harinas de pescado Omega protein™ y Silver cup™, harina de calamar, harina de krill y caseína) y dos de origen vegetal (harina de gluten de trigo y harina de soya sin lípidos). Además se evaluaron dos harinas elaboradas a partir de rotíferos y nauplios de artemia liofilizados, los cuales son los alimentos vivos empleados con éxito en el cultivo larvario del lenguado de California. La digestibilidad proteica *in vitro*, tanto de los ingredientes como de los alimentos vivos, se determinó en cinco diferentes días (9, 15, 26, 39 y 51 DDE) de la etapa larvaria con la finalidad de observar la influencia de los principales cambios fisiológicos sobre la digestibilidad proteica. Este tipo de estudio en larvas de peces marinos es novedoso, dado que a la fecha la mayoría de los trabajos solo evalúan la

digestibilidad de fuentes proteicas alimenticias en un mismo estadio de desarrollo. Para el análisis de la digestibilidad proteica *in vitro*, se emplearon extractos digestivos enzimáticos de las larvas de lenguado de California (*P. californicus*) en lugar de usar enzimas comerciales de organismos terrestres y/o bacterias (Hsu *et al.* 1977; Saterlee *et al.* 1979; Lazo *et al.* 1998). Para estudios de digestibilidad proteica *in vitro*, el empleo de extractos digestivos del organismo bajo estudio es más apropiado que el uso de cócteles multienzimáticos, debido a que la hidrólisis generada por dichos cócteles, es el resultado de la acción de tres o cuatro enzimas comerciales (tripsina, quimiotripsina, aminopeptidasas y proteasas bacteriales), en cambio la hidrólisis de las proteínas por extractos digestivos es el resultado de toda una batería de enzimas digestivas tales como tripsinas, quimiotripsinas, aminopeptidasas, pepsinas, carboxipeptidasas, lipasas, amilasas, entre otras (Alarcón *et al.* 2002). Además se ha observado que existen diferencias bastante importantes entre las estructuras moleculares, la fisiología digestiva (pH y temperaturas óptimas), la sensibilidad a inhibidores, la eficiencia catalítica y la especificidad al sustrato entre las enzimas digestivas de diferentes phyla (Moyano y Savoie, 2001; Alarcón *et al.* 2002; Chong *et al.* 2002)

Los valores del grado de hidrólisis (GH) de las nueve fuentes proteicas analizadas por el método del pH STAT, en cada uno de los días de muestreo, mostraron diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) (Figura 5, 6 y 7. Tabla IX).

En larvas de 9 (4.59 ± 0.27 mm LE), 15 (6.37 ± 0.24 mm LE) y 26 DDE (6.92 ± 0.53 mm LE), con la harina elaborada a partir de artemia y rotíferos liofilizados se obtuvieron los GH significativamente más altos que con el resto de los ingredientes (Tabla IX). García-Ortega *et al.* (2001), atribuyen la alta digestibilidad de estos alimentos a la

capacidad autolítica de los organismos zooplanctónicos, resultado de la digestibilidad generada por enzimas exógenas (enzimas presentes en el alimento vivo). Lo que concuerda con los resultados de la autohidrólisis de los rotíferos (> 90% de la hidrólisis total) y artemia (> 60% hidrólisis total) obtenidos en el presente estudio. Sin embargo Kurokawa *et al.* 1998 y Lazo *et al.* 2000, mencionan que el aporte de estas enzimas exógenas a la actividad total es relativamente insignificante; más aún Díaz *et al.* (1997) y Alarcón *et al.* (2002), asumen que dichas enzimas exógenas pueden ser degradadas por las enzimas propias de las larvas durante su tránsito en el intestino, y en el caso de las enzimas ácidas exógenas estas pueden llegar a ser inactivadas por la fuerte actividad alcalina de las larvas.

Tabla IX. Diferencias de la digestibilidad proteica *in vitro* de los ingredientes y alimentos vivos evaluados empleando extractos enzimáticos digestivos de larvas de lenguado *P. californicus*. El símbolo (=) indica que no existen diferencias significativas a $P < 0.05$.

9 DDE	Rotíferos \geq Artemia = Silver cup \geq Soya = Omega protein > Gluten = Caseína = Calamar > Krill
15 DDE	Rotíferos \geq Artemia > Silver cup = Gluten = Calamar = Caseína \geq Soya = Omega protein = Krill
26 DDE	Rotíferos = Artemia > Gluten \geq Omega protein \geq Calamar = Silver cup = Caseína > Krill > Soya
39 DDE	Krill = Rotíferos = Caseína \geq Silver cup \geq artemia = Omega protein > Gluten = Calamar > Soya
51 DDE	Caseína \geq Artemia \geq Rotíferos = Silver cup \geq Gluten = Omega protein \geq Calamar > Soya = Krill

Así mismo, la alta digestibilidad proteica, en términos de GH, de los alimentos vivos en los primeros tres días de muestreo probablemente estuvo relacionada a la alta cantidad de aminoácidos básicos (arginina y lisina) y aromáticos (tirosina, fenilalanina y

triptófano) que poseen en su estructura proteica en relación con las proteínas de otros ingredientes (Lan y Pan, 1993). Lan y Pan (1993) y Lindner *et al.* (1995), encontraron una alta correlación positiva entre la digestibilidad proteica y los contenidos molares de los aminoácidos lisina y arginina (lys + arg) y fenilalanina y tirosina (phe + tyr) en estudios con juveniles de camarón tigre *Penaeus monodon* y lobina europea *Dicentrarchus labrax*, lo cual se explica porque la tripsina es una endoproteasa que hidroliza la proteína en los enlaces peptídicos constituidos por aminoácidos básicos, mientras que la quimiotripsina rompe las proteínas en los aminoácidos aromáticos. Aunado a esto, la alta digestibilidad de los alimentos vivos, se debió también a las altas fracciones hidrosolubles que poseen en su estructura proteica y la presencia de cadenas peptídicas cortas en estos alimentos (Carvalho *et al.* 2003; Tonheim *et al.* 2007). Esto resulta en que las proteínas de los alimentos vivos estén más disponibles para la acción de las proteasas digestivas que son principalmente hidrolíticas.

La digestibilidad proteica *in vitro* de la caseína aumentó conforme la edad de las larvas (Tabla IX). Por ejemplo, en larvas de 51 DDE (15.88 ± 2.94 mm LE) la digestibilidad fue significativamente mayor que en el resto de los ingredientes, a excepción de la harina elaborada a partir de alimentos vivos y la harina de pescado Silver cupTM, con los cuales fue estadísticamente similar (Figura 6). Valverde-Chavarría (2002), evaluó la digestibilidad proteica de ingredientes y alimentos empleados en la alimentación de larvas de corvina blanca *Atractoscion nobilis* y encontró que la digestibilidad de la albúmina (derivado proteico del huevo) aumentó conforme a la edad, lo que atribuyó a cambios en la capacidad digestiva de las larvas de mayor edad y lo asoció al incremento en la producción de quimiotripsina, lo que probablemente favoreció el incremento en la digestibilidad de la

caseína. La baja digestibilidad proteica de la caseína en los primeros tres muestreos bien pudo deberse, además de la débil capacidad digestiva de las larvas en estadios tempranos de desarrollo, a la pobre propiedad hidrocópica de la caseína que al reducir su solubilidad, reduce la superficie de contacto efectiva entre las moléculas de caseína y las proteasas (Tonheim *et al.* 2007). Sin embargo, se lograron altos niveles de proteína soluble en este ingrediente, en comparación a los demás, poniendo en duda esta última causa para el presente estudio. A pesar de esto, la caseína es una fuente proteica con gran potencial para ser utilizada en la elaboración de microdietas para larvas de peces marinos, debido a la alta digestibilidad proteica reportada en ensayos con larvas (Alarcón *et al.* 1999; Valverde-Chavarría, 2002) y juveniles de peces marinos (Dimes y Haard, 1994; Carter *et al.* 1999; Moyano y Savoie, 2001; Alarcón *et al.* 2002).

La harina de pescado es el ingrediente principal y el más importante en la elaboración de alimentos para peces marinos, debido a que es una excelente fuente de aminoácidos esenciales, su alta digestibilidad y la ausencia de factores antinutricionales (Romero *et al.* 1994). Sin embargo, la calidad proteica varía considerablemente dependiendo de la especie del pez, su origen, el tiempo y la temperatura de almacenamiento durante su captura y el proceso y temperatura de secado, entre otros factores (Tacon, 1989; Anderson *et al.* 1993; Lazo *et al.* 1998; Hertrampf, 2000). Son diversos los ensayos químicos para evaluar la calidad proteica de las harinas de pescado, siendo el método del pH STAT uno de los más adecuados y recomendados para una evaluación rápida de la calidad, debido a su alta correlación con parámetros biológicos (Anderson *et al.* 1993; Dong *et al.* 1993; Dimes *et al.* 1994).

En el presente estudio, las harinas de pescado comerciales Silver cup™ y Omega protein™, mostraron una digestibilidad proteica variable durante la ontogenia digestiva, observándose una alta digestibilidad al emplear extractos enzimáticos provenientes de larvas de 9 DDE (4.59 ± 0.27 mm LE), disminuyendo considerablemente en larvas de 15 (6.37 ± 0.24 mm LE) y 26 DDE (6.92 ± 0.53 mm LE) y volviendo a incrementarse en larvas de 39 (10.5 ± 1.39 mm LE) y 51 DDE (15.88 ± 2.94 mm LE). Estas variaciones en la digestibilidad proteica de las harinas de pescado coinciden con los incrementos y descensos de la también variable actividad enzimática de la tripsina, leucina-aminopeptidasa y proteasas alcalinas totales en larvas de lenguado de California reportadas por Zacarías-Soto *et al.* (2006). Es importante mencionar que no se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las dos harinas comerciales a los cinco días de muestreo, lo que indica que la calidad de ambas fuentes proteicas es similar, a pesar de que su composición proximal es significativamente diferente.

La evaluación de la digestibilidad proteica en hidrolizados de pescado o de otra fuente proteica, no fue posible en este trabajo, dado que el empleo del método del pH STAT no es adecuado para muestras alimenticias que hayan sido parcialmente hidrolizadas (Dimes *et al.* 1994; Córdova-Murueta y García-Carreño, 2002). Esta premisa es lamentable, puesto que la incorporación de hidrolizados proteicos en alimentos para larvas de peces marinos, eleva las tasas de ingestión del alimento, supervivencia, crecimiento y ayuda a la formación del esqueleto, entre otras ventajas (Zambonino-Infante *et al.* 1997; Cahu *et al.* 1999). Cahu y Zambonino-Infante, (2001) explican estos resultados por la presencia de transportadores transmembranales específicos y la alta actividad peptidasa citosólica en el sistema digestivo larval de los peces marinos.

La digestibilidad proteica *in vitro* de las harinas de calamar y krill, resultó baja en ambas fuentes proteicas. Se ha observado que el empleo de harina de calamar en la elaboración de alimentos microligados para larvas de Barramundi (*Lates calcarifer*), en concentraciones mayores a 20% de la proteína total, tuvo un efecto adverso en su crecimiento, debido a deficiencias en aminoácidos esenciales tales como la lisina y la valina (Nankervis y Southgate, 2006). La deficiencia de lisina pudo haber afectado la digestibilidad debido a la alta especificidad de la tripsina para hidrolizar los enlaces peptídicos de este ingrediente (Lindner *et al.* 1995), a pesar de poseer altos niveles de arginina. Sin embargo, New (1987) y Hertrampf (2000) recomiendan la inclusión de harina de calamar en alimentos para larvas de peces y camarones a una tasa entre del 20 al 30% de la proteína total para generar buenos rendimientos al final del larvicultivo, debido a que posee compuestos quimio-atrayentes (glicina y betaina) que funcionan como importantes activadores de la conducta alimenticia y otros compuestos no identificados conocidos como “factor calamar” que son promotores del crecimiento. En otros estudios con larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, Córdova-Murueta y García-Carreño (2002) encontraron que incluir pequeñas cantidades de proteína de calamar (3% de la proteína total) en el alimento, es suficiente para elevar sus tasas de desempeño, debido a la presencia de péptidos pequeños y aminoácidos libres generados por la acción de enzimas endógenas presentes en el manto del calamar.

La harina de krill (*Euphausia* sp.) es el ingrediente que presentó los GH más bajos en la mayoría de los estadios analizados, a excepción de día 39 DDE en el que superó al resto de los ingredientes. Nankervis y Southgate (2006), atribuyen la aparente baja digestibilidad *in vitro* de la harina de krill a los altos niveles de proteína soluble y

aminoácidos libres presentes en estas harinas, lo cual es un indicativo de su rápida autohidrólisis. Por lo que el método del pH STAT es inadecuado para valorar la digestibilidad de esta fuente proteica, ya que pudiera estarse subestimando su digestibilidad, lo que ocurre con los hidrolizados proteicos (Dimes *et al.* 1994; Córdova-Murueta y García-Carreño, 2002). Una de las principales limitantes del empleo de harina de krill como suplemento de alimentos para peces, es que contiene altos niveles de fluoridos (compuesto de fluorina y uno o mas elementos radicales) depositados en su exoesqueleto (Julshamn *et al.* 2004), compuestos tóxicos que se trasladan del exoesqueleto al músculo del krill tras su captura. Sin embargo, los bajos GH observados en el presente estudio no justifican excluir la utilización de la harina de krill en las dietas para larvas de lenguado, ya que contiene altos niveles de pigmentos carotenoides, principalmente en forma de astaxantinas que están depositados en el músculo (Storebakken, 1988). Se ha observado que dichos carotenoides son los principales precursores bioquímicos de la vitamina A, la cual interviene en funciones de gran importancia en las larvas de lenguados, incluyendo la pigmentación, tolerancia al estrés y en la formación de opsinas retinales (Rønnestad *et al.* 1998; Bolker y Hill, 2000).

La harina de soya resultó ser un ingrediente inadecuado para la formulación y elaboración de microdietas compuestas para la alimentación de larvas del lenguado de California, debido a los bajos GH registrados en la mayoría de los muestreos. La baja digestibilidad de la harina de soya, bien pudiera atribuírsele a factores antinutricionales presentes en ella tales como inhibidores de enzimas digestivas (García-Carreño *et al.* 1997; Lemos *et al.* 2000), principalmente inhibidores tripsínicos y la presencia de fósforo en forma de fitato, formador de complejos fitato-metal-proteína que reducen la solubilidad y la

digestibilidad de las proteínas (Barros *et al.* 2002). No obstante, el proveedor (PADSA, México) indicó que la harina fue tratada mediante un proceso de extrusión a 135 °C, temperatura bastante superior a la cual se llegan a inactivar los principales inhibidores enzimáticos presentes en la harina de soya (100 °C) como consecuencia de la desnaturalización proteica del inhibidor (García-Carreño *et al.* 1997). Sin embargo, se ha observado que un calentamiento excesivo de la harina de soya, al igual que otros ingredientes de origen vegetal y animal, reduce la solubilidad de la proteína y la disponibilidad de sus grupos funcionales, lo que a su vez influye en la digestibilidad proteica, como consecuencia de la oxidación de algunos aminoácidos tales como la metionina, cisteína y triptófano, o a la reacción de la oxidación lipídica con algunos aminoácidos (Anderson *et al.* 1993; Lan y Pan, 1993; Carter *et al.*, 1999; Lemos *et al.* 2000; Chong *et al.* 2002).

El gluten de trigo, es una harina vegetal altamente proteica que ha sido empleada en la elaboración de alimentos para la acuicultura debido a su elasticidad que lo hace un buen aglutinante (Hertrampf, 2000). Su digestibilidad proteica en el presente estudio resulto ser variable, dado que al emplear extractos enzimáticos de larvas de 9 (4.59 ± 0.27 mm LE), 15 (6.37 ± 0.24 mm LE) y 39 DDE (10.5 ± 1.39 mm LE), la digestibilidad resulto ser baja, en cambio, al emplear extractos enzimáticos proveniente de las larvas de 26 (6.92 ± 0.53 mm LE) y 51 DDE (15.88 ± 2.94 mm LE), la digestibilidad resulto ser mayor en comparación a la de otros ingredientes (Tabla IX). Esta variabilidad en los resultados, pudo ser producto de la fluctuación ontogénica en la actividad específica de las amilasas reportada por Álvarez-González *et al.* (2006) en larvas de lenguado de California *P. californicus*. Hertrampf (2000), indica que una de las desventajas del gluten de trigo, al igual que otros

subproductos del trigo, es que posee la mayor parte del fósforo en forma de fitatos, lo que reduce su disponibilidad total en un 70 %. Adicionalmente, posee inhibidores de amilasas, lo que se demostró en estudios dietarios con el pez escorpión *Scorpaena ustulata* y la lisa dorada *Mugil auratus* (Sturmbauer y Hofer, 1985).

En el presente trabajo, se determinó el grado de autohidrólisis o “línea base” de los ingredientes. Se sabe que la autohidrólisis de las fuentes proteicas es el resultado de la acción catalítica de enzimas proteolíticas remanente o residuales y se ha considerado que su estimación es un buen indicador de la capacidad amortiguadora de las proteínas evaluadas (Alarcón *et al.* 2002). En este trabajo, la autohidrólisis de los ingredientes y alimentos vivos fue variable (Tabla VI), en algunos ingredientes, como la caseína, las harinas de krill, calamar y gluten de trigo, la autohidrólisis fue nula. Los resultados encontrados con la harina de calamar y krill son incongruentes con otros trabajos (Hertrampf, 2000; Córdova-Murueta y García-Carreño, 2002; Nankervis y Southgate, 2006), donde mencionan que la característica principal de estas harinas es su capacidad autolítica; sin embargo, esta capacidad pudo verse afectada por el grado de frescura, el almacenamiento y en el caso de la harina de krill, el método empleado para su procesamiento (Anderson *et al.* 1993; Lazo *et al.* 1998). Esto pudo haber inhibido, degradado o acelerado la reacción de las enzimas digestivas presentes en estas materias primas en un momento previo a su análisis. En contraste, la autohidrólisis registrada al evaluar la harina de soya y la harina elaborada a partir de alimentos vivos, fue alta. En el caso de la harina de soya, el GH generado por la autohidrólisis fue superior a los GH alcanzados al emplear extractos enzimáticos en todos los días de muestreo, incluso para larvas de 39 y 51 DDE, los GH por autohidrólisis fueron 200 y 225 % superiores al GH generado por las enzimas digestivas (Tabla VI), lo cual

corroborar la presencia de un compuesto inhibidor de las enzimas digestivas para las larvas de lenguado de California en este estudio.

En el caso de la harina elaborada con alimentos vivos, los GH generados por su capacidad autolítica fueron también elevados, contribuyendo en más del 60% de la hidrólisis total o en algunos casos, su contribución fue superior a la hidrólisis generada por las enzimas de los extractos digestivos larvarios (Tabla VI). Esta hidrólisis bien pudiera ser el resultado de la acción de las proteasas digestivas presentes en los nauplios de artemia y rotíferos. Sin embargo, como se mencionó anteriormente el aporte de estas enzimas exógenas a la digestión total en el intestino de las larvas puede no ser importante, dado que dichas enzimas al ser ingeridas por las larvas a través del alimento vivo, son generalmente degradadas o inactivadas por las enzimas endógenas propias de las larvas durante su tránsito en el intestino (Díaz *et al.* 1997; Kurokawa *et al.* 1998; Lazo *et al.* 2000; Alarcón *et al.* 2002). Es por esto, que se ha considerado que el consumo de álcali durante los ensayos sin enzimas digestivas, no predice adecuadamente la autohidrólisis de los ingredientes en presencia de ellas, ya que dichas enzimas de origen proteico son degradadas por las enzimas endógenas (Alarcón *et al.* 2002; Shipton y Britz, 2002), por lo que las líneas base, reportadas en el presente trabajo no reflejan realmente la contribución de las enzimas exógenas a la digestibilidad obtenida al emplear los extractos digestivos larvarios, ya que existe la posibilidad de que las enzimas exógenas presentes en el alimento vivo (rotíferos y *Artemia*) sean desnaturalizadas por las enzimas digestivas de los extractos intestinales larvarios.

VI.2. Comparación de la digestibilidad proteica *in vitro* de dietas experimentales con diferentes relaciones E:P en juveniles de lenguado de California (*P. californicus*) cultivados en diferentes temperaturas

Aunque el requerimiento proteico del lenguado de California *P. californicus* en etapas juveniles aún no ha sido experimentalmente cuantificado, probablemente sea similar al de la mayoría de los peces marinos, en los cuales, es relativamente elevado siendo poco más del 50% del peso seco total del alimento (Wilson, 2002). Debido a este alto requerimiento proteico y tomando en cuenta que la proteína es el componente más caro e importante de los alimentos para peces marinos, la evaluación de la calidad proteica en términos de digestibilidad se vuelve crítica y rutinaria (Sugiura, 2000).

En el presente trabajo, se evaluó la digestibilidad proteica de tres dietas isoproteicas experimentales para juveniles de lenguado de California empleando dos diferentes métodos *in vitro*. El primero, es una metodología espectrofotométrica desarrollada por Lan y Pan (1993) para evaluar fuentes proteicas usadas comúnmente como ingredientes en la elaboración de alimentos para camarones peneidos. El principio de esta técnica es la cuantificación de la absorbancia a una longitud de onda (λ) de 280 nm, que se produce por la liberación de aminoácidos generados tras la hidrólisis proteica. Dicha absorbancia se correlaciona alta y significativamente ($r = 0.99$) con la cantidad de aminoácidos básicos (lisina y arginina) y aromáticos (tirosina, fenilalanina y triptófano) presentes en las fuentes proteicas (Lindner *et al.* 1995). El segundo método empleado, es la técnica electroquímica del pH STAT que se basa en la cuantificación de iones hidrogeno liberados tras el rompimiento de los enlaces peptídicos por acción de las proteasas digestivas (Dimes y Haard, 1994). Las estimaciones de la digestibilidad proteica *in vitro* empleando ambos

métodos fue consistente, se observó una alta correlación significativa entre ambas metodologías ($r^2 = 0.877$; $p < 0.05$). Además, se encontró un efecto altamente significativo ($p < 0.001$) de la temperatura de cultivo sobre la digestibilidad proteica, dado que esta fue mayor empleando proteasas de peces cultivados a 20 °C que aquellos cultivados a 25 °C. Estos resultados apoyan y refuerzan los indicadores de desempeño registrados al final del experimento de crecimiento realizado por Galaviz-Espinoza (2007), en donde los peces cultivados a 20 °C presentaron las mejores respuestas en cuanto a supervivencia, crecimiento en peso y eficiencia proteica. Esto es congruente con lo reportado por Gadosmki *et al.* (1990), quienes encontraron que el crecimiento de *P. californicus* es principalmente influenciado por la temperatura del agua, al observar que los juveniles de dos meses de edad cultivados a 20 °C presentaron tasas de crecimiento y desarrollos más rápidos que aquellos cultivados a 16 °C. Madon (2002) por su parte, encontró que el lenguado de California es menos tolerante a variaciones en temperatura y salinidad de agua conforme aumenta su edad. Así mismo observó que juveniles pequeños (118 a 122 mm de longitud total) eran capaces de crecer en un amplio intervalo de temperatura y salinidad; en cambio los juveniles mayores (237 a 310 mm de longitud total) únicamente crecieron adecuadamente cultivados a 20 °C. A esta temperatura las tasas de crecimiento no fueron afectadas por la salinidad y los lenguados consumían mas alimento pero asimilaban menos.

La correlación existente entre la digestibilidad *in vitro* de las fuentes proteicas estimada por ambos métodos y los indicadores de desempeño estimados al final del experimento de crecimiento (supervivencia y TEP), si bien fue relativamente baja, fue significativa ($p < 0.05$). Se han observado altas correlaciones entre los GH cuantificados por el método del pH STAT y los CDA generados en ensayos de digestibilidad *in vivo* en

diversos trabajos con peces marinos (Dong *et al.* 1993; Dimes *et al.* 1994; Alarcón, 1997; Dimes y Haard, 2004). El método de Lan y Pan (1993) se caracteriza por una alta correlación entre la digestibilidad proteica *in vitro* y los niveles de lisina y arginina en la fuente proteica, sin embargo, ha sido criticado porque no se ha validado con datos provenientes de ensayos de digestibilidad proteica *in vivo* (Ezquerro *et al.* 1997).

No se encontró una correlación entre los resultados de digestibilidad proteica *in vitro* con los datos de CDA obtenidos en los análisis de digestibilidad *in vivo*. Probablemente esto se debió a que los ensayos *in vitro* evaluaron la digestibilidad proteica, en cambio la metodología *in vivo* evaluó la digestibilidad de la materia seca total de las dietas experimentales, utilizando la técnica de las cenizas insolubles en ácido. Otra causa que pueda explicar la falta de correlación entre las técnicas, es que la metodología empleada para colectar las heces, fue por presión del área abdominal-rectal (conocida como “stripping”). Se ha demostrado que una mala aplicación de esta técnica, puede llegar a contaminar la materia fecal con fluidos fisiológicos y epitelio intestinal, lo que subestima los valores de CDA del nutriente evaluado (Bureau *et al.* 2002; Chong *et al.* 2002), pero además, la extracción forzada de las heces pudo haber arrastrado nutrientes que aun no habían sido completamente digeridos y absorbidos.

Los métodos *in vitro* empleados resultaron ser una herramienta adecuada que además de proporcionar resultados rápidos, reproducibles y confiables de la calidad proteica de la dieta, sirvieron para evaluar el efecto de la temperatura sobre la digestibilidad y el aprovechamiento proteico dietario en condiciones de cultivo.

Como se observó en este trabajo, la temperatura empleada en todos los análisis de digestibilidad *in vitro* (37 °C), se encuentra muy por arriba de la temperatura en la cual las

larvas y juveniles de lenguado de California crecen a tasas óptimas (18 – 20 °C), pero se sabe que la temperatura en que se desarrollan los organismos acuáticos no tiene relación alguna con la temperatura óptima de sus enzimas digestivas (Lazo, 1999; Moyano, 2006). Para el presente estudio, bien pudieron haberse realizado análisis para encontrar la temperatura óptima de la actividad enzimática, sin embargo, se ha observado que esta temperatura es solamente una condición operacional (fuertemente dependiente del tiempo que dura el ensayo de evaluación), más que una característica fisiológica de la enzima (García-Carreño *et al.* 1996) y que es resultante tanto del aumento de la actividad con la temperatura (i.e., cinética), como de la pérdida de enzima activa por desnaturalización térmica (Alarcón, 1997). En el presente trabajo, se optó por realizar los análisis de digestibilidad a una temperatura de 37 °C, con la finalidad de aumentar la velocidad de reacción de las enzimas, la sensibilidad de los ensayos y minimizar el consumo del extracto enzimático, ya que en los ensayos donde se usaron extractos digestivos larvarios, esto fue crítico debido a la cantidad limitada de muestra enzimática.

VII. CONCLUSIONES

1. El grado de hidrólisis de las harinas elaboradas a partir de alimentos vivos liofilizados (rotíferos y *Artemia*) presentaron las digestibilidades más altas con tendencia a disminuir conforme se incrementó la edad de las larvas, lo que en parte explica los buenos resultados obtenidos cuando son utilizados como alimento en los cultivos larvarios, en contraste a los resultados obtenidos al emplear microdietas compuestas al inicio de la alimentación exógena.
2. La caseína, las harinas de pescado y el gluten de trigo son fuentes proteicas con potencial para su empleo en la elaboración de alimentos para etapas tardías larvarias de lenguado de California. Otros ingredientes, como la harina de soya y el krill, son poco digeribles lo que se puede atribuir a la presencia de factores antinutricionales y a las propiedades de sus estructuras proteicas.
3. Las harinas de los alimentos vivos liofilizados (rotíferos y *Artemia*) registraron niveles de autohidrólisis elevados debido a la acción de enzimas digestivas presentes en estos organismos zooplanctónicos. Sin embargo, de acuerdo a estudios previos en larvas de otras especies de peces marinos, se asume que dicho aporte enzimático a la digestión total larvaria es mínimo, dado que tales enzimas exógenas son degradadas o desnaturalizadas por las enzimas presentes en los extractos enzimáticos digestivos larvarios.

4. Los métodos *in vitro* empleados son una herramienta adecuada para estimar los valores de la digestibilidad proteica y para evaluar el efecto de la temperatura de cultivo sobre la digestibilidad proteica. De esta manera, se recomienda el cultivo del lenguado de California una temperatura cercana a 20°C para optimizar la digestión y la utilización de la proteína dietaria para el crecimiento.

VII. LITERATURA CITADA

- Adler-Nissen, J. 1982. Limited enzymic degradation of proteins: A new approach in the industrial application of hydrolases. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 32: 138-156.
- Aguado, F., F.J. Martínez y B. García-García. 2004. In vivo total phosphorous digestibility in Atlantic Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus thynnus* Linnaeus, 1758) under industrially intensive fattening conditions in Southeast Spain Mediterranean coastal waters. *Aquaculture Nutr.* 10: 413-419.
- Alarcón-López, F.J. 1997. Procesos digestivos en peces marinos: Caracterización y aplicaciones prácticas. Tesis de doctorado. Universidad de Almería. Departamento de Biología Aplicada. Almería. España.
- Alarcón, F.J., F.J. Moyano y M. Díaz. 2002. Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimized pH-stat system. *J. of the Sci. of Food and Agric.* 82:1-8.
- Alarcón, F.J., F.J. Moyano, M. Díaz, C. Fernández-Díaz y M. Yúfera. 1999. Optimization of the protein fraction of microcapsules used in feeding of marine fish larvae using *in vitro* digestibility techniques. *Aquaculture Nutr.* 5: 107-113.
- Alvial, A. y J. Manríquez. 1999. Diversification of flatfish culture in Chile. *Aquaculture.* 176 (1999): 65-73.
- Allan, G., S.J. Rowland, S. Parkinson, D.A.J. Stone y W. Jantrarotai. 1999. Nutrient digestibility for juvenile silver perch *Bidyanus bidyanus*: development of methods. *Aquaculture.* 170: 131-145.

- Allen, M.J. 1975. The biological environment of the California halibut, *Paralichthys californicus*. En: The California halibut, *Paralichthys californicus*, resources and fisheries. Haugen, C. W. (Ed.). Fish Bull. 174: 6-25.
- Anderson, J. S., S. P. Lall, D. M. Anderson y M. A. McNiven. 1993. Evaluation of protein quality in fish meals by chemical and biological assays. Aquaculture. 115: 305-325.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemist. Washington, D.C. 1094 p.
- Applebaum, S.L., R. Perez, J.P. Lazo y G.J. Holt. 2001. Characterization of chymotrypsin activity during early ontogeny of larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). Fish Phys. Biochem. 25: 291-300.
- Barros, A., F.J. Alarcón, F.J. Moyano y T.F. Martínez. 2002. Efecto de la suplementación con fitasa sobre la hidrólisis in vitro de la proteína de la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 18 (1-4): 95-98.
- Bassompierre, M., T. Børresen, P. Sanfeld, B. Rønsholdt, W. Zimmermann y E. McLean. 1997. An evaluation of open and closed systems for *in vitro* protein digestion of fish meal. Aquaculture Nutr. 3: 153-159.
- Bengtson, D.A. 1993. A comprehensive program for the evaluation of artificial diets. J. World Aquaculture Soc. 24 (2): 285-293.
- Bengtson, D.A., D.N. Borrus, H.E. Leibovitz, y K.L. Simpson. 1993. Studies on structure and function of the digestive system of *Menidia beryllina* (Pisces, atherinidae). En: B.T. Walther y H.J. Fyhn (eds.). Physiology and biochemistry of fish larval development. University of Bergen. Norway. 199-208.

- Biswas, A.K., M. Seoka, Y. Inoue, K. Takii y H. Kumai. 2005. Photoperiod influences the growth, food intake, feed efficiency and digestibility of red sea bream (*Pagrus major*). *Aquaculture*. 250: 666-673.
- Bligh, E.G. y W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Bolasina, S., A. Perez y Y. Yamashita. 2006. Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. 506: 503-515.
- Bolker, J.A. y C.R. Hill. 2000. Pigmentation development in hatchery-reared flatfishes. *J. Fish Biol.* 56, 1029–1052.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brocklehurst, K. 1992. Electrochemical assays: The pH-stat. En: Eisenthal, R. y M.J. Danson. *Enzyme assays. A practical approach*. Oxford university press. New York, USA. 191-216 p.
- Brown, N. 2002. Flatfish farming systems in the Atlantic region. *Rev. Fish. Sci.* 10 (3-4): 403-419.
- Bureau, D.P., S.J. Kaushik y C.Y. Cho. 2002. Bionenergetics. En: J. E. Halver y R. W. Hardy (eds.). *Fish nutrition*. Tercera edición. Academic press. San Diego, CA, USA. 1-59 p.
- Burke, J.S., T. Seikai, Y. Tanaka y M. Tanaka. 1999. Experimental intensive culture of summer flounder, *Paralichthys dentatus*. *Aquaculture*. 176 (1-2): 135–144.

- Cahu, C. y J.L. Zambonino-Infante. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*. 200 (1-2):161-180.
- Cahu, C.L., J.L. Zambonino-Infante y M. Quazuguel. 1999. Protein hidrolizate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture*. 171 (1-2): 109 – 119.
- Carter, C.G., M.P. Bransden, R.J. van Barneveld y S.M. Clarke. 1999. Alternative methods for nutrition research on the southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii*: *In vitro* digestibility. *Aquaculture*. 179 (1-4): 57-70.
- Carvalho, A.P., A. Oliva-Teles, P. Bergot. 2003. A preliminary study on the molecular weight profile of soluble protein nitrogen in live food organisms for fish larvae. *Aquaculture*. 225: 445-449.
- Chong, A.S.C., R. Hashim y A.B. Ali. 2002. Assessment of dry matter and protein digestibilities of select raw ingredients by discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquaculture Nut.* 8 (3): 229-238.
- Chong, A., R. Hashim, L.C. Lee y A.B. Ali. 2002. Characterization of protease activity in developing discus *Symphysodon aequifasciata* larva. *Aquaculture Research*. 33: 663-672.
- Civera-Cerecedo, R., C.A. Álvarez-González y F.J. Moyano-López. Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos 2004. En: Cruz Suárez, L.E., D. Ricque Marie, M.G. López Nieto, D. Villarreal, U. Scholz y M. González (eds.). Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16 – 19 Noviembre. Hermosillo, Sonora, México. 8 – 94.

- Conceição, L.E.C., J. Skjermo, G. Skjåk-Bræk y J.A.J. Verte. 2001. Effect of an immunostimulant alginate on protein turnover of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 24: 207-212.
- Conklin, D., R.H. Piedrahita, G.E. Merino, J.B. Muguet, D.E. Bush, E. Gisbert, J. Rounds y M. Cervantes-Trujano. 2003. Development of California halibut *Paralichthys californicus* culture. *J. Appl. Aquac.* 14 (3/4): 143-154.
- Córdova-Murueta, J.H. y F.L. García-Carreño. 2002. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture.* 210:371-384.
- Córdova-Murueta, J.H., F.L. García-Carreño y M.A. Navarrete-del-Toro. 2003. Digestive enzymes present in crustacean feces as a tool for biochemical, physiological and ecological studies. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 297:43-56.
- Daniels, H.V. 2000. Species profile. Southern flounder. SRAC. Publication No. 726.
- Dhert, P., G. Rombaut, G. Suantika y P. Sorgeloos. 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation technique in Europe. *Aquaculture.* 200 (1-2): 129-146.
- Díaz, M., F.J. Moyano, F.L. García-Carreño, F.J. Alarcón y M.C. Sarasquete. 1997. Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. *Aquacult. Int.* 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 (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 108 A (2-3): 349-362.
- Dimes, L.E., N.F. Haard, F.M. Dong, B.A. Rasco, I.P. Forster, W.T. Fairgrieve, R. Arndt, R.W. Hardy, F.T. Barrows y D.A. Higgs. 1994. Estimation of protein digestibility –

- II. *In vitro* assay of protein in salmonid feeds. *Comp. Biochem. Physiol.* 108 A (2-3): 363-370.
- Divakaran, S., I.P. Foster y M. Velasco. 2004. Limitations on the use of shrimp *Litopenaeus vannamei* midgut gland extract for the measurement of *in vitro* protein digestibility. *Aquaculture*. 239: 323-329.
- Dong, F.M., R.W. Hardy, N.F. Haard, F.T. Barrows, B.A. Rasco, W.T. Fairgrieve y I.P. Foster. 1993. Chemical composition and protein digestibility of poultry by-product meals form salmonid diets. *Aquaculture*. 116: 149-158.
- Evjemo, J.O., K. I. Reitanb y Y. Olsena. 2003. Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture*. 227 (1-4): 191-210.
- Ezquerria-Brauer, J.M. 1997. Tecnología enzimática en acuicultura: Evaluación *in vitro* de la digestibilidad enzimática de la proteína dietaria por pH-STAT para la optimización de dietas de *Penaeus vannamei* cultivado. Tesis de doctorado en ciencias. Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S. C. La Paz, B.C.S. México.
- Ezquerria, J.M., F.L. García Carreño, R. Civera y N.F. Haard. 1997. pH-stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*. 157 (3-4): 251-262.
- Ezquerria, J.M., F.L. García-Carreño y O. Carrillo. 1998. *In vitro* digestibility of protein sources for white shrimp *Penaeus vannamei* . *Aquaculture* 163, 123–136.
- Frey, H.W. 1971. California's living marine resources and their utilization. Calif. Dept. Fish Game. 148 p.

- Gadomski, D.M., S.M. Caddell, L.R. Abbott y T.C. Caro. 1990. Growth and development larval and juvenile California halibut, *Paralichthys californicus*, reared in the laboratory. Fish. Bull. 174: 85-98.
- Galaviz-Espinoza, M.A. 2007. Efecto del nivel de energía en la dieta sobre el crecimiento, sobrevivencia y utilización del alimento en juveniles del lenguado de California (*Paralichthys californicus*) cultivados a diferentes temperaturas. Tesis de maestría. UABC. Ensenada, B.C. México.
- García-Carreño, F.L., M.A. Navarrete-del-Toro, P. Hernández-Cortes, J.M. Ezquerro, E. Serviere y A. Maeda. 1996. Tecnología enzimática en acuicultura. En: Cruz Suárez, L.E., D. Ricque Marie y R. Mendoza-Alfaro (eds.). Avances en nutrición acuícola III. Memorias del III Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 11 – 13 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L., México. 8 – 94.
- García-Carreño, F.L., M.A. Navarrete-del-Toro y J. Marina-Ezquerro. 1997. Digestive shrimp protease for evaluation of protein digestibility in vitro. I: Effect of protease inhibitors in protein ingredients. J. Mar. Biotechnol.. 5:36-40.
- García-Ortega, A. 1999. Nutritional value of decapsulated cyst of *Artemia* and their use as protein source in experimental microdiets for fish larvae. Tesis de doctorado. Wageningen University, The Netherlands. 1999.
- García-Ortega, A. 2000. Valor nutricional de los quistes de *Artemia* y su uso como fuente de proteína en dietas artificiales para larvas de peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M A. Olvera-Novoa y R. Olvera-Cerecedo (eds.).

- Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición acuícola. D.. Mérida, Yucatán, México. 19-22 Noviembre, 2000.
- García-Ortega, A., A. Koussoulaki, H. Boer y J. Verte. 2000. *In vitro* protein digestibility of Artemia decapsulated cyst and nauplii, and of microbound diets for larval fish. *Aquaculture Research*. 31: 475-477.
- Gisbert E., R.H. Piedrahita y D.E. Conklin. 2003. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture*. 232 (1-4): 455-470.
- Gisbert, E., G. Merino, J.B. Muguet, D. Bush, R.H. Piedrahita y D.E. Conklin. 2002. Morphological development and allometric growth patterns in hatchery-reared California halibut larvae. *J. Fish Biol.* 61: 1217-1229.
- Haard, N. F., L. E. Dimes, R. E. Arndt y F. M. Dong. 1996. Estimation of protein digestibility – IV. Digestive proteinases from the pyloric caeca of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) fed diets containing soybean meal. *Comp. Biochem. Physiol.* 115 B. (4): 533-540.
- Hamre, K., I. Opstad, M. Espe, J. Solbakken, G. I. Hemre y K. Pittman. 2002. Nutrient composition and metamorphosis success of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) larvae fed natural zooplankton or Artemia. *Aquaculture Nut.* 8 (2): 139-148.
- Hertrampf, J.W. 2000. Handbook on ingredients for aquaculture feeds. Kluwer Academic. 573 p.
- Herzka, S.Z., D.E. Conklin, R. Piedrahita, M. Drawbridge, J. Fodrie y J.P. Lazo. 2003. US-Mexico cooperative efforts in California halibut research. *Bight bull.* 7: 4-7.

- Hsu, H.W., D.L. Vavak, L.D. Saterlee y G.A. Miller. 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J. Food Sci.* 42: 1269-1273.
- Julshamn, K., M.K. Malde, K. Bjorvatin y P. Krogedal. 2004. Fluoride retention of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed krill meal. *Aquac. Nutr.* 10: 9-13.
- Kjeldahl, C. 1883. New method for determination of nitrogen in organic materials. *Z. Analyt. Chem.* 22, 366-382.
- Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200: 181-201.
- Kolkovski, S. y A. Tandler. 2000. The use of squid protein hidrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Saprus aurata* larvae. *Aquaculture nutrition.* 6 (1):11 – 15.
- Kucas, S.T. y T.J. Hassler. 1986. Species profiles: Life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrate (Pacific Southwest). California Halibut. Biological report. 82 (11.44).
- Kurokawa, T., Shiraishi, M y T. Suzuki. 1998. Quantification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine (*Sardinops melanotictus*) larvae. *Aquaculture.* 161: 491-499.
- Kurokawa, T. y T. Suzuki. 1998. Development of intestinal brush border aminopeptidase in larval Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture.* 162: 113-124.
- Lan C.C. y B.S. Pan. 1993. In-vitro digestibility simulating the proteolysis of feed protein in midgut gland of grass shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture.* 109: 59-70.

- Lazo, J.P. 1999. Development of the digestive system in red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. Tesis de Doctorado en Filosofía. The University of Texas at Austin. Texas, USA. 212 p.
- Lazo, J.P. 2000. Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M A. Olvera-Novoa y R. Olvera-Cerecedo (eds.). Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición acuícola. D.. Mérida, Yucatán, México. 19-22 Noviembre, 2000.
- Lazo, J.P. y D.A. Davis. 2000. Ingredient and feed evaluation. En: R. R. Stickney (ed.) Encyclopedia of aquaculture. John Wiley and Sons, Inc. USA. 453-462 p.
- Lazo, J.P., G.J. Holt y C.R. Arnold. 2000. Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum *Sciaenops ocellatus*. Aquaculture nut. 6: 183-192.
- Lazo, J.P., G.J. Holt y C.R. Arnold. 2002. Toward the development of suitable microdiets for substitution of live prey in the rearing of red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae: Applications of studies on digestive physiology. Fisheries science. 68 (1): 888-891.
- Lazo, J.P., R. Mendoza, G.J. Holt, C. Aguilera y C.R. Arnold. 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). Aquaculture. 265: 194-205.
- Lazo, J.P., R.P. Romaine y R.C. Reigh. 1998. Evaluation of tree *in vitro* enzyme assays for estimating protein digestibility in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. J. of World Aquaculture Society. 29 (4): 441-450.
- Lemos, D., A. Navarrete-del-Toro, J.H. Córdova-Murueta y F. García-Carreño. 2004. Testing feed and feed ingredients for juvenile pink shrimp *Farfantepenaeus*

- paulensis*: in vitro determination of protein digestibility and proteinase inhibition. *Aquaculture*. 239: 307-321.
- Lemos, D., J.M. Ezquerro y F.J. García-Carreño. 2000. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. *Aquaculture*. 186 (1-2):89-105.
- Lindner, P., A. Eshel, S. Kolkovski, A. Tandler y S. Harpaz. 1995. Proteolysis by juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gastrointestinal enzymes as a method for the evaluation of feed proteins. *Fish Physiol. Biochem.* 14 (5): 399-407.
- Madon, S.P. 2002. Ecophysiology of juvenile California halibut *Paralichthys californicus* in relation to body size, water temperature and salinity. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 243: 235-249
- Moyano, F.J. y L. Savoie. 2001. Comparison of in vitro systems of protein digestion using either mammal or fish proteolytic enzymes. *Comp. Biochem. Physiol., A.* 128 (2): 359-368.
- Moyano-Lopez, F.J. 2006. Bioquímica digestiva en especies acuicultivadas: Aplicaciones en nutrición. En: Cruz-Suárez, L.E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.G. Nieto-López, D.A. Villareal-Cavazos, A.C. Puello-Cruz y A. García-Ortega (eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición acuícola*. UANL. Monterrey, Nuevo León. México. Noviembre, 2006.
- Muguet, J.B.A. 2004. Ontogeny of proteolytic digestive enzymes and evaluation of weaning performance of California halibut (*Paralichthys californicus*). Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad de California Davis. California. USA. 76 p.

- Nankervis, L. y P.C. Southgate. 2006. An integrate assessment of gross marine protein sources used in formulated microbound diets form barramundi (*Lates calcarifer*) larvae. *Aquaculture*. 257: 453-464.
- Navarrete-del-Toro, M.A. 1999. Aspectos fundamentales en hidrólisis. En: Prado, B.L.A., Huerta, O.S., Rodríguez, S.G., Saucedo, C.G. (eds.). *Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología*. Universidad Autónoma Metropolitana, México. 223-230 p.
- Navarrete-del-Toro, M.A. y F.L. García-Carreño. 2002. Evaluation of the progress of protein hydrolysis. Unit B2.2. En: Unit B. *Biochemical compositional analices of protein*. *Current protocols in food analytical chemistry*. Vol 1. Editorial John Wiley and Sons. B2.2.1-B2.2.14.
- New, M.B. 1987. *Feed and feeding of fish and shrimp – A manual on the preparation and presentation of compound feed for shrimps and fish in aquaculture*. UNDP/FAO/ADCP/RLP/87/26. Roma, Italia.
- Nieto-López, M.G., L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie y M. Ezquerria-Brauer. 2005. Técnica de digestibilidad in vitro en ingredientes y alimentos para camarón. *Ciencia UANL*. 8 (1): 65-73.
- Nose, T. 1960. On the digestion of food protein by goldfish (*Carassius auratus* L.) and rainbow trout (*Salmo irideus* G.). *Bull. of Freshwater Fish Res. Lab.* 10, 23–28.
- Oliva-Teles, A., A.L. Cerqueira y P. Gonçalves. 1999. The utilization of diets containing high levels of protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. *Aquaculture*. 179 (1-4): 195 – 201.

- Romero, J.J., E. Castro, A.M. Díaz, M. Reveco y J. Zaldívar. 1994. Evaluation of methods to certify the “premium” quality of Chilean fish meals. *Aquaculture*. 124: 351-358.
- Rønnestad, I., G.I. Hemre, R.N. Finn y Ø Lie. 1998. Alternate sources and dynamics of vitamin A and its incorporation into the eyes during the early endotrophic and exotrophic larval stages of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Comp. Biochem. Physiol. A*. 119: 787–793.
- Rønnestad, I., R. Pérez-Domínguez y M. Tanaka. 2000. Ontogeny of digestive tract functionality in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* studied by *in vivo* microinjection: pH and assimilation of free amino acids. *Fish Physiol. and Biochem.* 22: 225-235.
- Rønnestad, I., C.R. Rojas-García, S.K. Tonheim y L.E.C. Conceição. 2001. *In vivo* studies of digestion and nutrient assimilation in marine fish larvae. *Aquaculture*. 2001: 161-175.
- Rungruangsak-Torrissen, K., A. Rustad, J. Sunde, S.A. Eiane, H.B. Jensen, J. Opstvedt, E. Nygård, T.A. Smuelsen, H. Mundheim, U. Luzzana y G. Venturini. 2002. *In vitro* digestibility base don fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. *J. Sci. Food and Agric.* 82: 644-654.
- Rust, M.B., R.W. Hardy y R.R. Stickney. 1993. A new method for force-feeding larval fish. *Aquaculture*. 116: 341-352.
- Saterlee, L.D., H.F. Marshall y J.M. Tennyson. 1979. Measuring protein quality. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 56: 103-109.
- Seikai, T. 2002. Flounder culture and its challenges in Asia. *Rev. Fish. Sci.* 10 (3-4): 421-432.

- Serviere-Zaragoza, E., M.A. Navarrete-del-Toro y F.L. García-Carreño. 1997. Protein-hydrolyzing enzymes of the adult Mexican blue abalone, *Haliotis fulgens* (Gastropoda). *Aquaculture*. 157:325-336.
- Shipton, T.A. y P.J. Britz. 2002. Evaluation of an *in vitro* digestibility technique for the prediction of protein digestibility in the South African abalone, *Haliotis midae* L. *Aquaculture Nutrition*. 8: 15-21.
- Skaramuka, B.B., V. Kožul, Z. Teskeredzic, J. Bolotin y V. Onofri. 2001. Growth rate of tank-reared Mediterranean amberjack, *Seriola dumerili* (Risso, 1810) fed on three different diets. *J. Appl. Ichthyol.* 17: 130-133.
- Smith, R.R. 1979. Methods for determination of digestibility and metabolizable energy of feedstuffs for finfish. *Proceedings of the World Symposium On Finfish Nutrition and Fish feed Technology, Hamburg 20–23 June 1978, Berlín 1979, Vol. II.*
- Srivastava, A.S., T. Kurokawa y T. Suzuki. 2002. mRNA expression of pancreatic enzyme precursors and estimation of protein digestibility in first feeding larvae of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 132: 629-635.
- Sturmbauer, C. y R. Hofer. 1985. Can amylase inhibitors from wheat reduce the digestibility of starch and the growth rate in fish? *Nutrition and feeding in fish*. 265-267.
- Sugiura, S.H. 2000. Digestibility. En: R.R. Stickney (ed.) *Encyclopedia of aquaculture*. John Wiley and Sons, Inc. USA. 209-218 p.

- Tacon, A. G. J. 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de capacitación. Programa cooperativo gubernamental. FAO-ITALIA. Proyecto AQUILA II. GCP/RLA/102/ITA. Documento de campo No. 4. Brasilia, Brasil.
- Takeuchi, T., Q. Wang, H. Furuita, T. Hirota, S. Ishida y H. Hayasawa. 2003. Development of microparticle diets for Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. Fish. Sci. 69: 547-554.
- Tonheim, S.K., A. Nordgreen, I. Høgøy, K. Hamre e I. Rønnestad. 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.
- Tonheim, S.K., M. Espe, A.J. Raae, M.J. Darias e I. Rønnestad. 2004. In vivo incorporation of [U]-¹⁴C- amino acids: an alternative protein labeling procedure for use in examining larval digestive physiology. Aquaculture. 235: 553-567.
- Tonheim, S.K., M. Espe, K. Hamre e I. Rønnestad. 2005. Prehydrolysis of protein improves utilization of dietary protein in larval teleost Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 321: 19-34.
- Valverde-Chavarría, S.E. 2002. Desarrollo del sistema digestivo de larvas de Corvina blanca, *Atractoscion nobilis* (Ayres, 1860) (Scianidae), y selección de fuentes proteicas adecuadas para su alimentación. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de investigación científica y de estudios superiores de Ensenada. Ensenada, B.C. México. 90 p.
- Walford, J. y T.J. Lam. 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme 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. En: H.J. Bergmeyer (ed.). Methods of enzymatic analysis. Vol. V. Verlag Chemie. Weinheim, Germany. 270-277 p.
- Wilson, R.P. 2002. Amino acids and proteins. En: J. E. Halver y R. W. Hardy (eds.). Fish nutrition. Tercera edición. Academic press. San Diego, CA, USA. 143-179 p.
- Zacarias-Soto, M., J.B. Muguet y J.P. Lazo. 2006. Proteolytic activity in California Halibut Larvae (*Paralichthys californicus*). J. of World Aquaculture Soc. 37 (2): 175-185.
- Zambonino-Infante, J.L. y C. Cahu, 1994. Development and response to a diet of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Fish Physiol. Biochem. 12: 399-408.
- Zambonino-Infante, J.L. y C.L. Cahu. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. Comp. Biochem. Physiol. C. 130: 477-487.
- Zambonino-Infante, J.L., C.L. Cahu y A Pères. 1997. Partial substitution of di- and tripeptides for native protein in sea bass improves *Dicentrarchus labrax* larval development. J. Nutr. 127: 608-614.
- Zar, J.H. 1984. Biostatistical analysis. Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey. USA. 334 p.