

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



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

**EVALUACIÓN DE FUENTES PROTEICAS POR MEDIO DE
DIGESTIBILIDAD *IN VIVO* E *IN VITRO* PARA ELABORACIÓN DE DIETAS
DE JUVENILES DE JUREL, *Seriola lalandi dorsalis***

Presenta:

FERNANDO YAHIR GARCÍA GÓMEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JUAN PABLO LAZO CORVERA

Ensenada, Baja California, México, Septiembre 4 del 2009.

1. Introducción

Las pesquerías a nivel mundial han alcanzado su nivel máximo sustentable y las capturas anuales se han establecido en una cantidad que oscila entre los 90 y 100 millones de toneladas por año. La sobreexplotación de los recursos pesqueros y la destrucción del hábitat marino, infringido por efectos antropogénicos, han causado una drástica reducción en el tamaño de las poblaciones naturales de estos recursos, particularmente la de los peces marinos. Se estima que un 70% de las poblaciones están explotadas al máximo, lo cual ha causado que las capturas globales estén disminuyendo (FAO 2000).

Una de las alternativas para contrarrestar los efectos de la sobre explotación de los recursos pesqueros y abastecer la demanda de productos en el mercado es la piscicultura marina; como medio para obtener pescado, ofrecerlo al consumidor y posiblemente reponer recursos sobreexplotados (FAO 2006).

La acuicultura es uno de los sectores de producción de alimento para consumo humano de más rápido crecimiento en el mundo. En particular la maricultura a nivel mundial ha crecido a una tasa del 15 % anual desde 1984. En 1998 la producción de peces marinos en el mundo represento el 1.98% de la producción total, sin embargo, su valor económico fue del 6.47% de la producción total mundial, lo cual muestra su importancia económica (FAO 2000).

En Japón el cultivo de jurel aleta amarilla “Hamachi o Yellowtail” (*Seriola quinqueradiata*) representa una de las producciones acuícolas más exitosas de ese país, superando a la producción acuícola de otras especies. (Nakada, 2002). Las especies del genero *Seriola* tienen una gran aceptación en el mercado, alcanzan precios muy altos y tienen una de las tasas de crecimiento mas rápidas de los peces marinos cultivados

mundialmente. En México la captura de *S. lalandi* y *S. rivoliana* comúnmente llamados medregal, jurel de castilla, jurel aleta amarilla, etc., solo alcanzó la cifra de 2000 TM, de las cuales el 64 % de la producción nacional fue aportada por los estados de Baja California y Baja California Sur. Sin embargo, el mercado nacional e internacional tiene una demanda mucho mayor (Nakada, 2000). Bajo este escenario, el desarrollo de la tecnología acuícola para el cultivo de esta especie cobra suma importancia.

En la acuicultura de peces marinos alrededor del 60% de los costos de producción se destinan a la alimentación, debido en gran parte al alto nivel de proteína (i.e., 40-60% proteína cruda) en las dietas de peces marinos. Una de las estrategias para bajar los costos de producción en unidades de cultivo es mediante el desarrollo de dietas con alto contenido proteico pero a bajo costo. Para lograr este objetivo tradicionalmente se realizan pruebas que consisten en evaluar dietas durante un tiempo determinado, tomando parámetros como sobrevivencia, ganancia de peso y digestibilidad como variables de respuesta. Sin embargo, estos métodos son costosos, laboriosos y muy tardados (Grabner, 1985).

La ingesta de alimento, el rompimiento y liberación de los nutrientes presentes en la dieta y la absorción de nutrientes liberados comprende el proceso conocido como digestión y absorción, y en conjunto se conocen como la digestibilidad de la dieta, nutrientes o ingredientes. En el intestino, las enzimas digestivas son las encargadas de llevar a cabo el rompimiento de los enlaces que unen a las unidades básicas que constituyen los nutrientes. Estudios realizados con organismos acuáticos indican que un alimento puede contener todos los requerimientos nutritivos de una especie en particular, sin embargo, si la proteína contenida en el alimento no se encuentra en forma apropiada para su digestión, no puede ser asimilada (Córdova-Murueta, 2002).

La metodología comúnmente utilizada para evaluar la digestibilidad de los nutrientes en los ingredientes o dietas, es la digestibilidad *in vivo*. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, estas técnicas requieren de largos periodos de tiempo, generalmente son caros, laboriosos y los resultados se pueden ver afectados por diversos factores ambientales y metodológicos (Lazo et al., 1998). Una herramienta alternativa para la selección de ingredientes altamente digestibles son las pruebas de digestibilidad *in vitro*, las cuales generan de una manera rápida información sobre la digestibilidad del ingrediente y su efecto en las enzimas digestivas de los organismos (Alarcón, 1997; Yúfera et al., 2000).

Hasta la fecha no se han realizado estudios evaluando la digestibilidad de los nutrientes en ingredientes con potencial para formular dietas para la engorda de juveniles de jurel, *Seriola lalandi*; una especie con alto potencial para el cultivo en México. Es por esto que el presente estudio pretendió evaluar la digestibilidad *in vitro* en *in vivo* de diversos ingredientes para la selección de ingredientes y formular así dietas adecuadas para la engorda de juveniles de esta especie.

2. Antecedentes

2.1 Biología

El jurel cola amarilla (*Seriola lalandi*) se agrupa en la clase Osteichthyes, orden Perciformes y Familia Carangidae. Su distribución es mundial, encontrándose varias subespecies. Los peces de la familia Carangidae son comúnmente conocidos como “Yellowtail”, “Japanese amberjack” (*Seriola quinqueradiata*), “Greater amberjack” (*S. dumerilli*) “Goldstriped amberjack” (*S. aureovitta*). Estos peces tienen una distribución circumtropical (i.e., se encuentran distribuidos alrededor de todo el mundo), en los mares del sur de Japón, Mar Amarillo, Hawái, Pacífico Oriental, Australia, Sudáfrica y Brasil.

Como todos los miembros de esta familia se caracterizan por presentar una aleta anal precedida por dos espinas distintas, un pedúnculo caudal delgado, una aleta caudal profundamente furcada y escamas en la línea lateral formando un largo arco en posición inferior respecto al eje central, creando una ligera quilla o escudos sobre el pedúnculo caudal en los adultos (Avilés- Quevedo, et al., 2004)

En México, la especie *Seriola lalandi* es conocida como jurel cola amarilla del Pacífico, esmedregal o jurel de castilla. Su distribución se ubica en las costas de la Península de Baja California y en el Golfo de Cortez, convirtiéndose en un buen candidato para la acuicultura, por su excelente crecimiento, alta demanda en la pesca comercial como deportiva pero sobre todo los altos precios que alcanza en el mercado internacional (Avilés-Quevedo et al.,2004)

Seriola lalandi se caracteriza por presentar las esquinas redondeadas en la parte posterior del maxilar y aletas pectorales más cortas que las pélvicas. La primera aleta dorsal tiene seis espinas unidas por una membrana y siete radios, seguidas por una segunda aleta dorsal de 33 a 36 radios. En la primera aleta anal posee dos espinas y en la segunda anal de 20 a 22 radios. En el arco branquial pueden encontrarse de ocho a nueve rastrillos en la parte superior y de 18 a 21 en la parte inferior. El número de vértebras es de 11 precaudales y 14 caudales. La coloración de las aletas dorsales son de color oscuro con una banda submarginal amarillenta, aletas pectorales oscuro amarillento, pélvicas amarilla y negruzcas y aleta anal negruzca con puntas pálidas (Áviles- Quevedo, et al., 2004)

Los jureles pueden llegar a medir 250 cm de longitud con un peso de 70 Kg, siendo las hembras ligeramente más grandes que los machos, pero ambos poseen una tasa de crecimiento rápido oscilando entre los 2 a 3 Kg por año (Nakada, 2000; Poortennar, 2003). Esta especie se encuentra en aguas templadas (18 – 24°C), es de

hábitos pelágicos y es una pez carnívoro por excelencia que se alimentan de pequeños peces como la macarela, sardina, anchoveta, calamar y crustáceos (Bianchi et al., 1993).

2.1.1. Cultivo de *Seriola*

El cultivo de jurel aleta amarilla Japonés (*Seriola quinqueradiata*) tuvo sus inicios en Japón en el año 1927. En la actualidad la producción derivada de la acuicultura se encuentra entre 140,000 y 160,000 TM anuales, representando mas de cuatro veces la producción pesquera de esta especie en ese país (Nakada, 2000).

El 80% de la producción mundial de jurel por medio de la acuicultura es llevada a cabo por Japón. Esta producción depende de juveniles capturados del medio natural. La industria del cultivo de jurel en Japón ha tenido un incremento en el uso de alimentos balanceados pero aún depende de sardinas capturadas para la alimentación en algunas etapas de producción. Sin embargo las capturas de alimento fresco han declinado dramáticamente en los últimos años turnándose critica la sustentabilidad de la industria del jurel del Japón (Nakada, 2008).

El cultivo comercial en Japón se realiza en las zonas costeras utilizando encierros hechos con nylon y metal. El tamaño y número de encierros varia según la escala de producción, utilizando para escalas de pequeña producción en un mismo sitio, encierros de 10m x10m x 8m en tamaño, mientras que a escalas de relativamente alta producción, el numero de encierros puede ser de 20 con tamaños de 18m x 22m x 8m ó 12m x 12m x12m (H.Matsumoto, Kochi, 2000).

2.2. LA DIGESTION (Digestibilidad)

La digestión comprende los procesos y transformaciones que sufre el alimento en el sistema digestivo por medios mecánicos, químicos y/o enzimáticos preparándolo así para su posterior absorción en el intestino. La mayoría de los estudios sobre los procesos digestivos se han llevado a cabo en mamíferos terrestres, particularmente en humanos y animales de granja.

Las proteínas son el principal nutriente que compone al alimento de los peces marinos. Son la fuente de los aminoácidos esenciales requeridos en los procesos metabólicos vitales para los organismos. También tienen un papel determinante en los costos de producción de una unidad acuícola por el alto precio de las fuentes proteicas y el alto requerimiento proteico que tienen los peces marinos. Los indicadores biológicos y químicos empleados para evaluar la calidad de las proteínas son diversos. El perfil de aminoácidos y su digestibilidad son los indicadores de calidad más importantes.

Las proteasas son las enzimas digestivas encargadas de la digestión de las proteínas. Los aminoácidos y péptidos liberados por la digestión de las proteínas son utilizados por el organismo para la reconstrucción de tejidos dañados, síntesis de nuevas proteínas (i.e., nuevo tejido muscular) y como fuente de energía, entre otros procesos metabólicos. (Shiau, 1998).

La digestibilidad puede variar respecto a muchos factores, tales como el tamaño y la edad de los animales, tipo de alimento, método de elaboración, parámetros ambientales como la temperatura, las interacciones con otros ingredientes o nutrientes en las dietas.

Existen varios métodos para evaluar la digestibilidad de las proteínas en la dieta. Los métodos más ampliamente utilizados son los métodos *in vivo*, los cuales pueden ser costosos, laboriosos y requieren de mucho tiempo. Como métodos alternativos existen

los métodos de digestibilidad *in vitro* que suelen ser de menor costo, fáciles y de corta duración.

2.2.1. Digestibilidad *in vivo*

Características

Como se menciona anteriormente, la digestibilidad es una forma de medir el aprovechamiento de un alimento, es decir, la facilidad con que es convertido en el aparato digestivo en sustancias adecuadas para la absorción. En la práctica, la digestibilidad de los nutrientes se determina cuantificando la diferencia entre el nutriente ingerido (nutriente en el alimento ingerido) y la cantidad de nutriente excretada (nutriente en las heces producidas) y se expresa como un porcentaje del total del nutriente ingerido. Es por esto que el coeficiente de digestibilidad comprende realmente dos procesos, la digestión que corresponde a la hidrólisis de las moléculas complejas de los alimentos, y la absorción de pequeñas moléculas ya digeridas (i.e., aminoácidos y ácidos grasos libres) en el intestino y es importante distinguir entre digestión y digestibilidad.

Métodos

Existen dos métodos comúnmente utilizados para estimar la digestibilidad *in vivo*:

1) El **Método Directo**: que consiste en la cuantificación exacta del alimento consumido y la recolección cuantitativa de todas las heces producidas. La cantidad de un nutriente determinado que se excreta en las heces se resta de la cantidad inicial del alimento proporcionado originalmente y la diferencia representa la cantidad de nutrientes absorbidos por el animal. El coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) se estima utilizando la siguiente fórmula:

$$CDA = 100 \times \frac{(\text{Nutriente en dieta} - \text{Nutriente en heces})}{\text{Nutriente en dieta}}$$

2) El **Método**: que ha sido desarrollado para obviar los problemas de la recolección total y cuantitativa del alimento ingerido y heces producidas. Para este método se utiliza un compuesto inerte o marcador que no sea digerido y/o absorbido por el intestino del organismo. Puede ser añadido a la dieta y/o estar presente naturalmente en alguno de los ingredientes de la dieta (i.e., fibra, cenizas insolubles). Así mismo, el marcador no debe, ser tóxico, no tener efectos fisiológicos, no debe de ser absorbido ni metabolizado en su paso por el tracto digestivo, no debe tener influencia sobre la digestión, absorción, motilidad del tracto digestivo o sobre la excreción, no debe tener efecto sobre la microflora del tracto digestivo de importancia para el hospedero y sobre todo debe tener cualidades que permitan su medición precisa (Kotb y Luckey, 1972). El marcador más frecuentemente utilizado en estudios de nutrición con peces es el óxido crómico (Edin, 1918) que es incorporado al alimento y luego analizado en la dieta y en las heces. Sin embargo existen otros marcadores de la familia de tierras raras, siendo Lantano, Samario e Yterbio de los más conocidos, y otros como Rutenio y Fenantroina.

La cuantificación de la digestibilidad del nutriente se basa en la medición proporcional del nutriente (i.e., proteína, energía, etc.) en el alimento con respecto al marcador inerte. Así mismo se cuantifica la cantidad del nutriente en las heces (i.e., aquel que no fue digerido y absorbido durante su paso por el tracto digestivo y finalmente es excretado en las heces) y expresado en relación al marcador excretado en las heces. Por lo tanto la porción absorbida es calculada por la diferencia entre el nutriente ingerido y el excretado, a esta proporción del nutriente la expresamos como Coeficiente de Digestibilidad Aparente (CDA).

Para la determinación de la **digestibilidad del alimento** se utiliza la siguiente fórmula (CDA = Coeficiente de Digestibilidad Aparente):

$$\text{CDA} = 100 - 100 \frac{\% \text{ Cr}_2\text{O}_3 \text{ en alimento}}{\% \text{ Cr}_2\text{O}_3 \text{ en heces}} \times \frac{\% \text{ nutriente en heces}}{\% \text{ nutriente en dieta}}$$

Ventajas

Entre las ventajas de las técnicas para evaluar la digestibilidad in vivo podríamos mencionar que estas nos permiten evaluar la digestibilidad del alimento vivo como el de las dietas formuladas. Por lo general los CDA son valores de digestibilidad que se acercan más a los valores reales de digestibilidad y a los valores nutricionales del ingrediente. Otra ventaja es que el ingrediente a evaluar puede ser más aceptable para el pez cuando se encuentra en combinación con otros ingredientes que si ofreciera individualmente.

Desventajas

La principal desventaja de cuantificar la digestibilidad in vivo utilizando el método directo es la necesidad de cuantificar con exactitud la totalidad del material fecal excretado por los peces y determinar con exactitud el consumo de alimento. Estos dos parámetros son difíciles de obtener con exactitud en organismos acuáticos ya que se encuentran en un medio acuoso que tiende a lixiviar los nutrientes del alimento y heces. Sin embargo este problema se puede reducir utilizando el método indirecto.

Adicionalmente, no todos los elementos excretados corresponden a los nutrientes ingeridos en el alimento ya que las heces pueden contener material endógeno que es acarreado por el bolo alimenticio y excretado junto con las heces. Por lo tanto la

estimación de la digestibilidad puede llevarnos a subestimar la digestibilidad de algunos nutrientes, sobre todo cuando los niveles de estos nutrientes son muy bajos en el alimento (i.e, vitaminas y minerales).

Otra de las desventajas de éste método, es la lixiviación que sufren las heces al estar en contacto con agua circulante. Como es muy difícil evitar 100% las pérdidas por lixiviación, es necesario ser muy uniforme en la realización de todos los procedimientos de manera que todas las muestras sufran el mismo grado de lixiviación y los resultados continúan siendo válidos, porque son comparativos.

2.2.2. Digestibilidad *in vitro*

Características

Debido a las dificultades que se tienen en la evaluación de la digestibilidad proteica *in vivo*, se han desarrollado diferentes metodologías para cuantificar la digestibilidad *in vitro*. Estas metodologías pretenden simular las condiciones fisiológicas que existen en el intestino durante la digestión en un tubo de ensayo. Por lo general son menos costosas, su evaluación es sencilla, son reproducibles, confiables y proporcionan resultados rápidos.

Existen distintas técnicas para evaluar la digestibilidad proteica *in vitro* que por lo general varían en el tipo de enzimas empleadas, las condiciones de hidrólisis y la forma de cuantificar los productos generados por la digestión (Ezquerro-Brauer, 1997). La mayoría intentan reproducir el ambiente bioquímico y fisiológico (pH, temperatura, tiempo de residencia intestinal, secuencia enzimática) presente en el tracto

gastrointestinal del organismo bajo estudio durante la digestión (Grabner, 1985; Bassompierre *et al.* 1997;)

Dentro de las técnicas para evaluar la digestibilidad *in vitro* destacan el pH-Drop y el pH-Stat. En el método pH-Drop se cuantifica la reducción del pH causada por la liberación de hidrógeno durante la ruptura de los enlaces peptídicos entre los aminoácidos que conforman una proteína. Esta digestión es mediada por la acción de enzimas proteolíticas que pueden ser extraídas de la especie de interés o enzimas purificadas de mamíferos y de uso comercial. Este método tiene de limitante que durante la digestión, el pH de la reacción, puede salirse del intervalo óptimo de acción de las enzimas proteolíticas (Alarcón *et al.*, 1999). Para resolver este problema el método del pH-Stat, cuantifica la cantidad de NaOH requerido para mantener constante el pH durante el periodo de digestión del ingrediente/dieta con la enzima por medio de un titulador automático altamente preciso (Alarcón *et al.*, 1999)

Adicionalmente se han desarrollado otros métodos para evaluar la digestibilidad *in vitro* de fuentes proteicas en peces. Estos métodos se basan en la cuantificación de los aminoácidos liberados después de la digestión enzimática o la determinación del porcentaje de nitrógeno soluble después de la acción enzimática. Otro método muy sencillo, pero no tan preciso, es aquel que cuantifica la cantidad de aminoácidos aromáticos (a una longitud de onda de 280 nm) liberados después de la digestión y precipitación con ácido tricloroacético. (Lan y Pan, 1999).

Ventajas

Los métodos *in vitro* para evaluar la digestibilidad son útiles porque son usualmente rápidos, sencillos y menos costosos que lo métodos de digestibilidad *in vivo* (Ezquerro., *et al* 1999).

Las técnicas de digestibilidad *in vitro* permiten cuantificar el grado de hidrólisis de las proteínas sometidas a la acción de enzimas comerciales o extractos de los propios organismos, como una estimación de su biodisponibilidad (Haard, 1993; Alarcón *et al.*, 1999).

Por otro lado se puede cuantificar en tiempo real los productos de la digestión y el efecto de los ingredientes sobre la actividad enzimática.

Desventajas

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.

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). Es por esto que este método podría llegar a subestimar el valor nutricional de algunos ingredientes y dietas que por estar previamente hidrolizadas pudieran tener una alta biodisponibilidad.

Actualmente la digestibilidad *in vivo* es la mejor opción para realizar estudios de digestibilidad ya que se aproximan mas al valor nutricional real de los ingredientes. Sin embargo se requieren desarrollar métodos *in vitro* para incrementar rápidamente el conocimiento sobre la digestión en especies acuáticas.

Estudios de nutrición en *Seriola sp.*

Se han realizado estudios evaluando las condiciones de cultivo de varias de las especies del género *Seriola sp.* del Pacífico como en el Atlántico (Nakada, 2000, Avilés–Quevedo, 2004), sin embargo solo se enfocan a densidades de siembra, tipo y tamaño de corrales, temperaturas óptimas entre otros aspectos.

No se encontraron muchos estudios evaluando la digestibilidad de ingredientes en peces del género *Seriola*. Entre los que podemos mencionar destaca el estudio de Masumoto (1996) evaluando la digestibilidad aparente de diferentes harinas de origen animal y vegetal en el Jurel Japonés (*S. Quinquerradiata*). Los valores de CDA obtenidos en este estudio van desde los 49.7 % para gluten de maíz hasta 95.4% para la caseína.

Sin embargo, si se han realizado varios estudios determinando los coeficientes de digestibilidad aparente de ingredientes en otras especies de peces marinos y anádromos, como la corvina roja *Sciaenops ocellatus* (McGoogan, 1996) concluyendo que se obtuvieron mejores coeficientes de digestibilidad en ingredientes de origen animal que en ingredientes de origen vegetal, sin embargo menciona que la harina de soya es un buen ingrediente para la elaboración de piensos para esta especie, Sullivan(1995) trabajando con Lubina estriada, *Morone saxatilis*, obtuvo coeficientes de digestibilidad de proteína muy altos(71-93%) evaluando harinas de pescado, harinas de sangre, harina de carne y hueso, harina de soya, harina de maíz, harina de trigo, sin embargo menciona que esta especie tiene un mejor aprovechamiento cuando los ingredientes tienen un alto contenido de proteínas y lípidos que los ingredientes que

contienen alto contenido de carbohidratos y fibra, Por otra parte, Lupatsch,(1997) con *Sparus aurata* observó que los coeficientes de digestibilidad aparente de proteína difieren de la digestibilidad aparente por aminoácidos, lo cual indica que el coeficiente de digestibilidad proteica no es un buen indicador para ver la disponibilidad de aminoácidos.

Watanabe (2000) realizó estudios en la misma especie para determinar los valores de proteína y energía que resultaran en un máximo crecimiento. Así mismo, se evaluó el efecto de diferentes frecuencias de alimentación. Sus resultados indicaron que un nivel proteico de 21.7g/proteína con un nivel de energía de 225 kcal/kg de peso vivo alimentados a saciedad. Sin embargo en 2002 realizó estudios sobre los requerimientos de proteína, energía y frecuencia alimenticia en *Seriola quinqueradiata* durante el invierno obteniendo resultados de 38.7 kcal y 2.8 g/kg de su peso vivo por día a un rango de temperatura de 14.3-17.3°C, observando que en temperaturas más bajas su requerimiento es mayor de energía no así de proteína.

Jover (1999) realizó estudios evaluando el efecto del nivel de proteína y lípidos en las dietas para *S. dumerilli*. Sus resultados indican que las dietas con un nivel de 50% proteína resultaron en el mejor crecimiento y sobrevivencia. Sin embargo, no encontró un efecto positivo en los parámetros evaluados por el nivel de lípidos en la dieta.

No se encontraron muchos estudios realizados con jurel cola amarilla *Seriola lalandi*, Destacan los estudios de Chen y colaboradores que ha caracterizado y descrito la ontogenia del sistema digestivo en larvas (Chen et al., 2006a) y la ontogenia de algunas enzimas digestivas (Chen et al., 2006b) Así mismo, recientemente se caracterizó el perfil enzimático en larvas de jurel cola amarilla del Pacífico (*Seriola lalandi dorsalis*) (Montes, 2007). Estos datos fueron tomados como referencia para implementar la técnica de pH-STAT en juveniles de Jurel.

3. Justificación

El propósito del presente estudio fue evaluar la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* de algunas fuentes proteicas en juveniles de jurel, *Seriola lalandi* con el fin de generar información para formular y desarrollar dietas adecuadas para la engorda de los juveniles de esta especie.

Actualmente existen dietas formuladas para las especies del genero *Seriola*, pero manufacturadas en otros países y con insumos de cada localidad lo que hace muy costoso importarlas para ser utilizadas en la engorda del Jurel cola amarilla en México. Así mismo, no se cuenta con dietas específicas para esta especie cultivada bajo las condiciones ambientales locales, por lo que formular dietas especie-específicas con la tecnología e insumos de la industria local, abarataría los costos de producción para esta especie en particular.

4. Objetivos

4.1. Objetivos generales

Desarrollar un método de digestibilidad proteica *in vitro* para seleccionar fuentes proteicas para la engorda de juveniles de jurel cola amarilla del Pacífico (*Seriola lalandi dorsalis*).

4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Digestibilidad in vivo

Determinar los coeficientes de digestibilidad *in vivo* de ingredientes con potencial para ser incluidos en dietas para engorda de juveniles de jurel.

4.2.2. Digestibilidad in vitro:

Determinar la digestibilidad *in vitro* de ingredientes con potencial para ser incluidos en dietas para engorda de juveniles de jurel.

4.2.3. Correlacionar in vivo vs. in vitro:

Evaluar la correlación de los resultados obtenidos mediante métodos *in vitro* y métodos *in vivo*.

5. Hipótesis

- 5.1. Los coeficientes de digestibilidad de los ingredientes evaluados por el método de digestibilidad *in vitro* serán similares a los coeficientes de digestibilidad de los ingredientes obtenidos mediante el método *in vivo*
- 5.2. Dada la naturaleza carnívora del jurel, los ingredientes de origen animal en este caso harinas de pescado y harina de kril tendrán una mayor digestibilidad que los de origen vegetal (harina de soya, gluten de maíz y gluten de trigo).

6. Material y métodos

6.1. Procedencia de los organismos y sistema de cultivo

Se obtuvieron juveniles de jurel cola amarilla del Pacífico (*S. lalandi dorsalis*) provenientes del laboratorio de cultivo de peces marinos del Hubbs Sea World Research Institute, San Diego, California en los E.E.U.U. Los juveniles fueron transferidos en agua de mar dentro de contenedores de aproximadamente 2500 L a 20° C, suplementado con oxígeno puro inyectado directamente al agua.

Al llegar al CICESE, los juveniles fueron colocados en dos tanques de fibra de vidrio de flujo rápido (“tipo raceways”) de 4500 litros en el laboratorio de cultivo de peces marinos del Departamento de Acuicultura. Se mantuvieron en estos tanques durante 15 días como medida de cuarentena. Durante este periodo los peces fueron alimentados con dieta comercial (Aqua Excel, Burris, Aquaculture of specialty feed, Quality feeds).

Una vez terminada la cuarentena, los organismos fueron trasladados a la unidad experimental del Laboratorio de Nutrición Acuícola en el laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura. Allí fueron colocados en un sistema cerrado de 12 tanques de fibra de vidrio con capacidad de 220 litros cada uno. Se utilizó un flujo de recambio de agua salada a razón de 60 ml/s y aireación constante mediante piedras difusoras de 5 cm conectadas a un tubo de vinyl. El aire fue provisto por un compresor de aire. El sistema de recirculación de la unidad experimental constaba de un biofiltro de cuentas de 0.6096 m³ (2 ft³) Bubble bead filter , BBF2P, modelo # 5232586,(USA) con una lámpara U.V. Pentair Aquatics, modelo QL-25 (USA) y una bomba de agua

Flo- Master HP modelo 02010000-1(Chino, CA). Los tanques fueron cubiertos con una malla pesquera de 1cm de diámetro para evitar que los organismos saltaran del tanque.

En cada unidad experimental se colocaron 5 organismos, saludables seleccionados al azar intentando tener uniformidades de talla y peso (aproximadamente 197 g por pez).

6.2. Calidad de agua

Las concentraciones de oxígeno disuelto, salinidad y temperatura del agua fueron tomadas cada mañana con un equipo portátil multi paramétrico (YSI 85., modelo 85/10FT, Yellow Springs USA). Otros parámetros de calidad de agua como pH y amonio total fueron tomados semanalmente con kits de medición (API., modelo LR8600, Chalfont, PA, USA).

Tabla 1. Parámetros calidad de agua (\pm desviación estándar)

Parámetro	promedio (\pm DS)
Temperatura (°C)	20.01 \pm 0.614
Amonio NAT (mg/L)	<0.25
Salinidad (ppm)	34.15 \pm 5.3
Oxígeno disuelto (mg/L)	5.8 \pm 0.61

6.3. Digestibilidad *in vivo*

6.3.1. Coeficientes de digestibilidad aparentes (CDA)

Para determinar los coeficientes de digestibilidad de la proteína *in vivo* de los ingredientes a evaluar, se empleo el método indirecto utilizando oxido crómico (Cr₂O₃) como indicador (Cho, 1979). Para este propósito se formulo una dieta basal o de

referencia en la cual se estimó la digestibilidad del nutriente de interés (i.e., proteína). Posteriormente, la dieta basal fue combinada con cada uno de los ingredientes a evaluar en una proporción del 70% -30% (dieta basal : ingrediente) a las que llamamos dietas experimentales.

Se determinó la digestibilidad del nutriente de la dieta basal y las dietas experimentales y por medio de diferencia de la digestibilidades entre estas dos dietas, se obtuvo la digestibilidad del nutriente en el ingrediente.

Para la determinación de la digestibilidad del alimento se utilizó la siguiente fórmula (CDA = Coeficiente de Digestibilidad Aparente):

$$CDA = 100 - 100 \frac{\% Cr_2O_3 \text{ en alimento}}{\% Cr_2O_3 \text{ en heces}} \times \frac{\% \text{ nutriente en heces}}{\% \text{ nutriente en dieta}}$$

Así mismo, se determinó el Coeficiente de Digestibilidad aparente del ingrediente por medio de la fórmula propuesta por Forster (1999).

$$CDAN = [(a + b) \times CDA_{com} - (a) \times CDAN_{ref}] b^{-1}$$

Donde **a** es el nivel de nutriente en la dieta de referencia multiplicado por 0.7, **b** es el nivel de nutriente en la dieta experimental multiplicado por 0.3, **CDA_{com}** es el coeficiente de digestibilidad aparente del nutriente en la dieta experimental; **CDAN_{ref}** es el coeficiente de digestibilidad aparente del nutriente en la dieta referencia.

6.4. Digestibilidad *in vitro*

6.4.1. Preparación de los extractos enzimáticos

Al terminar los biosensayos de digestibilidad *in vivo* se tomó una muestra de 2 juveniles por cada tanque y se sacrificaron con una sobredosis de anestesia (Aceite de

clavo). A cada juvenil muestreado se le realizó la disección del sistema digestivo, que incluya el estómago, intestino y ciegos pilóricos. Las disecciones se realizaron bajo una tabla de acrílico 45 x 45 cm, colocados en bolsas de plástico resellables sobre hielo con el fin de mantener el sistema digestivo a baja temperatura durante la disección. Posteriormente se maceró hasta obtener una masa homogénea. Cada muestra, proveniente de la disección se homogenizó en una proporción 2:1 (volumen: peso) con 10 ml de agua desionizada, utilizando un homogenizador de tejidos. Los homogenizados se centrifugarán a 1600 g durante 30 min y a 4 °C, en una centrifuga Eppendorf 5415R. El sobrenadante se utilizó como extracto enzimático y se colocaron en tubos de 1.5mL, se almacenaron a -70°C para su posterior análisis.

6.4.2. Cuantificación de la actividad proteolítica alcalina de los extractos enzimáticos

La actividad proteolítica alcalina total de los extractos enzimáticos de juveniles de jurel, se cuantificó mediante el método de Kunitz (1947) modificado por Walter (1984) y utilizado en peces marinos por Alarcón (1997) empleando como sustrato caseína.

Se inició la reacción adicionando 500 µL de caseína al 0.5% en una solución amortiguadora 50 mM Trizma Base-HCl, 10 mM CaCl₂, pH 8.0 a 10µL de extracto enzimático. Se incubó durante 30 minutos la reacción a 37 °C y se detuvo adicionando 250µL de una solución de ácido tricloroacético al 20%. La muestra se dejó reposar por 30 minutos a 4 °C y posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm por 5 min a 22 °C. Los sobrenadantes se separaron y se registró su absorbancia a una longitud de onda (λ) de 280 nm con un espectrofotómetro (Spectronic®, Genesys 2, Rochester, NY)

6.4.3. Digestibilidad *in Vitro* por pH-STAT

El grado de hidrólisis de la proteína se evaluó por medio del método pH-STAT, usando extracto de enzimas provenientes de juveniles de jurel cola amarilla. El grado de hidrólisis se calculó usando la siguiente fórmula:

$$GH\% = B \times N_B \times 1/\alpha \times 1/M_p \times 1/h_{tot} \times 100\%$$

Donde B es la suma en mililitros de solución 0.1 mol / l NaOH consumido para mantener la reacción a un pH 8.0, N_B es la normalidad de la solución NaOH, en este trabajo fue de 0.1N; α es el grado promedio de disociación de los grupos α -aminoácidos liberados durante la hidrólisis, determinado por la ecuación $\alpha = (10^{pH-pK}) / (1 + 10^{pH-pK})$ siendo pK valores dependientes de la temperatura y tamaño del péptido (Navarrete del Toro y García-Carreño, 2002). Así, el valor de $1/\alpha$ es el factor de calibración de α para el pH- STAT, que de acuerdo a Adler-Nissen (1986) en un pH de 8.0 y cercana a 40°C, $1/\alpha = 1.50$; M_p sería la masa proteica cruda en la mezcla de reacción, estimada al multiplicar la concentración de nitrógeno (N) obtenido por el método Kjeldahl multiplicado por un factor de conversión adecuado (f_N); y h_{tot} es el contenido total de enlaces peptídicos en la proteína (Tabla 2), el cual es expresado como equivalentes de enlaces peptídicos por kilogramo (*miliequivalente* por gramo).

Tabla2. Contenido de enlaces peptídicos para algunas de las fuentes proteicas empleadas en el presente estudio (Adler-Nissen, 1986)

Fuente proteica	h_{tot} en meq / g
Pescado	8.6
Soya	7.8
Gluten de trigo	8.3
Maíz	9.2

Para determinar los valores de auto-hidrólisis de los ingredientes, se utilizó la metodología antes descrita, pero los extractos enzimáticos digestivos de juveniles de jurel fueron reemplazados por agua destilada. Los valores de Grado de Hidrólisis (GH) fueron expresados como un porcentaje de aquellos obtenidos al emplear los extractos enzimáticos digestivos (Alarcón *et al.*, 2002)

6.4.4. Formulación de dietas

Las fuente proteicas a evaluar fueron seleccionadas en con base a su perfil nutrimental, su frecuencia en la formulación de dietas para peces marinos y su disponibilidad en la región. Se seleccionaron; Harina de soya, Gluten de maíz, Gluten de trigo, Harina de pescado y Harina de krill. En la tabla 3 se enlistan las fuentes de los ingredientes utilizados para el presente estudio. Adicionalmente, se evaluaron dos harinas de pescado elaboradas por diferentes productores y de diferente calidad. La intención de esta comparación fue la de evaluar si el método de digestibilidad *in vitro* tenia la capacidad de detectar diferencias entre la calidad de estas harinas.

Tabla 3. Ingredientes a evaluar en los métodos *in vivo* e *in vitro* y su origen.

Ingrediente	Origen
Harina de pescado	Insumos Baja California, México
Harina de pescado	Harinas Guaymas, México
Harina de krill	Skretting, Vancouver, Canadá
Gluten de maíz	CPIngredientes, México
Pasta de soya	PADSA, México.
Gluten de Trigo	Frazier Farms, CA, USA.

La dieta de referencia fue formulada (tabla 4) con base en los requerimientos nutricionales de jurel cola amarilla (*Seriola lalandi*) y de jurel japonés (*Seriola quinqueradiata*) según lo reportado por Masumoto (2002). Las dietas experimentales contenían 70% de la dieta referencia y 30 % del ingrediente a evaluar.

Tabla 4. Formulación de la Dieta Referencia y de la Dieta Experimental para la determinación de coeficientes de digestibilidad en jurel cola amarilla.

Ingrediente	Dieta Referencia (% peso seco)	Dieta Experimental 70:30 (% peso seco)
Harina pescado	35	24.5
Harina de kril	15	10.5
Harina de soya	12.5	8.75
Gluten de trigo	12.5	8.75
soluble pescado	1	0.7
aceite de pescado	8	5.6
almidón	3	2.1
Vit. C	0.5	0.35
vitaminas	2.5	1.75
minerales	2	1.4
Oxido Crómico	1	1
Gelatina	7	4.9
Ingrediente evaluar		30

Los ingredientes fueron tamizados en una malla de ≤ 0.5 mm. Los ingredientes secos fueron pesados en una balanza analítica y mezclados en una mezcladora (Robot

coupe USA modelo R10) por 5 minutos. Una vez mezclados se agregaron solubles de pescado y aceite de pescado junto con el óxido crómico, por último se agregaron almidón y gredina y se mezcló por 5 minutos.

Una vez mezclados todos los ingredientes se pasaron por un pelletizador (Torrey) y se colocaron sobre mallas charolas de 55 x 25 y se secaron en una estufa a 70°C por 12 hrs.

Una vez secas las dietas se procedió a triturarlas de forma manual hasta obtener un tamaño de partícula de aproximadamente 0.5 cm y se empacaron en bolsas de plástico. Finalmente fueron colocadas en un congelador < -4°C hasta su utilización durante el experimento.

6.5. Bioensayo

Para permitir que los peces se aclimataran y/o adaptaran a las dietas experimentales, se administraron por 10 días a una tasa del 3 % de su peso vivo. Una vez transcurrido el periodo de aclimatación, se inició la recolecta de las heces de los organismos, mediante la técnica de presión abdominal “stripping” (Nose, 1960). Esta técnica consiste en extraer las heces mediante un masaje abdominal, en la parte última del intestino colocando al pez sobre la palma de la mano en posición ventral, caudo craneal. Se realizó la colecta de heces cada 3 días hasta obtener por lo menos 500 mg en peso seco de heces. Los organismos fueron removidos a una tina de 100 litros con aireación constante y anestesiados con Aceite de clavo (SIGMA, C8392) con una dosis de 20 ppm/ 20L. Después de aproximadamente 3 minutos los organismos fueron removidos para realizar la extracción de heces. Las heces fueron colocadas en charolas de aluminio para dejarlas secar por 12 horas en una estufa a 80 °C, una vez secas, fueron pesadas en una balanza y congeladas en bolsas de plástico hasta su análisis químico.

Para determinar la cantidad de oxido crómico en las dietas y en las heces se utilizó el método descrito por Furokawa (1965) que se base en oxidar completamente el óxido crómico presente en las dietas o en las heces utilizando ácido nítrico al 90% y ácido perclórico al 70% . Posteriormente la concentración de iones de dicromato producidos por la oxidación es cuantificada colorimétricamente a una longitud de onda de 350 nanómetros por medio de un espectro (DU®800, Beckman Coulter).

6.6. Análisis proximal de las dietas e ingredientes

La cantidad de proteína cruda de los ingredientes y las dietas fue cuantificada mediante el método Kjeldahl (usando el factor de conversión 6.5 x % N cuantificado). El contenido de lípidos totales fue cuantificado empleando la metodología de extracción de lípidos mediante solventes (A.O.A.C. 1990) .Se utilizo éter de petróleo como solvente en un aparato Goldfish (Soxhlet). El contenido de humedad se cálculo cuantificando la perdida de peso de las muestras tras un proceso de secado a una temperatura de 80°C por 24 hrs. Las cenizas fueron cuantificadas después de quemar toda la materia orgánica por medio de ignición a una temperatura de 480°C por 6 horas (A.O.A.C. 1990). En la tabla 5 y 6 se presentan los resultados del análisis proximal de las harinas y dietas utilizadas para el estudio de digestibilidad *in vivo* respectivamente.

Tabla 5. Análisis proximal de las harinas empleadas para la elaboración de dietas.

	HPG	HPBC	HK	HS	GM	GT
Proteína	65.75	64.53	53.03	37.94	79.06	77.89
Lípidos	17.03	16.92	26.82	22.59	17.12	18.69
Humedad	3.12	3.91	2.65	0.20	7.97	6.04
Cenizas	16.8	17.38	15.98	12.96	11.49	10.69

HPG Harina de pescado, Guaymas, HPBC Harina de pescado Baja California, HK Harina de Krill, HS Harina de soya, GM, Gluten de maíz, GT, Gluten de trigo

Tabla 6. Análisis proximal de la dieta referencia y experimentales empleadas en el presente estudio.

	DR	GT	HS	GM	HP	HK
Proteína	53.9	58.4	47.4	56.7	54.4	51.7
Lípidos	18.3	11.4	20.6	20.2	13.1	14.5
Humedad	2.2	4.7	1.8	1.6	2.3	1.9
Cenizas	16.2	10.7	13.0	11.5	17.4	16.0

DR Dieta Referencia, GT Gluten de trigo, HS Harina de soya, GM Gluten de maíz, HP Harina de pescado HK Harina de kril

6.7. Análisis estadístico de los datos

Los coeficientes de digestibilidad aparente y los Grados de hidrólisis fueron analizados por medio de un análisis de varianza (ANOVA $P \leq 0.05$) de una vía, para determinar diferencias entre dietas e ingredientes evaluados. Se realizó una prueba t en la metodología *in vitro* para comparar las dos harinas de pescado. Los datos que estuvieran expresado en porcentaje fueron transformados con la función arcoseno ($x^{1/2}$) antes de su análisis. Se realizó la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov y la prueba de Bartlett para evaluar la homogeneidad de varianzas. En los casos donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas, se realizó la prueba de Tukey para identificar las diferencias significativas entre las medias.

Se hizo una correlación de Pearson con los resultados obtenidos en los métodos *in vivo* e *in vitro*.

Para análisis estadístico se utilizó el software estadístico *STATISTICA 6.0*™. (StatSoft, Inc. USA)

7. Resultados

7.1.1. Digestibilidad *in vivo* de las diferentes dietas e ingredientes empleadas en juveniles de jurel.

7.1.1.1. Digestibilidad *in vivo* de las dietas

En el presente estudio se estimaron por primera vez los coeficientes de digestibilidad aparente de proteína cruda (CDA-PC) y Materia seca (CDA-MS) en algunas fuentes de proteína para dietas del jurel cola amarilla del Pacífico (*S. lalandi*). Aunque los valores obtenidos en CDA-PC fueran algo diferentes, no se encontraron diferencias significativas entre los CDA-PC de las dietas experimentales que contenían Harina de pescado (83.6%), Harina de kril (85.6%), Gluten de maíz (74.2%), Gluten de trigo (86.3%) y la dieta de referencia (88.6%). Sin embargo, el CDA-PC de la dieta experimental que contenía 30 % de Harina de soya (48.9%) fue significativamente inferior a las otras dietas (Ver Tabla 6).

El coeficiente de digestibilidad aparente de la materia seca (CDA-MS) fue más alto para la Dieta Referencia (71.8%) sin embargo no se encontró diferencia significativa con respecto a las dietas experimentales de Harina de Pescado (61.3%), Harina de Krill (64.7%) y Gluten de Trigo (58%). Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas en entre los valores de CDA-MS de las dietas Harina de soya (49%) y Gluten de maíz (47.3%) siendo estas las de menor CDA-MS. A su vez no se encontró diferencia significativa en CDA-MS entre la dieta elaborada con Gluten de trigo respecto a Harina de soya y Gluten de maíz (Ver tabla 6).

Tabla 6. Coeficientes de digestibilidad aparente (\pm DE) para proteína cruda (PC) y materia seca (MS) de las dietas empleadas.

Dieta	CDA PC % \pm DS	CDA MS % \pm DS
Dieta referencia (DR)	88.6 \pm 1.3 ^b	71.8 \pm 3.1 ^b
70% DR+ 30% HP	83.6 \pm 1.5 ^b	61.3 \pm 6.6 ^b
70% DR + 30% HK	85.6 \pm 1.2 ^b	64.7 \pm 0.8 ^b
70% DR + 30% HS	61.6 \pm 16.1 ^a	49.0 \pm 13.8 ^a
70%DR + 30% GM	74.2 \pm 0.7 ^b	47.3 \pm 5.2 ^a
70%DR + 30% GT	86.3 \pm 0.7 ^b	58.0 \pm 3.9 ^{a,b}

Las letras indican diferencia significativas a $p \leq 0.05$.

DR Dieta Referencia, GT Gluten de trigo, HS Harina de soya, GM Gluten de maíz, HP Harina de pescado HK Harina de kril

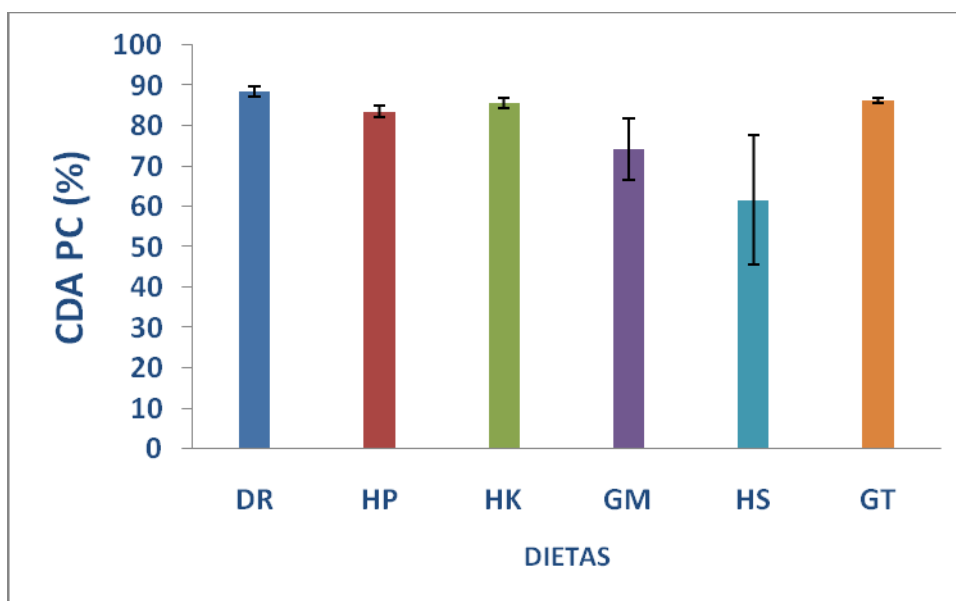


Figura.3 Coeficientes de digestibilidad aparente de proteína cruda (CDA PC %) de las diferentes dietas.

Las barras de error representan la desviación estandar de la media (n=4).

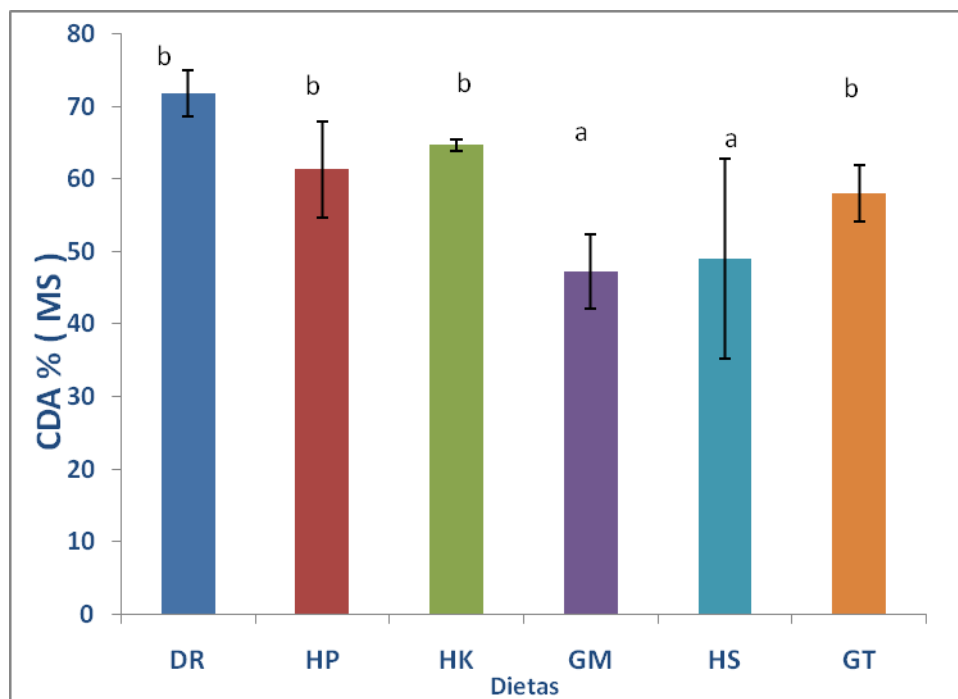


Figura.4 Coeficientes de digestibilidad aparente de la materia seca (CDA MS %) de las dietas. Las barras de error representan la desviación estandar de la media (n=4). Las letras indican diferencias estadísticas $p < 0.05$

7.1.1.2. Digestibilidad in vivo de los ingredientes

Respecto a los valores obtenidos de los coeficientes de digestibilidad de proteína cruda (CDA-PC) de los ingredientes, el gluten de trigo fue de todos los ingredientes el que mayor CDA-PC (82.5%). Pero no se encontraron diferencias significativas entre el Gluten de trigo, las harinas de krill (78.7%) y la harina de pescado (73.9%). Sin embargo, si se encontró diferencia altamente significativa ($p < 0.00003$) con el Gluten de maíz (51.3%) siendo este el ingrediente de menor CAD-PC (Ver tabla 7).

Respecto a los datos obtenidos de los coeficientes de digestibilidad de Materia Seca (CDA-MS) de los ingredientes, el harina de Krill fue la que mayor CDA obtuvo (48.03%) sin embargo no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) respecto a la harina de pescado (38.59%) y Gluten de trigo (28.70%) (Ver tabla 7).

Tabla 7. Coeficientes de digestibilidad aparente (\pm DE) para proteína cruda (PC) y Materia seca (MS) de los ingredientes utilizados.

Ingrediente	CDA PC % \pm DS	CDA MS % \pm DS
Harina de pescado	73.94 \pm 4.29 ^b	38.59 \pm 19.39 ^a
Harina de krill	78.7 \pm 4 ^b	48.03 \pm 2.5 ^a
Gluten de maíz	51.3 \pm 19.9 ^a	NE
Gluten de trigo	82.5 \pm 1.7 ^b	28.70 \pm 8.81 ^a
Harina de Soya	21.20 \pm 13.60*	NE

Las letras indican diferencia significativas a $p \leq 0.05$. NE coeficientes no se pudieron evaluar. * no se incluyo en el análisis estadístico.

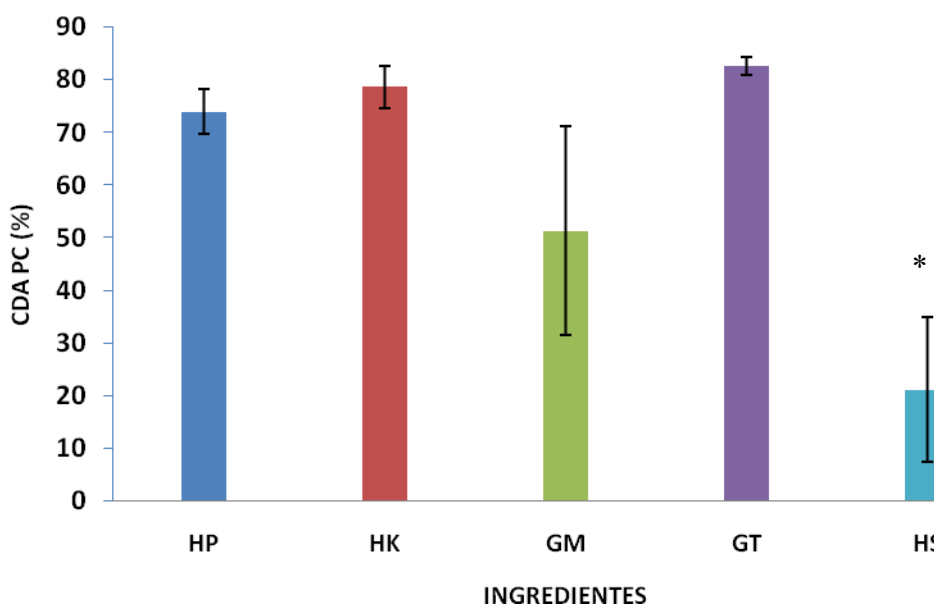


Figura.5 Coeficientes de digestibilidad aparente de proteína cruda(CDA PC %) de los diferentes ingredientes. Las barras de error representan la desviación estandar de la media (n=4). *No se incluyo en el análisis estadístico.

Cabe mencionar que no se pudo realizar el análisis de CDA PC de la harina de soya debido a que no se contaba con datos suficientes para realizar los cálculos por lo que se decidió no incluir en el análisis estadístico

7.2. Digestibilidad *in vitro* de los diferentes ingredientes y dietas.

7.2.1. Digestibilidad *in vitro* de los ingredientes

Los valores de digestibilidad proteica *in vitro* expresados como grado de hidrólisis (GH%) variaron de 1.50 % a 4.54%. Se detectaron diferencias significativas ($p=0.003$) entre las harinas a evaluar. El grado de hidrólisis de la harina de soya resulto significativamente menor que el de las Harinas de pescado de Baja California (HPBC), Harina de kril (HK) y Gluten de maíz (GM). Así mismo no se encontraron diferencias significativas entre la HPBC y HK y GM. Ver figura 9.

Es preciso comentar que no se logro realizar la hidrólisis de la harina de Gluten de trigo (GT) mediante la metodología de digestibilidad *in vitro* utilizada en el presente estudio. Aunque se hicieron grandes esfuerzos y se evaluaron varias técnicas para disolver el ingrediente en el buffer utilizado para su digestión *in vitro*, no se logro solubilizar adecuadamente esta fuente proteica.

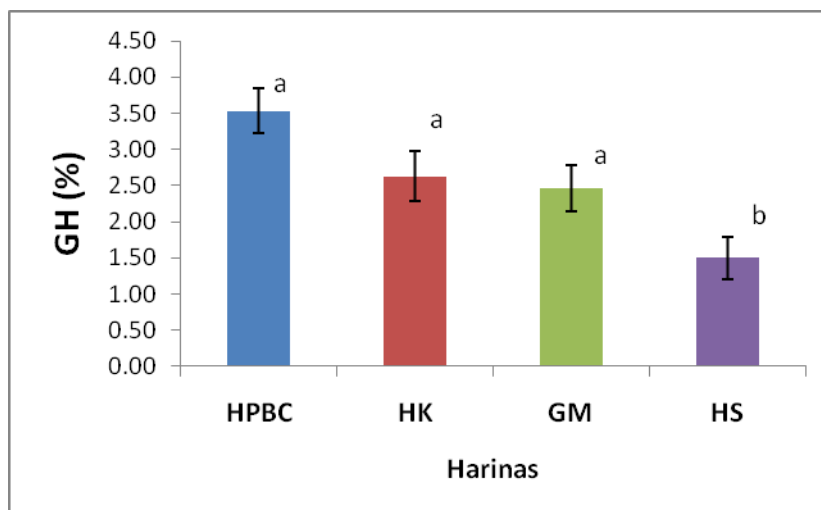


Figura. 9 Grado de hidrólisis (GH %) de las fuentes proteicas utilizando extractos enzimáticos de juveniles de jurel. Tiempo de reacción de la hidrólisis:60 min. Las barras de error representarn la desviación estandar de la media (n=3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p \leq 0.05$

Por su parte, la técnica del pH-STAT arrojó diferencias significativas en los valores de GH entre las dos harinas de pescado evaluadas. El GH de la harina de pescado de Guaymas (4.64%) resulto ser significativamente mayor que el GH de la harina de pescado de Baja California (3..53%) Ver figura 8.

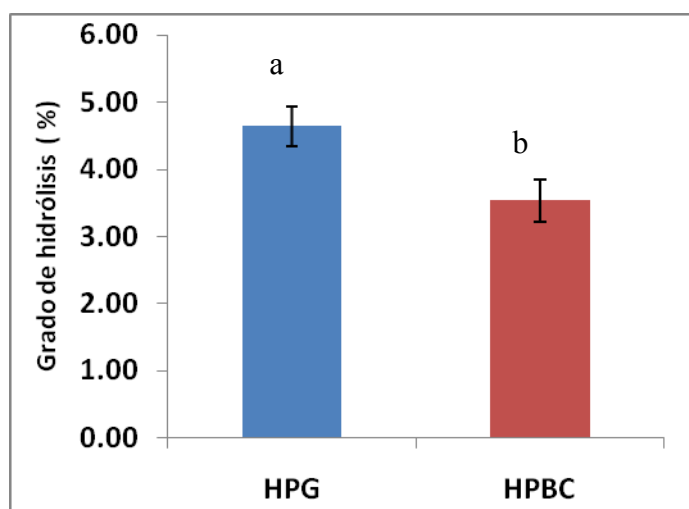


Fig.8 Grado de hidrólisis (GH %) de las fuentes proteicas utilizando extractos enzimáticos de juveniles de jurel. Tiempo de reacción de la hidrólisis:60 min. Las barras de error representarn la desviación estandar de la media (n=3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p \leq 0.05$

7.2.1.1. Digestibilidad in vitro de las dietas

En la figura 10 se representan los resultados de la digestibilidad *in vitro* de las dietas experimentales. Para esta técnica se utilizaron extractos enzimáticos de juveniles de jurel (*S. lalandi dorsalis*) que habían sido alimentados con cada una de las respectivas dietas.

El GH de las dietas evaluadas vario de un GH de 1.01% a 1.27%. Se observaron diferencias significativas entre los GH de las dietas. El GH de la dieta GT resulto ser significativamente menor al de todas las demás dietas, de HK, GM, HPBC, DR y HS. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre las dietas DR, GM, HK y HS. Aunque el GH mas alto obtenido fue el de la dieta HP (1.27%), este no fue significativamente diferente al GH de la dieta HK.

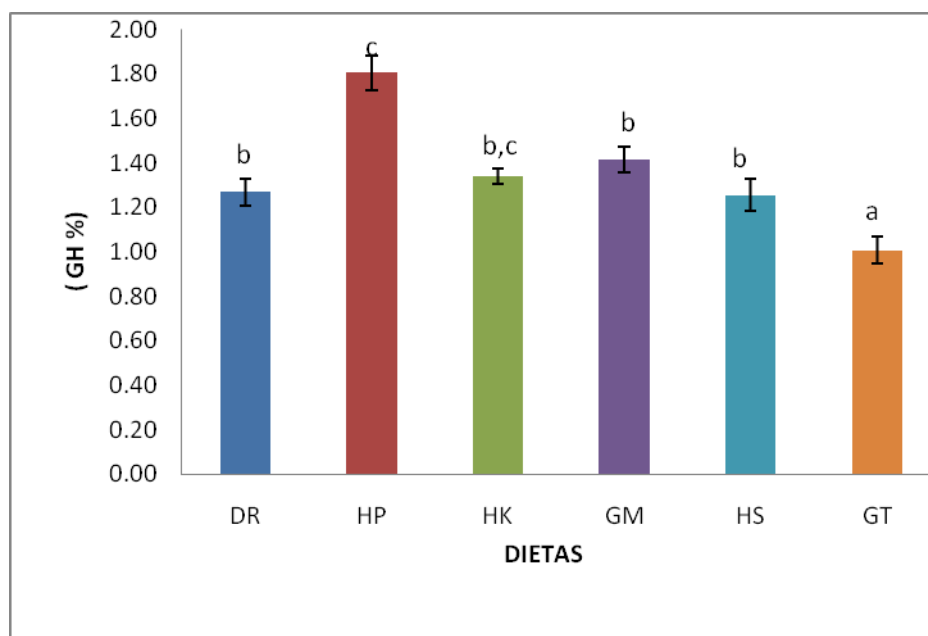


Figura. 10 Grado de hidrólisis (GH %) de las dietas empleadas para cuantificar la digestibilidad in vivo en el presente estudio utilizando extractos enzimáticos de juveniles de jurel. Tiempo de reacción de la

hidrólisis:60 min. Las barras de error representan la desviación estandar de la media (n=3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p \leq 0.05$.

Tabla 8. Diferencias de la digestibilidad proteica *in vivo e in vitro* de los ingredientes empleando juveniles de jurel *S. lalandi*. El símbolo (=) indica que no existen diferencias significativas a $p < 0.05$.

Método	Orden del grado de digestión según el método
CDA PC ingredientes (in vivo)	Gluten de trigo \approx H. Kril \approx H.pescado > G.maiz
Grado de Hidrólisis ingredientes (in vitro)	H. Pescado Guaymas > H. pescado Baja California \approx H. kril \approx Gluten maíz > H. soya

Tabla 9. Diferencias de la digestibilidad proteica *in vivo e in vitro* de las dietas empleando juveniles de jurel *S. lalandi*. El símbolo (=) indica que no existen diferencias significativas a $p < 0.05$.

Método	Orden del grado de digestión según el método
CDA PC dietas (in vivo)	Dieta referencia=Gluten de trigo≈ H. krill= H.pescado = G.maiz < H. soya
Grado de Hidrólisis dietas (in vitro)	H. Pescado >Harina kril≈Dieta Referencia≈Gluten Maíz≈Harina de soya<Gluten de trigo

7.2.2. Correlaciones entre la digestibilidad *in vivo* e *in vitro*

Se encontró una correlación positiva entre CDA *in vivo* y el GH de los ingredientes ($r^2 = 0.7469$), sin embargo por la variabilidad de los datos esta correlación no fue significativa ($p=0.1147$) (Ver figura 6).

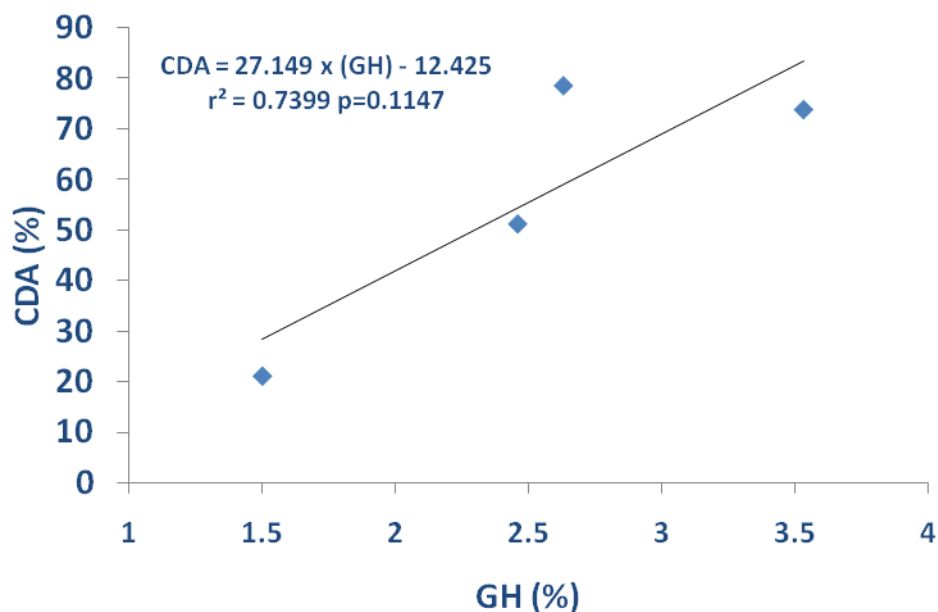


Figura 6. Correlación entre digestibilidad aparente de proteína cruda(CDA PC %) de los diferentes ingredientes y la digestibilidad *in vitro* expresada en grados de hidrólisis (GH).

No se encontró correlación entre la digestibilidad *in vitro* utilizando el método pH-Stat expresada en grados de hidrólisis (GH) y los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) de las dietas. Se estimó una $r^2 = 0.000$ con un valor de $P = 0.9902$. Ver figura 7.

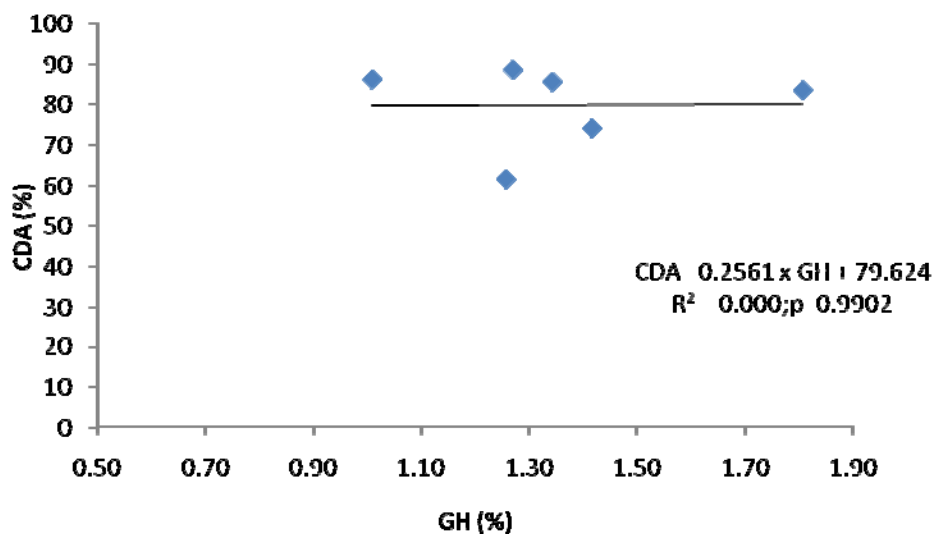


Figura 7. Correlación entre coeficiente de digestibilidad aparente de proteína cruda (CDA PC %) de los diferentes dietas y la digestibilidad in vitro expresada en grados de hidrólisis (GH).

Así mismo, no se encontró correlación entre grado de hidrólisis y CDA-MS ($r^2=0.0015$) y no fue significativa ($p=0.94$) Ver Figura 8.

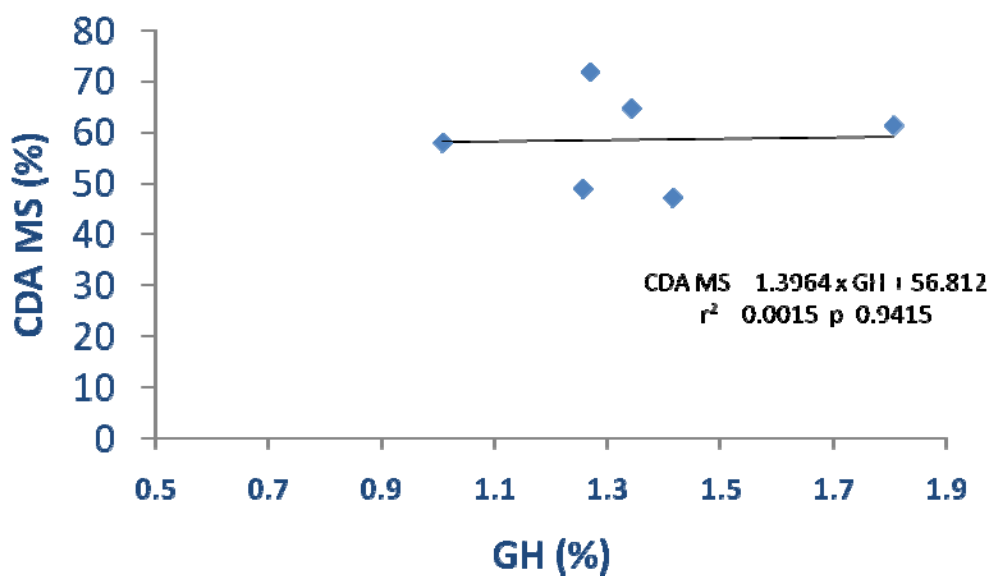


Figura 8 Correlación entre digestibilidad aparente de Materia Seca(CDA MS %) de las diferentes dietas y la digestibilidad in vitro expresada en grados de hidrólisis (GH).

8. Discusión

8.1. Digestibilidad proteica *in vivo* de ingredientes empleados en juveniles de jurel cola amarilla.

Los coeficientes de digestibilidad aparente de la proteína cruda en la Harina de pescado estimados en el presente estudio fueron ligeramente mas bajos (73.94%) que los reportados por otros estudios similares con peces marinos carnívoros. Son muchos los factores (bióticos y abióticos) que pueden reducir la digestibilidad de las fuentes proteicas y pueden estar relacionas a la calidad de la proteína de la harina, a la especie con la que se realizo el estudio, las condiciones de cultivo y/o al método de digestibilidad utilizado.

Por ejemplo, McGoogan (1994) reportó valores de digestibilidad *in vivo* del 95.78% para la corvina Roja (*Sciaenops ocellatus*) y Zhou (2004) estudiando la digestibilidad *in vivo* en juveniles de cobia (*Rachycentrom canadum*) reportó valores de 96.27% para su harina de pescado. Por su parte, Lupatsch (1997) observó digestibilidades *in vivo* de la proteína de 83.13% en la Dorada (*Sparus aurata* L). Estas variaciones tan altas en los coeficientes de digestibilidad *in vivo*, se pueden deber al tipo y frescura del pescado con el que fue elaborada la harina de pescado (i.e., arenque, anchoveta, sardina). Así mismo, al tipo de procesamiento al que fue sometida la harina durante su manufacturación. Por ejemplo, durante el proceso de secado la harina es sometida a calentamiento, que es diferente en cada procesadora, llegando a variar de los 70° C a 100° C. Estas diferencias en la temperatura de secado pueden influir en la digestibilidad de las proteínas y por lo tanto resulta en una harina de pescado que tiene menos aminoácidos disponibles para su digestión (Tacon, 1989, Lupatch, 1997). Es bien conocido que en presencia de azucres y/o aldehídos, ciertos aminoácidos (arginina y

lisina) sometidos a altas temperaturas reaccionan formando compuestos no digeribles en un proceso conocido como Rx de Mallaird

Qi-Cun (2004), en Cobia (*Rachycentron canadum*) observó digestibilidades de 96.27% sin embargo el le atribuye a que las digestibilidades mas altas esta relacionado con la biodisponibilidad de aminoácidos libres de cada ingrediente., Matsumoto (1996) en jurel (*S quinqueradiata*), observo valores de 88.7% observando que la digestibilidad de la proteína se ve influenciada por la biodisponibilidad de aminoácidos, esto nos puede indicar que la digestibilidad de la proteína puede ser influenciada por la biodisponibilidad de los aminoácidos obteniendo que a mayor numero de aminoácidos disponibles mayor será la digestibilidad del ingrediente.

Así mismo, McGoogan (1994) observó que en la corvina Roja (*Sciaenops ocellatus*) la digestibilidad proteica in vivo de las fuentes proteicas se vio afectada por la cantidad de fibra en la dieta y menciona que dietas con alto contenido de fibra (8-12%) reducen la actividad enzimática proteolítica.

Por su parte, Tibbetts (2006) trabajando con el bacalao del atlántico (*Gadus morhua*) observó una digestibilidad alta para la harina de pescado (93.3%). Este autor atribuye su alta digestibilidad al método de colecta de heces que utilizó. Tibbetts recolecto sus heces utilizando una columna de sedimentación con la cual se logra disminuir las perdidas de nutrientes y marcador por lixiviación y además se obtiene una digestión completa comparado con el método de extracción manual de heces a través del masaje abdominal llamado “stripping” como el utilizado en presente estudio.

Los CDA-MS para la harina de pescado obtenidos en nuestro estudio fueron relativamente muy bajos (38%). Estos valores de digestibilidad de la materia seca son inferiores a los valores obtenidos por McGoogan (1994) en la corvina Roja (76.79%) y

los obtenidos por Sullivan (1995) en el híbrido de lubina estriada (*Morone saxatilis* X *M. chrysops*) (83.74%).

La harina de kril resultó tener un alto CDA-PC (78.79%) en el jurel cola amarilla, superando a la harina de pescado. Hasta ahora existe poca información de digestibilidad de la harina de kril en peces. Sin embargo, Storebakken (1988) trabajando con la trucha arco iris (*Salmo gairdneri*, observó valores del 87%. Estos valores de digestibilidad son similares a los obtenidos en nuestro estudio. Por su parte, Tibbetts (2006) reportó valores de 96.3 % para el CDA PC en el bacalao del Atlántico (*Gadus modua*), Esta alta digestibilidad de la proteína, aunada a un alto valor proteico y a una alta palatabilidad en peces marinos (Storebakken ,1988) hace a la harina de krill un excelente candidato como fuente proteica para dietas de jurel cola amarilla. Adicionalmente, la harina de kril es comúnmente utilizada como attractante en las dietas de peces y contiene altos niveles de carotenoides en particular Astaxantina (Storebakken, 1988). Los carotenoides son precursores bioquímicos de la Vitamina A componente esencial en la formación de rodopsinas en la retina y además es requerida para el mantenimiento de las células epiteliales de las membranas mucosas (Halver, 2002).

El gluten de trigo, es una harina vegetal que puede ser utilizado como fuente proteica o como aglutinante en la elaboración de alimentos (Storebakken, 2000). En el presente trabajo, el de Gluten de trigo resultó en el mayor coeficiente de digestibilidad de proteína de todos los ingredientes evaluados con un CDA-PC de 82.5%. Estos resultados son similares a los datos obtenidos con el salmón del atlántico (*Salmo salar*) por Storebakken (2000). Aun con niveles de inclusión de un 50 % de gluten de trigo en las dietas, el autor reporta coeficientes de digestibilidad aparente de proteína del 92 .6%. Así mismo, Robaina (1999) trabajando con la lubina Europea (*Dicentrarchus labrax*)

obtuvo valores de 95.77 % en la digestibilidad de la proteína con valores de inclusión del 30 % del gluten de trigo.

En el presente trabajo, la harina de gluten de maíz resultó con el menor coeficiente de digestibilidad de la proteína (53%) de todas las fuentes de proteína evaluadas. Estos resultados son similares a los reportados por Masumoto (1996) evaluando la biodisponibilidad de los aminoácidos en los ingredientes en jurel (*S. quinqueradiata*). En su trabajo, Masumoto reporta un promedio del 46% para la digestibilidad aparente de los aminoácidos presentes en el gluten de maíz.

En contraste, Tibbetts (2004; 2006) evaluando la digestibilidad del gluten de maíz en bacalao del Atlántico, reporta digestibilidades del 86%. Similarmente, Zhou (2004) observó un CDA de la proteína del gluten de maíz de 94.42% en juveniles de cobia (*Rachycenton canadum*)

Zhou (2004) menciona que ingredientes con alto contenido proteico tuvieron mayor CDA que los que tenían menor contenido proteico. Sin embargo en el presente estudio no se encontró relación entre el nivel de proteína en el ingrediente y su digestibilidad. Probablemente debido a la baja digestibilidad estimada en nuestros ingredientes.

Una posible explicación de los valores bajos obtenidos en los coeficientes de digestibilidad en el presente estudio esta posiblemente relacionada con los niveles de fibra de los ingredientes y las dietas. Es bien conocido que un alto contenido en fibra en la dieta aumenta la velocidad del paso del bolo alimenticio por el tracto digestivo (Rust 2002). Es por esto que niveles altos de fibra pueden reducir el tiempo efectivo de acción de las enzimas digestivas sobre sus respectivos sustratos, reduciendo así la digestibilidad de los nutrientes como la proteína (McGoogan, 1996). Aunque no se

cuantifico directamente la cantidad de fibra en la dietas se puede inferir que las dietas que incluyan ingredientes de origen vegetal contengan un mayor contenido de fibra, disminuyendo el tiempo de digestión y reduciendo así la digestibilidad. Por ejemplo, la dieta para evaluar la digestibilidad del gluten de maíz contenía 47.5 % de ingredientes de origen vegetal y por lo tanto un mayor contenido de fibra. Otras explicaciones pueden estar relacionadas con las diferencias anatómicas y fisiológicas del tracto digestivo entre especies (Masumoto, 1996) o relacionadas con el método de recolección de heces afectando así la estimación de los coeficientes de digestibilidad.

8.2. Digestibilidad proteica *in vitro* de ingredientes empleados en juveniles de jurel cola amarilla.

La harina de pescado es el principal ingrediente en la elaboración de alimentos balanceados para peces marinos debido entre otros factores a su excelente perfil y biodisponibilidad de aminoácidos esenciales, su alta digestibilidad y la ausencia de factores anti nutricionales (Romero et al., 1994). Las harinas de pescado de alta calidad se consideran “harinas estándar de oro” en términos de comparación de calidad de proteína, rendimiento en términos de crecimiento y sobrevivencia de los organismos y los costos de producción (Drew et al., 2007). Sin embargo, la calidad de las harinas de pescado pueden variar dependiendo del tipo de pez con la cual fueron elaboradas, origen del recurso, el tiempo de cosecha y transporte, la temperatura de almacenamiento durante la captura y por último tipo de procesamiento en la fabrica (Tacon, 1989).

Aunque no se cuentan con muchos indicadores de las diferencias en calidad entre las dos harinas de pescado mexicanas evaluadas, si se encontraron diferencias significativas entre el grado de hidrólisis (GH) de la HPG de Guaymas comparada con

la HPBC de Ensenada. Estos resultados sugieren una diferencia importante en la calidad y biodisponibilidad de los aminoácidos de las harinas. El análisis proximal de las harinas no reveló diferencias importantes en términos de nivel de proteína, lípidos y cenizas. Es probable que el tipo y calidad de la materia prima haya sido muy diferente y las condiciones de procesamiento no fueran las mismas, pero no se pueden hacer conclusiones importantes porque no se tienen más datos que nos ayuden a inferir las posibles diferencias entre las dos harinas. Se está trabajando en conseguir más información de la calidad de estas harinas.

No se encontraron estudios que reportaran la digestibilidad *in vitro* de harinas de kril evaluadas en peces marinos por lo que no se tiene mucha información con que discutir. Sin embargo, en el presente trabajo el GH obtenido con la harina de kril fue alto y no se encontraron diferencias significativas con las harinas de pescado evaluadas. Esto sugiere que esta harina tiene una buena digestión en el jurel cola amarilla y corrobora los datos obtenidos en la digestibilidad *in vivo*. Esto indica que la harina de krill es un ingrediente con alto valor nutricional y debería ser incluido en dietas para jurel.

La harina de soya fue el ingrediente que menor GH obtuvo en este trabajo. Esto se pudiera atribuir a factores anti nutricionales presentes en la harina, tales como inhibidores de enzimas digestivas (García-Carreño et al. 1997). En particular, los inhibidores de tripsina y quimo tripsina. Adicionalmente, se puede atribuir a la presencia de ácido fítico que se encuentra comúnmente en la mayoría de las leguminosas y cereales este se ha visto que reduce la digestibilidad de iones minerales, sin embargo existen estudios que la suplementación de fitasas incrementan la digestibilidad del fósforo, minerales y proteína cruda. (Richie and Garling 2004) Aunque la harina empleada pasó por un proceso de extrusión a 118 °C (información obtenida de

la compañía PADSA, México) y en teoría esta temperatura llega a inactivar los inhibidores enzimáticos presentes en la harina de soya (100°C) no siempre se elimina los fitatos de las harinas. Por otra parte con un exceso en el calentamiento de la harina de soya se corre el riesgo de reducir la biodisponibilidad de aminoácidos reflejándose en una baja digestibilidad. (Anderson *et al.*, 1993).

Otro factor que posiblemente afectó el GH en la harina de soya esta relacionado con los sitios de acción de las enzimas digestivas de los peces. Según Chen (2000) y Montes (2008) las principales enzimas digestivas del intestino en *S. lalandi* son tripsina y quimotripsina. Además, el sitio de acción de la tripsina y quimotripsina son los enlaces peptídicos conformados por la lisina, arginina y/o fenilalanina (Alarcón, 2002). Es bien conocido que la harina de soya y en particular todas las harinas de origen vegetal, son deficientes en este tipo de aminoácidos (Alarcón, 2002). Esta deficiencia en lisina, arginina y/o fenilalanina reduce el sitio de acción de las principales enzimas extraídas del jurel, reduciendo así el grado de hidrólisis

Por ultimo, es importante mencionar que la metodología *in vitro* del pH-STAT utilizada en el presente estudio, solo simula la digestión alcalina que ocurre en el tracto digestivo de los peces. Este factor seguramente afecta los resultados observados en el GH con la metodología utilizada. Alarcón (2002) evaluó la digestión de proteínas por medio del pH-STAT comparando realizar solo la digestión alcalina contra una digestión acida previa a la digestión alcalina. Sus resultados encontraron diferencia importantes en el Grados de hidrólisis con ambas técnicas. Por ejemplo, encontró, un mayor GH en los ingredientes que fueron sometidos a una digestión ácida, adicionando HCl (pH 2.0) y 1000 unidades de proteasas ácidas de cerdo. Seria recomendable evaluar el efecto de realizar una digestión acida, utilizando pepsina o HCl, antes de someter los ingredientes y dietas a la digestión alcalina con extractos de jurel por medio del pH-Stat.

No se encontró una correlación entre grado de hidrólisis y porcentaje de proteína cruda ni en ingredientes ni en dietas lo que nos puede sugerir que la digestibilidad no está influenciada por lo menos para esta especie, por la cantidad de proteína.

8.3 Comparación de la digestibilidad proteica *in vitro* de los diferentes ingredientes con digestibilidad *in vivo*

En el presente estudio se evaluó la digestibilidad proteica de los diferentes ingredientes para la elaboración de dietas para juveniles de jurel cola amarilla mediante dos métodos, el método indirecto usando como marcador al óxido crómico (*in vivo*) y el método *in vitro* utilizando un titulador automático pH-Stat (*in vitro*).

Aunque los métodos *in vitro* son más rápidos, de bajo costo y dan información confiable es recomendable corroborar los datos de digestibilidad obtenidos con métodos *in vitro* con los coeficientes de digestibilidad *in vivo*. Esto nos permitirá evaluar si el método *in vitro* es adecuado o no y predice adecuadamente la calidad nutricional del ingrediente. Existen trabajos realizados en los cuales se evalúan precisamente la correlación que hay entre las dos técnicas, encontrando altas correlaciones en peces marinos (Alarcón, 1997; Dimes y Haard, 2004) y en crustáceos (Lazo et al., 1998).

Para estudios de digestibilidad proteica *in vitro* el empleo de extractos digestivos del propio organismo a estudiar es más recomendable y apropiado que el uso de cócteles multi-enzimáticos, debido a que estos últimos, solo se utilizan tres o cuatro enzimas comerciales, siendo tripsina, quimotripsina aminopeptidasa y proteasas bacteriales las más utilizadas. En cambio, los extractos enzimáticos del organismo en estudio contienen toda una batería de enzimas digestivas presentes en el intestino. Entre las que podríamos

mencionar a las tripsinas, quimotripsinas aminopeptidasas, carboxipeptidasas, lipasas, amilasas (Alarcón et al., 2002).

Adicionalmente, algunos estudios han reportado haber encontrado diferencias importantes entre las estructuras moleculares de las enzimas digestivas de diferentes organismos (i.e., mamíferos vs. peces), sus mecanismos de acción, energía de activación y por lo tanto su fisiología digestiva. En particular si tomamos en cuenta el pH y temperaturas optimas, la eficiencia catalítica, sensibilidad a inhibidores, y la especificidad al sustrato entre las enzimas digestivas de diferentes phyla (Chong *et al* 2002, Alarcón *et al* 2002)

En este estudio se encontró una correlación relativamente alta pero no significativa entre los resultados de digestibilidad proteica *in vitro* con los CDA obtenidos en los análisis de digestibilidad *in vivo*. Son diversas las causas que se podrían mencionar para explicar la falta de una correlación significativa. Por ejemplo, la variabilidad de los datos obtenidos, hace que la correlación exista pero no sea estadísticamente significativa. Así mismo, dependiendo de la metodología empleada en la extracción de heces se obtienen resultados más o menos variables. La metodología de extracción de heces mediante presión abdominal (stripping) requiere de mucha práctica y experiencia para ser consistentes en la extracción de las heces. Es común que se acarreen nutrientes que aún no están completamente digeridos al forzar la salida de las heces mediante la presión abdominal. Así mismo, las heces se pueden contaminar con otro tipo de fluidos corporales y células epiteliales del intestino que nos llevarían a subestimar los valores dados en los CDA y incrementarían la variabilidad en los datos (Halver, 2002).

Otra posible explicación esta relacionada con la metodología *in vitro* utilizada. Como mencionamos anteriormente solo se evaluó la fase alcalina de la digestión y está

demostrado que se obtiene un mayor grado de hidrólisis cuando se le realiza una digestión ácida con pepsina. La digestión in vivo, involucra tanto la digestión acida en el estomago, así como la digestión alcalina en el intestino (Moyano, F, J, 2001, Alarcón 2002).

Por último, el gluten de trigo utilizado en la formulación de la dieta basal y por lo tanto presente en todas las dietas experimentales, no se pudo evaluar adecuadamente in vitro. Esto se debido a que no se pudo solubilizar completamente, lo que pudo haber influido en las digestibilidades in vitro de todas las dietas. La mayoría de las enzimas digestivas son enzimas hidrolíticas y requieren que el sustrato este solubilizado para su digestión. Si el gluten de trigo no se solubilizo correctamente esto disminuye su digestión in vitro resultando en una posible subestimación de la digestibilidad. Sin embargo, aunque no se encontró una relación significativa, se observa una correlación relativamente fuerte, donde entre mayor CDA in vivo mayor GH in vitro

9. Conclusiones

Como era de esperarse el jurel cola amarilla del Pacífico digirió mejor las fuentes proteínicas de origen animal que las de origen vegetal, con excepción del gluten de trigo que tuvo una excelente digestión *in vivo*.

La harina de pescado de Guaymas fue la harina de mayor grado de hidrólisis (GH) por lo que se recomienda ampliamente como una excelente fuente proteica en dietas para jurel cola amarilla. Sin embargo, también se recomiendan la harina de pescado de Baja California y la Harina de Krill por su alta digestibilidad.

Aunque los resultados obtenidos con las diferentes metodologías para estimar la digestibilidad del gluten de maíz no coinciden en la calidad de este ingrediente, se puede considerar que esta fuente proteica es un candidato para la elaboración de dietas para jurel. Esto debido a que los datos obtenidos en la digestibilidad *in vitro* nos indicaron un buen GH por lo que pueden dar un indicio de su buen desempeño, así como su alto valor proteico, su bajo costo y su facilidad relativa para conseguirlo en el mercado.

La metodología *in vitro* empleada se considera como una metodología recomendable para evaluar digestibilidad y calidad nutricional de los diferentes ingredientes. Sin embargo, no resultó muy adecuada para evaluar dietas completas por lo que se recomienda realizar una digestión ácida previa de los ingredientes.

La harina de soya resultó ser un ingrediente poco digerible, esto se le puede atribuir a la presencia de factores anti nutricionales: deficiencia en aminoácidos esenciales principalmente lisina y metionina y la poca palatabilidad que tiene este ingrediente en peces marinos.

No se puede determinar la calidad nutricional de un ingrediente únicamente cuantificando la digestibilidad de este. Es indispensable combinar esta información con el perfil de aminoácidos y su biodisponibilidad.

10. Recomendaciones

Se recomienda realizar estudios que no solo evalúen la digestibilidad proteica de los ingredientes, si no también digestibilidad de energía y fibra mediante el método in vivo, ya que con ello se podría tener más bases para la elección de ingredientes.

Se recomienda un método diferente en la recolección de heces ya sea por medio de sifón o por el diseño de un colector de heces, esto con el fin de tener el mínimo manejo de los organismos de esta especie.

Debido a las tasas de crecimiento tan elevadas que tienen estos organismos, se recomienda mejorar las condiciones de cultivo, ya sea tener tanques más grandes o reducir la densidad de organismos por tanque.

11. Literatura citada

- Alarcón, F. J., F.J. Moyano, M. Díaz, C Fernández-Díaz and M. Yúfera. 1999.
Optimization of the protein fraction of microcapsules used in feeding of marine fish larvae using *in vitro* digestibility techniques. *Aquaculture Nutrition*, 5: 105-113
- Córdova-Murueta Julio Humberto, García-Carreño Fernando Luis. 2002.
Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture* 210, 371-284
- Daniels, H.V. 2000. Species profile. Southern flounder. SRAC. Publication No. 726
- Grabner. M ., 1985. An *in vitro* method for measuring protein digestibility of feed components. *Aquaculture* 48, 97-110
- Haard, N.F. 1993. Digestibility an *in vitro* evaluation of plant protein for salmonid feed 29p. In: D.J. Sessa and C. Lim (eds). *Nutrition and utilization technology in aquaculture*. AOCS monograph. American oil Chemists society, Champaign, IL.
- I.Forster., 1999., A note on the method of claculatina digestibility coefficients of nutrients provided by single ingredients to feeds of aquatic animals. *Aquaculture Nutrition* 1999 5;143-145
- Josafat Marina Ezquerra, Fernando L. García-Carreño, Roberto Civera, Norman F.Haard .1997 , *Aquaculture* 157, 251-262

- Lazo, J.P., G. J. Holt and C.R. Arnold. 2002. Towards 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.[In pres]. Fisheries Science.
- Lupatsch,I., *et al.*1997. Apparent digestibility coefficients of feed ingredients and their predictability in compound diets for gilthead seabream, *Sparus aurata* L.
- McGinns, A . J. and R. Kasting. 1964. Colorimetric analysis of chromic oxide used to study food utilization by phytophagous insects. Agricultural and Food Chemistry 12: 259-262.
- McGoogan, B., Reigh,R.1996. Apparent digestibility of selected ingredients in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets.Aquaculture 141: 233-244
- Martínez Montaña Emmanuel .2007. Tesis Maestría en Ciencias. Digestibilidad proteica en el lenguado de california (*Paraichthys californicus*): ontogénesis y comparación de dos métodos de evaluación in vitro. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Montes Macías Ruth Adriana. 2007 Tesis Maestría en Ciencias. Caracterización de la actividad enzimática de larvas de jurel cola amarilla del Pacífico (*Seriola lalandi dorsalis*)
- 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.

- Nakada, M. 2008. Capture-based aquaculture of yellowtail. In A. Lovatelli; P.F. Holthus (eds). Capture-based aquaculture. Global overview. *FAO Fisheries Technical Paper*. No. 508. Rome, FAO. pp. 199–215.
- 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(2001): 130-133
- Shiua, S.Y, 1998. Nutrient requeriments of penaeid shrimps. *Aquaculture* 164, 77-93
- Tibbets, S.M., *et al* 2004. Apparent digestibility of common feed ingredients by juvenile haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L. *Aquaculture Research*. 35: 643-651
- Yngvar Olsen, Jan Ove Evjemo, Atle Olsen, 1999, Status of cultivation technology for production of Atlantic halibut (*Hipoglossus hipoglossus*) juveniles in Norway/Europe
- 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.

